

11281

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

3

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**MECANISMOS IMPLICADOS EN EL ACOPLAMIENTO
DE OSCILADORES CIRCADIANOS**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**P R E S E N T A :
IVETTE CALDELAS SÁNCHEZ**

DIRECTOR DE TESIS. DR. RAÚL AGUILAR ROBLERO

286527
2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Es bien sabido que el sistema circadiano de mamíferos está constituido por múltiples osciladores. Sin embargo, sólo se ha podido determinar la existencia de un sustrato neuroanatómico capaz de generar y mantener una amplia variedad de ritmos, el cual se encuentra ubicado en el Núcleo Supraquiasmático del hipotálamo (NSQ). Con la finalidad de abordar el estudio sobre los mecanismos que participan en el proceso de acoplamiento entre osciladores circadianos, adoptamos el uso del modelo experimental de trasplantes de NSQ fetal a ratas intactas los cuales fueron colocados en el tercer ventrículo (III V) y en el ventrículo lateral (VL). Para establecer los efectos de los trasplantes sobre las propiedades dinámicas del NSQ hospedero, fueron obtenidas las respuestas de fase por pulsos de luz (1h duración, 400 lux) en la zonas de retrasos (CT 13) y avances de fase (CT 23) de la curva de respuestas de fase a nivel conductual y a nivel celular mediante la detección inmunohistoquímica de C-Fos y de Jun-b. También fue estudiada la participación de la glándula pineal sobre el proceso de acoplamiento, por lo que un grupo de animales recibieron el trasplante de NSQ en el VL y posteriormente fueron pinealectomizados. También fueron probadas las respuestas de fase en ratas con trasplante de corteza en el IIV.

A nivel conductual encontramos que los animales con trasplante de NSQ observamos respuestas de fase atípicas en CT 23, en donde los animales exhibieron cambios de fase con dirección opuesta (retrasos de fase), así como un marcado incremento en el número de ciclos transitorios. En el caso de los animales pinealectomizados y con trasplante de NSQ en el VL a pesar de que también mostraron cambios de fase con dirección opuesta, mostraron un notorio decremento en la magnitud de los cambios de fase y en el número de ciclos transitorios. Mientras que los animales de corteza exhibieron cambios de fase similares a los encontrados en animales intactos.

A nivel celular el principal efecto se observó en el NSQ transplantado, en donde no se observó inducción fótica de c-Fos y de Jun-b, lo cual sugiere que la información fótica no alcanza al NSQ transplantado en el lapso de 1 hora.

Los resultados obtenidos sugieren: [1] que el NSQ transplantado y el NSQ hospedero se encuentran acoplados, [2] que la ubicación del trasplante no es un factor determinante para que se pueda llevar a cabo el proceso de acoplamiento, [3] la participación de la pineal a pesar de que no es un requisito indispensable para que pueda establecerse el proceso de acoplamiento, la pineal si participa en el establecimiento de este proceso y [4] que los efectos son específicos al tipo de tejido transplantado.

It is well known that mammalian circadian system is constituted by several circadian oscillators. However, the Hypothalamic Suprachiasmatic Nucleus (SCN) is the only neuroanatomical substrate capable to generate and maintain a wide variety of circadian rhythms in mammals. The aim of the study was determine the mechanisms involved in the coupling process, therefore, we used the experimental model of fetal Suprachiasmatic nucleus (SCN) grafts in to the third ventricle (III V) and in the lateral ventricle (LV) to intact rats. To analyze the effect of the SNC grafts in the dynamical properties of the host SCN, we determined the phase responses to light pulses (1h duration, 400 lux) in the phase delaying (CT 13) and phase advancing (CT 23) zone of the phase responses curve at behavioral and cellular level by immunocytochemistry to c-Fos and Jun-b proteins. The participation of the pineal gland on the coupling process was also studied. Therefore, a group of animals received a SCN graft into the LV and later this animals were pinealectomized. The phase responses were also probed in rats bearing cortex grafts in the III V.

At behavioral level, we find that the animals with SCN grafts exhibited atypical phase shifts at CT 23 all the rats showed phase shifts with opposite direction (phase delays), as well as a marked increment in the number of transitory cycles. In the case of the pinealectomized animals with SCN grafts in the LV, although they also showed phase shifts with opposite direction, these animals exhibited a notorious decrement in the magnitude of the phase shifts and in the number of transitory cycles. While the animals with cortex grafts exhibited similar phase shift to those induced in intact animals.

At cellular level the main effect of the grafts was detected in the grafted SCN, where the induction c-Fos and Jun-b proteins was not observed, this data suggest that the photic information doesn't reach to the grafted SCN in the first hour after the beginning of light stimulus administration.

These data suggest: [1] the grafted SCN and the host SCN are coupled, [2] the location of the SCN graft is not a decisive factor for the establishment of the coupling process, [3] the participation of the pineal gland is not an indispensable requirement for the coupling process, but it also participates in the establishment of this process and [4] the effects are specific to the kind of grafted tissue.

INTRODUCCIÓN

Los Ritmos Circadianos	1
El Sistema Circadiano	3
[A] <i>Cronometría</i>	5
[B] <i>Sincronización</i>	6
[C] <i>Acoplamiento</i>	14
Neuroanatomía Funcional del Sistema Circadiano	20
[A] <i>El marcapaso sincronizable a la luz de mamíferos</i>	20
[B] <i>Osciladores circadianos múltiples</i>	21
[C] <i>Organización del NSQ</i>	22
[D] <i>Vías aferentes</i>	24
[E] <i>Vías eferentes</i>	26
La glándula pineal como integrador de fase	28
Mecanismos Celulares del marcapaso sincronizable a la luz	30
Transplantes de Tejido Fetal	36
[A] <i>Aspectos funcionales de los transplantes</i>	38
[B] <i>Los transplantes de tejido fetal en la cronobiología</i>	39
Planteamiento del problema	43
<u>HIPÓTESIS</u>	47
<u>OBJETIVOS</u>	49

MATERIALES Y MÉTODOS

Procedimientos Generales	52
[A] <i>Sujetos</i>	52
[B] <i>Cirugías</i>	52
[C] <i>Registro Conductual</i>	56
[D] <i>Estimación de las Fases del Ciclo Circadiano</i>	57
[E] <i>Detección inmunohistoquímica de c-Fos, Jun-b y VIP</i>	58
[F] <i>Análisis estereológico de c-Fos y Jun-b en el NSQ</i>	60
[G] <i>Respuesta de fase a nivel conductual en ratas transplantadas</i>	63
[H] <i>Respuesta de fase a nivel celular</i>	64

RESULTADOS

Estudios preliminares en ratas intactas	67
[A] <i>Detección inmunohistoquímica de c-Fos</i>	67
[B] <i>Determinación de c-Fos como marcador de fase</i>	71
[C] <i>Inducción fótica de c-Fos y Jun-b en el NSQ de ratas intactas</i>	75
[D] <i>Protocolo de doble pulso de luz</i>	80
Respuestas de fase en ratas con transplante de NSQ en el IIIV	
[A] <i>Respuestas de fase a nivel conductual</i>	94
[B] <i>Respuestas de fase a nivel celular</i>	96
Respuestas de fase en ratas con transplante de Corteza en el IIIV	
[A] <i>Respuestas de fase a nivel conductual</i>	99
[B] <i>Respuestas de fase a nivel celular</i>	104
Respuestas de fase en ratas con transplante de NSQ en el VL	
[A] <i>Respuestas de fase a nivel conductual</i>	110
[B] <i>Respuestas de fase a nivel celular</i>	115
Respuestas de fase en ratas pinealectomizadas y con transplante de NSQ en el VL	
[A] <i>Respuestas de fase a nivel conductual</i>	121
[B] <i>Respuestas de fase a nivel celular</i>	125

DISCUSIÓN

Estudios preliminares en ratas intactas 129

[A] Determinación de c-Fos como marcador de fase 129

[B] Inducción fónica de c-Fos y Jun-b en el NSQ de ratas intactas 130

[C] Protocolo de doble pulso de luz 132

Respuestas de fase en ratas transplantadas 133

[B] Ratas con trasplante de NSQ en el HIV' 133

[C] Ratas con trasplante de corteza en el HIV' 134

[D] Ratas con trasplante de NSQ en el VI. 136

[E] Ratas pinealectomizadas y con trasplante de NSQ en el VI. 138

Discusión general 139

CONCLUSIONES 149

REFERENCIAS 150

Los Ritmos Circadianos

Una característica inherente a los organismos vivos es el exhibir variaciones cíclicas regulares en una gran variedad de procesos fisiológicos, bioquímicos y conductas fundamentales para su supervivencia. Estas variaciones cíclicas muestran una estrecha relación con los cambios ambientales cíclicos, tal como los cambios diarios de iluminación, por lo que su periodo¹ es cercano al tiempo de rotación de la tierra (24 horas). Estas fluctuaciones rítmicas de naturaleza endógena son conocidas como *Ritmos Circadianos* (Halberg, 1959).

Se ha sugerido que los ritmos circadianos representan procesos esenciales a través de los cuales eventos del medio interno son organizados en una secuencia temporal adecuada, que va a conferir al organismo una de las estrategias más importantes para su adaptación a los cambios diarios del medio ambiente (Pittendrigh 1965b, 1981a).

Se sabe que los ritmos circadianos no son producto de estímulos ambientales cíclicos (Reinberg y Smolensky, 1993). Inicialmente se aisló a diferentes organismo de señales temporales ambientales, con lo que se constató que la ritmicidad circadiana persiste sin atenuación. Además, bajo dichas condiciones el ritmo manifiesta su periodo endógeno, fenómeno que se conoce como *oscilación espontánea o libre corrimiento* (Fig. 1). Dicho fenómeno, es un claro indicador de que los ritmos circadianos son generados por mecanismos propios del organismo, a los cuales se les conoce como *Relojes Biológicos*. Las propiedades de estos relojes son innatas, lo cual fue corroborado inicialmente mediante estudios de genética mendeliana, posteriormente por mutagénesis química (Konopka y Benzer, 1971).

¹ El *periodo* es el intervalo de tiempo que ocurre entre dos puntos de referencia idénticos y cuyo recíproco es la *frecuencia*.

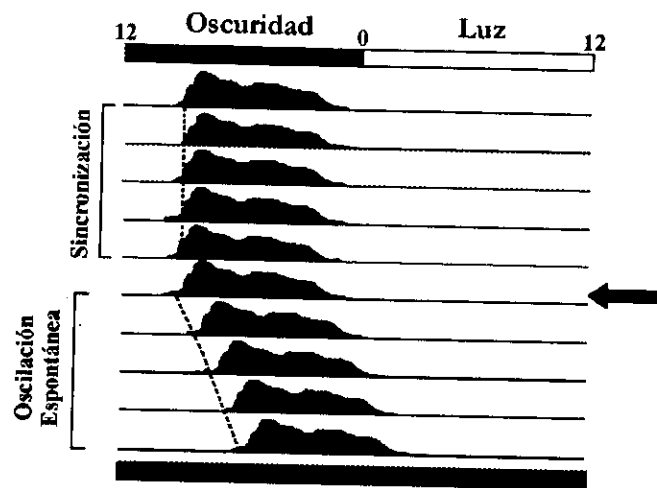


Fig. 1.- Gráficas consecutivas de ocurrencia de eventos o actograma de un ritmo circadiano de un organismo nocturno, en el eje de las ordenadas se presentan los días consecutivos de registro y en la abscisas la hora del día. En la parte superior, el organismo se encuentra bajo un ciclo luz-oscuridad, por lo que el ritmo se encuentra sincronizado al ciclo impuesto. Mientras que en la parte inferior del actograma el organismo es sometido a oscuridad continua (flecha), condiciones bajo las cuales se presenta el fenómeno de oscilación espontánea o libre curso.

A pesar de la naturaleza endógena de estos ritmos, algunos factores ambientales ejercen una notable influencia sobre la expresión de los ritmos circadianos, fenómeno que se conoce como *sincronización* (Pittendrigh y Minis 1964). La sincronización es inducida por estímulos ambientales regulares y predecibles, los cuales permiten que la fase² de los ritmos circadianos se ajuste a la de los ciclos ambientales (Fig. 2). Dichos estímulos son conocidos como *sincronizadores* o *zeitgebers* (Aschoff, 1951).

En el caso de los ritmos circadianos se sabe que el ciclo Luz-Oscuridad (L:O) es el principal agente sincronizador, permitiendo el ajuste del periodo y la fase (Fig. 2) de las oscilaciones endógenas (tiempo biológico) a la alternancia entre el día y la noche (tiempo geofísico).

² La *fase* es considerada como el estado instantáneo de la función periódica en una escala temporal arbitraria.

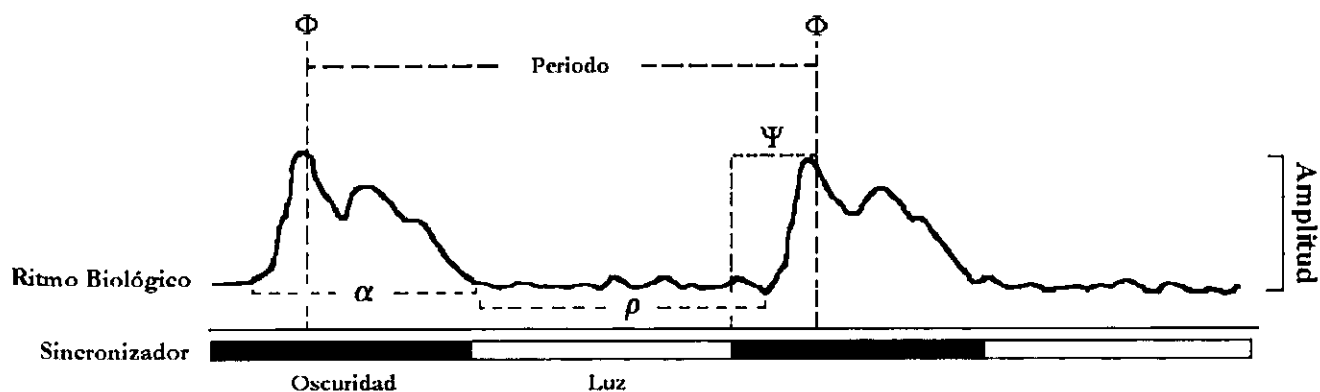


Fig. 2 Esquema de los parámetros comúnmente analizados en los ritmos biológicos. El *periodo* (T) se refiere al intervalo de tiempo entre dos puntos de referencia idénticos y cuyo recíproco es la *frecuencia*; la *amplitud* del ritmo se mide desde el punto máximo hasta el mínimo del evento periódico; la *fase* (Φ) es el estado instantáneo de una función periódica con relación a una escala de tiempo arbitraria; la *relación o ángulo de fase* (Ψ) corresponde a la diferencia que existe entre la fase de referencia de dos eventos oscilatorios distintos. La fracción del ciclo empleada en actividad se denomina *alfa* (α) mientras que la empleada al reposo se conoce como *rho* (ρ).

El Sistema Circadiano

De acuerdo con la teoría elaborada por C. S. Pittendrigh (1954-1993) los *elementos oscilatorios o relojes biológicos* son sistemas orgánicos capaces de generar un orden temporal en las actividades del individuo, permitiendo una adecuada interacción en el dominio temporal entre el ambiente y el organismo (Pittendrigh et. al. 1958b; Pittendrigh 1960, 1981b, 1993). Dichos relojes realizan su función mediante dos procesos diferentes: (1) midiendo la duración del tiempo biológico, y (2) reconociendo la hora ambiental local. Estos procesos aseguran que los eventos del medio interno tengan una secuencia temporal adecuada y estable, lo que le confiere al organismo la capacidad de anticiparse o ajustarse a los cambios en el medio ambiente (Pittendrigh, 1981a, c).

Con la finalidad de puntualizar los diferentes elementos y procesos que participan en la generación y el mantenimiento de los ritmos circadianos se ha adoptado el concepto de *Sistema Circadiano* (Aguilar-Roblero, 1993a; Moore,

1996). En este modelo conceptual (Fig. 3), se considera que el sistema esta constituido por: **[A] elementos oscilatorios** que poseen la capacidad de generar fluctuaciones rítmicas con una frecuencia cercana a las 24h, a través de dichos elementos va a ser posible el **proceso de cronometría**, es decir la medición del tiempo. **[B]** El sistema también consta de otra serie de elementos que van a ser los encargados de transmitir la información de los cambios cíclicos del medio ambiente a los elementos oscilatorios. Esto involucra la presencia tanto de **receptores sensoriales**, como de **vías aferentes** cuya participación es determinante para que pueda establecerse el **proceso de sincronización**, permitiendo el ajuste de las fluctuaciones rítmicas generadas por el organismo con el tiempo ambiental. **[C]** Para que finalmente sea expresada la ritmicidad generada por los elementos oscilatorios se requieren **vías eferentes** que van a regular el **proceso de transmisión** de la ritmicidad a los sistemas efectores.

En este modelo conceptual se parte del hecho de que el sistema circadiano se encuentra constituido por más de un elemento oscilatorio, de tal forma que mediante **[D] el proceso de acoplamiento**, va a ser posible el funcionamiento coordinado entre los distintos de osciladores que conforman el sistema.

Brevemente describiré las principales características de cada uno de los elementos y de los procesos que conforman el sistema circádico.

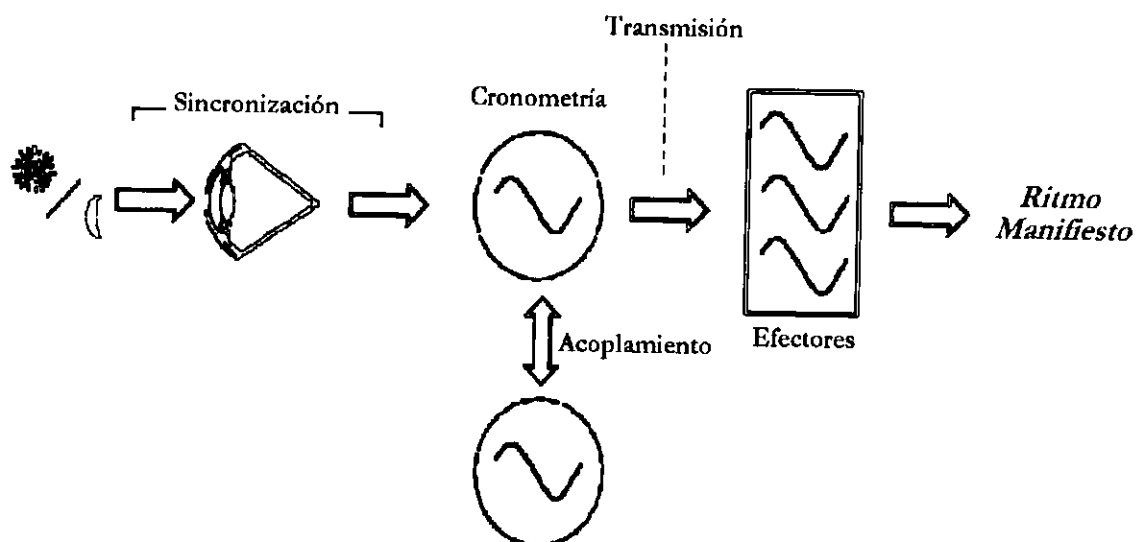


Fig. 3.- Modelo conceptual del *Sistema Circadiano*, el cual esta constituido por vías y receptores encargados de proporcionar información sobre los cambios ambientales para que pueda establecerse el proceso de sincronización. Así mismo, el sistema posee más de un elemento oscilatorio encargado del proceso de cronometría. Estos osciladores mantienen el funcionamiento coordinado mediante el proceso de acoplamiento. Para que la ritmicidad sea finalmente expresada, el sistema cuenta con vías eferentes a los efectores, proceso que se denomina transmisión.

[A] Cronometría

Un reloj biológico eficiente debe cumplir al menos dos pre-requisitos indispensables: (1) Para que la secuencia temporal de eventos en el medio interno puedan ocurrir sincrónicamente, el reloj debe mantener una *velocidad angular* (v) estable en cada fase del ciclo (Pittendrigh, 1981b); (2) para que dicha velocidad y por lo tanto el periodo del reloj biológico no sea alterado por cambios en la temperatura ambiental, el reloj debe de presentar *compensación de temperatura*. De otra forma se vería comprometida la habilidad del reloj biológico para medir el tiempo con precisión y su valor adaptativo se vería seriamente limitado ante cambios extremos de temperatura (Pittendrigh, 1954; Bruce y Pittendrigh 1956).

Bajo condiciones de oscilación espontánea, los relojes biológicos en cada especie muestran un periodo (τ) característico, el cual generalmente no es de 24 horas exactas. La selección natural ha demandado que las oscilaciones biológicas exhiban periodos cercanos (*circa*) a las 24 h, ya que esta de esta forma contribuye a la estabilización día a día del programa biológico al ciclo ambiental, aún cuando el fotoperiodo cambia durante las diferentes estaciones del año, esto permite un reconocimiento confiable del tiempo local (Pittendrigh 1981a; Pittendrigh y Daan 1976b).

Como anteriormente se señaló, el sistema circadiano se encuentra constituido por más de un elemento oscilatorio, por lo que cabe hacer la distinción de las características observadas de un ritmo circadiano (*overt rhythmicity*) y las

propiedades del *marcapaso*³ que dirige dicho ritmo. Se ha sugerido que el marcapaso dirige una plétora de subsistemas fisiológicos a los cuales le asigna el nombre de *osciladores secundarios*, los cuales pueden o no ser autosostenidos, ya que éstos no son responsables de la ritmicidad (Pittendrigh, 1967). De tal forma que en cualquier punto o fase del ritmo el marcapaso autosostenido dispara una secuencia de eventos fisiológicos, que determinan la evolución temporal de la actividad observable (Pittendrigh y Daan, 1976a). De acuerdo a lo anteriormente señalado, la *fase* (ϕ) y el *periodo* (τ) de un ritmo en estado estable de oscilación espontánea, están determinados por la ϕ y el τ del marcapaso que es quien dirige dicha ritmicidad observable (Pittendrigh, 1967).

[B] Sincronización

Como se mencionó previamente, es claro que los relojes biológicos son sensibles a agentes externos, lo cual les permite el reconocimiento de la hora local (Aschoff, 1981; Pittendrigh y Bruce, 1957). Para que un estímulo pueda sincronizar un ritmo circadiano, este debe de re-iniciar la fase del marcapaso en una cantidad que corrija la diferencia entre el periodo de la señal ambiental y el periodo del marcapaso (Fig. 4), es decir debe ajustar la fase y el periodo del marcapaso al del ciclo ambiental, ya que de otra forma el marcapaso permanecería en oscilación espontánea (Pittendrigh y Minis, 1964).

Existen un gran número de factores cíclicos en la naturaleza que pueden fungir como agentes sincronizadores (Aschoff, 1954). Entre todos, el más poderoso es el ciclo L:O, debido a que este muestra una gran estabilidad en su periodo y fase. Sin embargo se ha descrito la existencia estímulos no-fóticos que también funcionan como agentes sincronizadores, entre estos se encuentran los cambios de temperatura (Hoffman, 1969), la disponibilidad de alimento (Krieger,

³ Los *marcapaso* son capaces de medir el tiempo en ausencia de señales periódicas externas, siendo su característica más

1974; Stephan, 1992), las señales materno-fetales (Reppert et. al. 1987; Duffield y Ebling, 1998), las señales sociales (Marimuthu et. al. 1978) y los campos electromagnéticos (Dowse y Palmer, 1969).

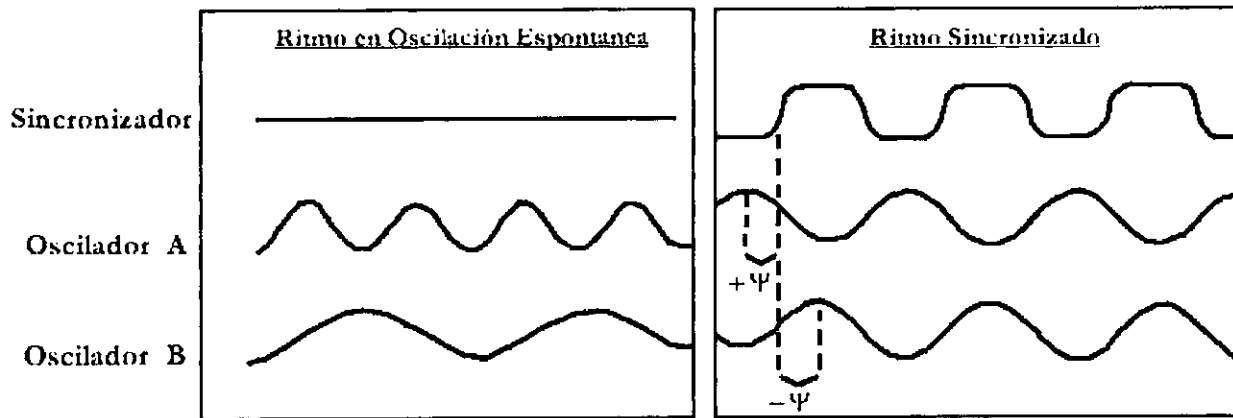


Fig. 4.- Sincronización de dos osciladores de diferente frecuencia por un mismo agente sincronizador. En donde un oscilador con alta frecuencia (A) muestra un adelanto de fase con respecto al sincronizador, por lo que el **ángulo de fase es positivo (+ ψ)**, por el contrario el oscilador con frecuencia baja (B) muestran un rezago en su fase, por lo que el **ángulo de fase es negativo (- ψ)**.

Para que se considere que una señal cíclica ambiental tiene la capacidad de sincronizar al marcapaso circadiano:

a) El marcapaso debe ajustar su τ , hasta igualar el periodo del ciclo ambiental (T). Por lo que τ cambia a τ^* , en donde $\tau^* = T$. Es decir, el sincronizador debe de imponer el periodo al ritmo biológico, por ende al marcapaso subyacente (Pittendrigh, 1960; 1965a; 1972; 1979).

b) Se debe de establecer una **relación de fase⁴** (ψ) única entre el horario del marcapaso y el horario del sincronizador, donde la fase del ritmo debe de ser

importantes es el imponer una fase y un periodo al resto del organismo (Pittendrigh, 1958a).

⁴ La diferencia existente entre una fase de referencia de estas dos oscilaciones (la del reloj biológico y la del sincronizador) se conoce como **relación de fase** (Pittendrigh, 1960; 1965a; 1979; Pittendrigh y Bruce, 1959).

dependiente de la señal temporal externa (Pittendrigh, 1960; 1965a; 1972; 1979; Pittendrigh y Daan, 1976a).

El cambio que presenta τ a τ^* , depende del establecimiento de una ψ estable entre el marcapaso y el sincronizador (Pittendrigh y Daan, 1976b). De tal forma que en la sincronización el control de fase es más relevante que el control del periodo. Se plantea que este es el elemento crítico que la selección natural ha conferido, convirtiendo un programa temporal diario en una entidad oscilatoria dentro del organismo y sobre todo asegurando su re-ajuste automático ante estímulos externos (Pittendrigh y Daan, 1976b; Daan y Pittendrigh, 1976).

Se han sugerido dos posibles mecanismos a través de los cuales puede establecerse la sincronización (Pittendrigh, 1981c):

- ◆ La **Sincronización Continua** (*Modelo Paramétrico de la Sincronización*) en donde los efectos del sincronizador sobre el marcapaso ocurre durante todo o gran parte del ciclo. La forma en que el sincronizador ejerce control sobre la fase y el periodo del marcapaso, es modificando de forma continua la velocidad angular del marcapaso, acelerándola en algunas fases y desacelerándola en otras (Pittendrigh, 1973).
- ◆ La **Sincronización Discreta** (*Modelo No Paramétrico de la Sincronización*) en donde el impacto del sincronizador sobre el marcapaso es breve. Lo cual va a producir que el marcapaso sea rápidamente reiniciado y su fase muestre un abrupto y discreto cambio, en una cantidad igual a $\tau - T$.

La evidencia disponible sugiere que la sincronización a ciclos L:O ocurre a consecuencia de una mezcla de los dos tipos de sincronización, continua y discreta (Pittendrigh, 1981c; 1981a).

Una de las contribuciones más importantes para la comprensión de cómo los estímulos cíclicos fóticos y no fóticos sincronizan al marcapaso circadiano, ha sido la obtención de la *curva de respuestas de fases (CRF)*.

Bajo condiciones de oscilación espontánea, por convención se describe la sucesión de las fases circadianas (ϕ_n) en términos de *horas circadianas (CT)*, en donde el periodo de un ciclo completo posee τ horas en tiempo real y una hora circadiana estaría dada por $\tau/24$. En organismos nocturnos, la primera mitad del ciclo (CT 0 a CT 12) se considera como el *día subjetivo*, mientras que la segunda mitad (CT 12 a CT 24) es la *noche subjetiva*. El inicio de la fracción de actividad por convención se denomina *CT 12*, la cual es generalmente utilizada como fase de referencia. Una vez alcanzado el estado estable de la oscilación espontánea, se administran pulsos breves de luz, los cuales inducen *cambios de fase ($\Delta\phi$)* que pueden ser tanto avances (+), como retrasos (-) de fase. La dirección y la magnitud del $\Delta\phi$ es característico de la fase en la que el marcapaso recibe el pulso de luz.

La CRF (Fig. 5) se obtiene graficando la relación entre la ϕ_n en la que se aplica el pulso de luz y el $\Delta\phi$ inducido (DeCoursey, 1960; Pittendrigh 1960; Pittendrigh y Minis, 1964). Existe un patrón característico de la CRF sin importar la especie en la que esta sea obtenida (Pittendrigh y Minis, 1964; Pittendrigh, 1979; Daan y Pittendrigh, 1976) en donde la administración de pulsos durante el día subjetivo, producen pequeños o ningún $\Delta\phi$. Mientras que durante la noche subjetiva los pulsos de luz producen respuestas evidentes como son retrasos de fase ($-\Delta\phi$) en la noche subjetiva temprana y avances ($+\Delta\phi$) en la noche subjetiva tardía (Fig. 5).

La obtención de la CRF posee varias aplicaciones, entre estas, es una herramienta útil para predecir la ψ precisa entre el marcapaso y los ciclos de pulsos de luz para cualquier valor que puedan adquirir en cuanto a T , así como para

predecir los límites del T a los que se puede sincronizar el marcapaso (Otteesen, 1965). Pero la ventaja más importante que ofrece la obtención de la CRF, es que se trata de la única estrategia a través de la cual es posible estudiar las propiedades dinámicas del marcapaso responsable de la generación del ritmo circadiano en estudio.

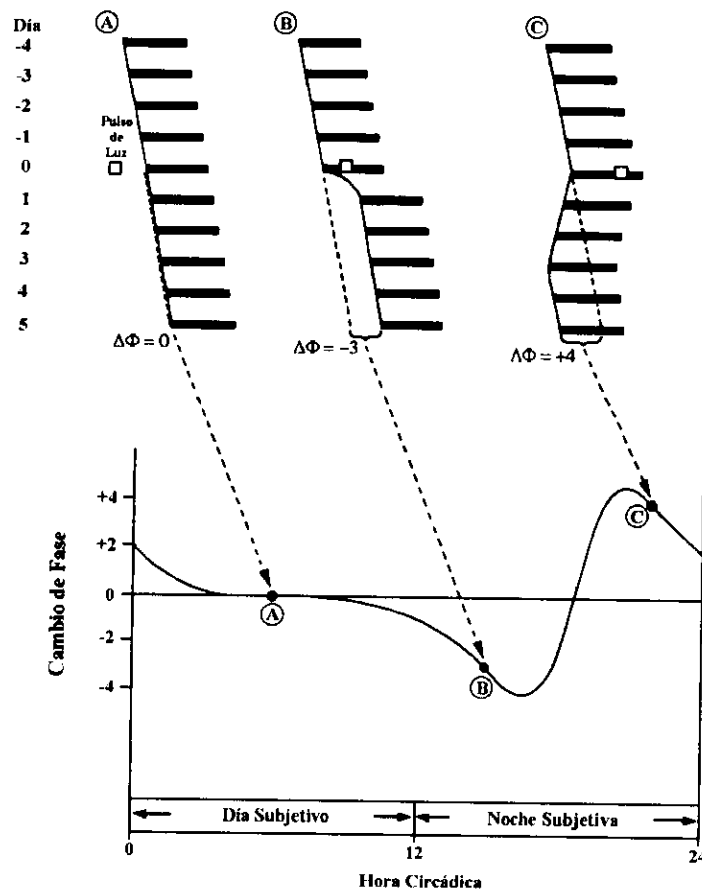


Fig. 5 Efectos de la aplicación de pulsos de luz en diferentes horas circadianas a organismos bajo oscilación espontánea (A – C). En la parte superior, la aplicación de pulsos de luz durante el día subjetivo (A) no produce cambios de fase, mientras que durante la noche subjetiva temprana (B) se inducen retrasos y en la tardía (C) avances de fase. En parte inferior, la *Curva de Respuestas de Fase*, que es la representación gráfica de la dirección y magnitud de los cambios de fase inducidos de acuerdo a la hora circadiana en la que se aplicó el pulso de luz se denomina

En las características generales de la CRF se observan similitudes en todas las especies, pero existen algunas diferencias interespecíficas como la amplitud de los cambios de fase (Fig. 6), así como en el balance relativo entre la zona de avances (A) y la de retrasos (R). En organismos que exhiben τ menores a 24 horas la zona R contempla más horas circadianas que la A, mientras que especies que poseen τ largos la zona A es más grande (Dann y Pittendrigh, 1976).

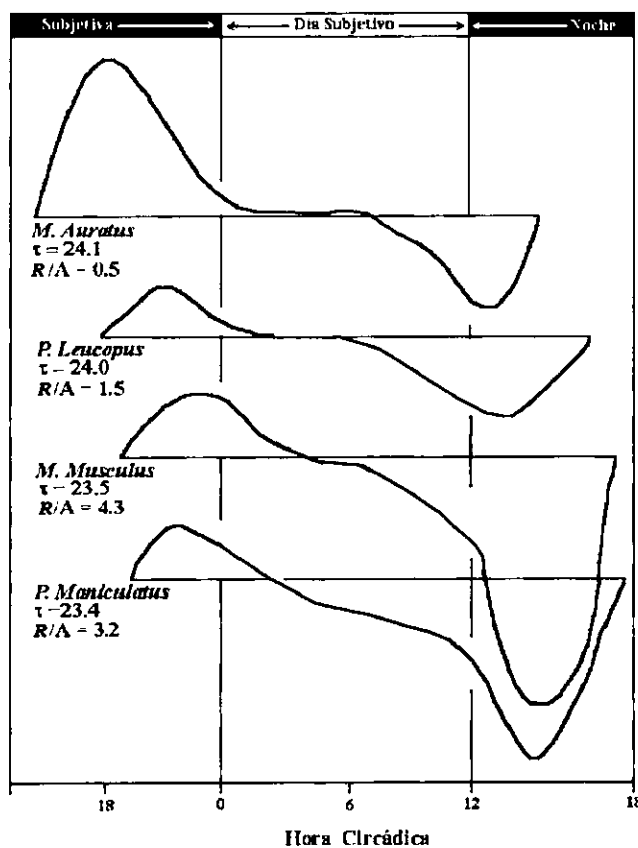


Fig. 6: Curvas de Respuestas de fase a pulsos de luz en diferentes especies, en donde son claramente observables las diferencias entre su forma, la magnitud de los cambios y del balance relativo entre la zona de avances y retrasos los cuales muestran una estrecha relación con el periodo endógeno del ritmo.

En el caso de los mamíferos, se ha observado que entre la porción de retrasos y de avances de fase tiene lugar el *punto de transición* que ocurre de manera gradual. Sin embargo cuando el $\Delta\phi$ es de gran magnitud, el punto de transición se vuelve una función asintótica mostrando un cambio instantáneo del

extremo de los $-\Delta\phi$ al extremo de los $+\Delta\phi$ de la CRF. Winfree (1970, 1971) hizo una distinción entre las CRF con una transición instantánea (Fig. 7), a las cuales denominó CRF *tipo 0* (re-inicio de fase fuerte), de las que poseen una transición gradual que denominó CRF *tipo 1* (re-inicio de fase débil). La elaboración de esta clasificación se basó en la pendiente de la *Curva de Transición de Fase (CTF)*; la cual se obtiene graficando la nueva fase inducida por la aplicación del pulso, en función de la fase previa a la aplicación del mismo. Winfree (1971) observó que las CRF tipo 0, son más frecuentemente observadas en insectos.

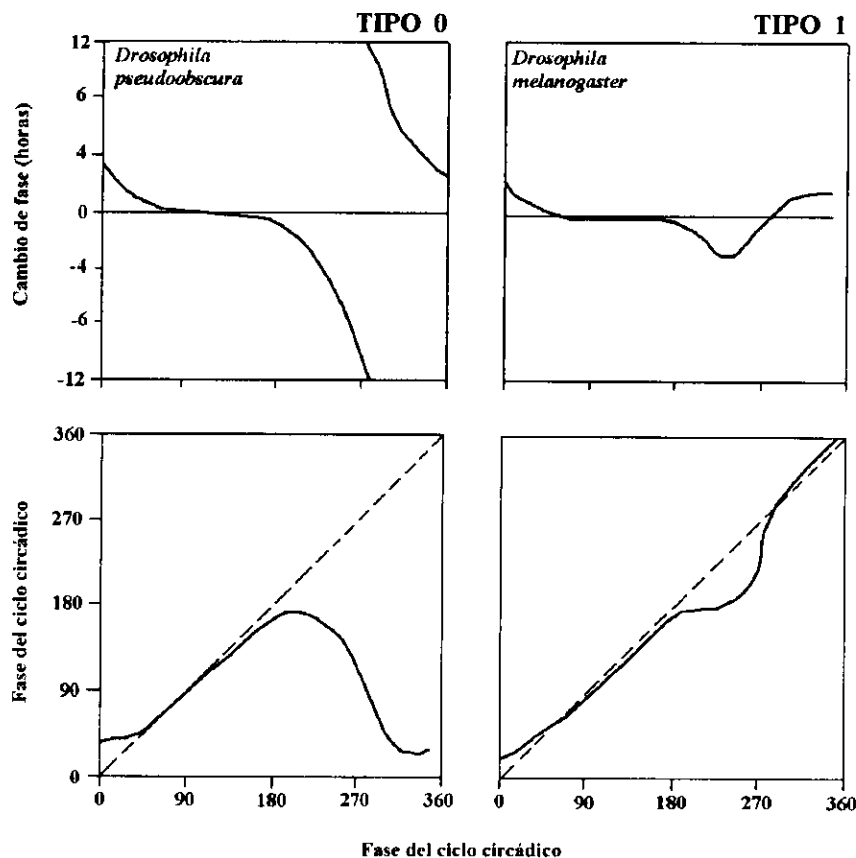


Fig. 7 *Curvas de Transición de Fase* en las que se representa la nueva fase a la que el marcapasos es reiniciado posterior a la aplicación de un breve pulso de luz en una fase dada. En estas se muestra el comportamiento de osciladores con *reinicio de fase fuerte o tipo 0*, así como las que poseen un *reinicio de fase débil o tipo 1*.

(Best et al. 1999; Sharma y Chandrashekar, 2000; Sharma et al. 2000; Caldeas et al. *enriado*).

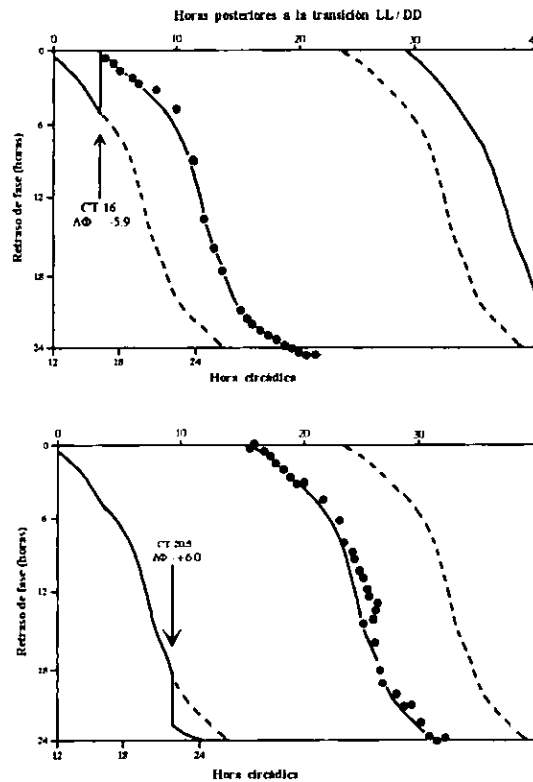


Fig. 8 Protocolo de dobles pulsos de luz, Pittendrigh, (1981) basándose en los cambios obtenidos en la curva de respuestas de fase con un solo pulso de luz (línea punteada) elabora predicciones de los posibles cambios de fase si es aplicado un segundo pulso de luz (línea continua) y los cambios de fase obtenidos por dos pulsos de luz (puntos) cumplen con dichas predicciones.

[C] Acoplamiento

Como se mencionó anteriormente, se sugiere que los ritmos biológicos son generados por más de un reloj biológico, lo cual ha sido corroborado en distintas especies, tales como la *Aplysia* (Strumwasser, 1973) y la *Drosophila persimilis* (Pittendrigh, 1973) entre otros. Así mismo la manifestación de diferentes fenómenos en mamíferos como la desincronización interna, la partición del ritmo y

Para que los $\Delta\phi$ inducidos por luz puedan ser observados a nivel conductual, se requiere de varios *ciclos transitorios* hasta que se alcanza el nuevo estado estable de la oscilación (Pittendrigh et. al. 1958b; Pittendrigh y Minis, 1964). En la cinética de los cambios de fase, se ha observado que los avances de fase requieren mayor número de ciclos transitorios para adquirir el estado estable, en comparación de los retrasos de fase (Pittendrigh et. al. 1958b). Por ejemplo en el caso de las ratas Wistar se ha encontrado que el sistema requiere 1 ciclo transitorio para que sean exhibidos los retrasos de fase, mientras que para que sean observados los avances de fase requieren aproximadamente 3 ciclos (Caldelas et al. *Enviado*). Por tal motivo, se ha sugerido que los ciclos transitorios observados en el patrón rítmico definitivamente no reflejan la conducta del marcapaso circadiano, sino que representan a una segunda entidad oscilatoria (oscilador esclavo) o sistema efector, que gradualmente está re-adquiriendo su fase con el marcapaso que lo dirige (Pittendrigh et. al. 1958b; Pittendrigh y Minis, 1964; Pittendrigh, 1981b).

Mediante un protocolo de dobles pulsos de luz, Pittendrigh (1967) demostró que el re-inicio del marcapaso circadiano de la *Drosophila* es “instantáneo”. Este protocolo consiste en aplicar un segundo pulso de luz poco después del estímulo inicial (Fig. 8), con la finalidad de verificar la nueva fase del marcapaso. Estos experimentos los diseñó basándose en la CRF de la *Drosophila*, elaborando predicciones de los posibles cambios de fase cuando era aplicado un segundo pulso de luz. En este protocolo, Pittendrigh encontró que los cambios de fase inducidos por dos pulsos de luz coincidían con sus predicciones elaboradas en la CRF.

Esta peculiaridad de reinicio rápido del marcapaso circadiano por pulsos de luz, también ha sido observado en otros organismos tales como, la *Neurospora crassa* (Crosthwaite et. al. 1995), gorriones (Binkley y Mosher, 1987) y roedores nocturnos

la persistencia de ritmos circadianos cuando se lesiona el marcapaso circadiano apoyan la noción de la existencia de varios relojes circadianos.

La característica más importante de la *desincronización interna* es la presencia de diferentes parámetros rítmicos los cuales exhiben sus propio periodos circadianos y en la que también se pierden las relaciones de fase entre ellos (Fig. 9).

Se han descrito 3 formas de desincronización:

❖ *Desincronización interna espontánea*, en humanos bajo condiciones normales el ciclo sueño-vigilia y el ritmo de temperatura corporal muestran un periodo de 24 hrs, con una relación de fase constante, sin embargo bajo condiciones de aislamiento temporal se pierde su relación de fase y muestra periodos independientes. Esto sugiere la existencia de osciladores independientes para cada uno de estos parámetros, los cuales se desacoplan en las condiciones experimentales descritas (Aschoff, 1979, 1981).

❖ *Desincronización interna pasajera (Jet-lag)*, cuando se realiza un vuelo transmeridional el organismo requiere algunos días para resincronizarse al nuevo horario. Bajo estas condiciones se ha encontrado que distintos parámetros muestran diferentes velocidades de resincronización. A este estado de pérdida de las relaciones de fase entre los distintos procesos fisiológicos producida por el cambio de huso horario se denomina jet-lag (Moore-Ede et al. 1982).

❖ *Desincronización interna forzada*, también es posible lograr la separación de los distintos ritmos circadianos exponiendo a los sujetos a “días artificiales” con periodos diferentes (aunque cercanos) a 24 hrs, siempre y cuando sea desconocida por estos. En dichas condiciones algunos parámetros en estudio se sincronizan al periodo impuesto, mientras que otros presentan corrimiento espontáneo o sincronización

relativa (Weber, 1983). Estas observaciones se han interpretado como la manifestación de la actividad de varios osciladores, en donde cada uno presenta su propio periodo óptimo de sincronización.

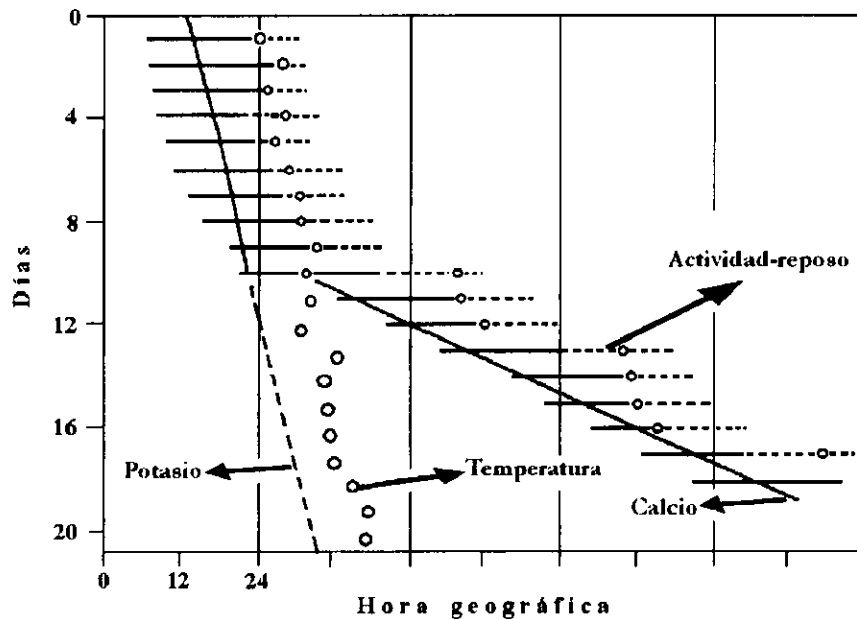


Fig. 9.- Ejemplo de desincronización interna de diferentes ritmos circadianos en humanos bajo condiciones en las que son aislados de señales temporales ambientales. En esta gráfica se muestran el ciclo actividad-reposo (líneas horizontales continuas y punteadas respectivamente), la máxima temperatura corporal (círculos), la máxima secreción urinaria de calcio (línea vertical continua) y de potasio (línea vertical continua).

Hofmann (1971) fue el primero en advertir la partición de la fracción de actividad en dos componentes, fenómeno inducido por reducciones en la intensidad de la luz en sus estudios realizados en *Tupaia*. Posteriormente, este mismo fenómeno fue descrito en hámsters, los cuales fueron sometidos a condiciones de luz brillante constante por intervalos de tiempo prolongados (Fig. 10). Este fenómeno, por sus características, se le conoce como *partición del ritmo* o *splitting* (Pittendrigh, 1973). En la partición del ritmo, inicialmente se observa que cada uno de los componentes de la fracción α presenta un periodo diferente, además estos componentes no establecen relaciones de fase constante. Este

fenómeno ha sido interpretado como un desacoplamiento de diferentes osciladores involucrados en la regulación de un mismo parámetro (Pittendrigh y Daan, 1976b).

Se considera que el *acoplamiento* es el proceso a través del cual se mantiene el funcionamiento coordinado de los distintos osciladores circadianos del organismo, los cuales poseen diferentes periodos de oscilación espontánea. Este proceso va a ser posible por medio del ajuste del periodo y la fase entre los distintos osciladores. Existen dos tipos de acoplamiento: *jerárquico* o *mutuo* (Pittendrigh, 1981b).

El *acoplamiento jerárquico* es unilateral, donde un oscilador dirige a otro sin existir retroalimentación entre estos. En la *Drosophila* el ritmo de eclosión se ha interpretado que involucra este tipo de acoplamiento jerárquico de un par de osciladores. En donde el oscilador *A* está acoplado unilateralmente a un segundo oscilador *B* (Pittendrigh y Bruce, 1959). La relación de fase ($\psi_{B,A}$) entre los osciladores, depende del cociente de sus periodos en oscilación espontánea (τ_B / τ_A) y la fuerza con la que están interactuando entre sí. Se ha considerado que el acoplamiento jerárquico es un mecanismo relevante que permite mantener el orden temporal interno, que incrementa las posibilidades de que funciones individuales que poseen diferentes fases logren adquirir un ajuste adaptativo; también asegurando el orden temporal de osciladores de jerarquías inferiores (Pittendrigh, 1973).

Mientras que en el *acoplamiento mutuo* los relojes biológicos mantienen una interacción bidireccional entre los relojes. Lo cual implica que estos comparten el mismo periodo, el cual es intermedio de sus propios periodos. Este tipo de acoplamiento va a asegurar que exista una mayor estabilidad en la frecuencia del sistema, en comparación con la que pueda ser mantenida por cualquiera de sus componentes individualmente (Pittendrigh, 1973). Se ha encontrado que dos

osciladores circadianos independientes distribuidos bilateralmente en el sistema nervioso central son capaces de establecer de forma inmediata este tipo de acoplamiento mutuo (Nishiitsutsuji-Uwo y Pittendrigh, 1968).

Un ejemplo de este tipo de acoplamiento es lo observado en estudios de cucarachas, organismos que poseen dos marcapaso diferentes, cada uno localizado en cada lóbulo óptico. Se ha observado que cuando se hace variar de forma independiente una de las entidades oscilatorias, produce una rápida pérdida de la periodicidad en el sistema (Nishiitsutsuji-Uwo y Pittendrigh, 1968).

Tomando en consideración las observaciones realizadas por Hoffman (1971) y el patrón bimodal que exhiben un gran número de organismos a nivel conductual, se sugiere que el marcapaso circadiano de hámsters que dirige el ritmo de actividad está constituido por dos osciladores distintos (Pittendrigh, 1973). Este patrón bimodal se refiere al evidente incremento de acumulación de actividad durante la noche temprana (N) y la que se observa antes del amanecer (M), cuya intensidad es menor a la primera. Cada uno de estos componentes (M y N) son generados por un oscilador independiente (Fig. 10). En donde el periodo total de actividad esta dirigido por la relación de fase entre M y N , además cuando τ_M y τ_N se encuentran lo suficientemente cerca estos pueden acoplarse mutuamente y compartir la misma frecuencia. Si el periodo del sistema acoplado (τ_a) cambia ligeramente, la relación de fase de los osciladores acoplados también va a cambiar, ya que τ_a es una función de τ_M/τ_N .

Un factor que puede afectar este tipo de acoplamiento es la intensidad de la luz, en donde intensidades altas producen fallos en el acoplamiento y uno de los osciladores (N en el caso del Hámster) transitoriamente comienza a oscilar espontáneamente con una frecuencia alta, hasta que nuevamente puede lograr acoplarse con M con 180° de diferencia (Fig. 10), a este estado se le conoce como metaestable (Pittendrigh, 1973).

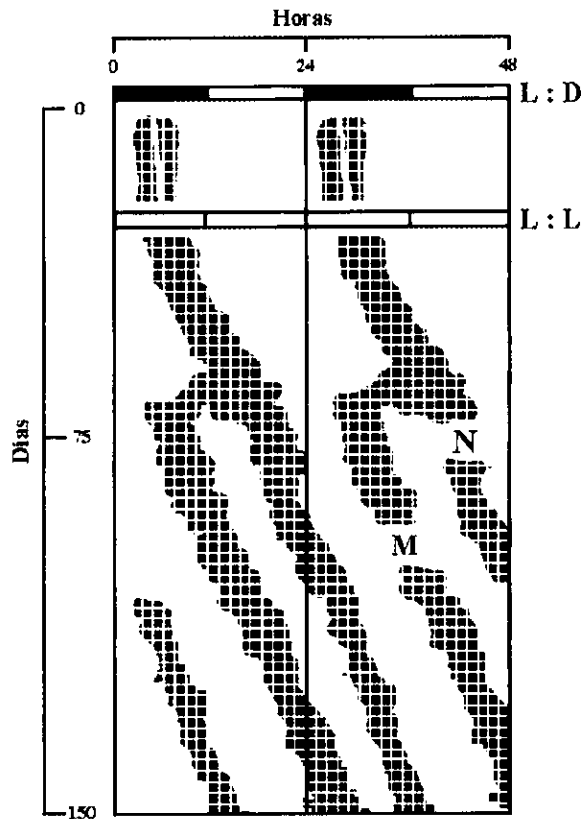


Fig.10.- Modelo de splitting de osciladores circadianos en hámsters, elaborado por Pittendrigh (1973).

Con base a los tipos de acoplamiento anteriormente mencionados cabe hacer varias distinciones entre los modelos propuestos para el caso de la *Drosophila* y el *hámster*. [1] En el caso de la mosca se trata de un acoplamiento jerárquico en donde el marcapaso *A* dirige a *B*, mientras que en hámsters el acoplamiento de *M* y *N* es mutuo, es decir, existe una interacción bidireccional entre ambos osciladores. [2] En el primer caso por tratarse de un acoplamiento jerárquico *A* impone su τ a *B*, mientras que para el segundo caso, ambos osciladores pueden compartir el mismo periodo que resulta de la interacción de los periodos de cada oscilador. Uno de los efectos más claros que evidencian la pérdida de la relación de fase normal entre los componentes del sistema multioscilariorio, son las alteraciones observadas en la expresión de ritmos durante el desarrollo y la longevidad de los

organismos, la cual se atribuye principalmente a la pérdida del orden temporal interno del organismo. En estos se propone que los osciladores difieren en sus frecuencias en oscilación espontánea y que sufren notorios cambios en la fuerza con la que se encuentran jerárquica y/o mutuamente acoplados lo cual afecta la relación de fase entre los diferentes relojes biológicos. Por lo que en el envejecimiento, el sistema esta dirigido por osciladores cuyas frecuencias son diferentes (Pittendrigh, 1960).

Neuroanatomía Funcional del Sistema Circádico

[A] El Marcapaso Sincronizable a la Luz de Mamíferos

A principios de los setentas se comprobó que el *núcleo supraquiasmático del hipotálamo* (NSQ) es el principal oscilador circadiano de mamíferos. Esto fue corroborado mediante diferentes aproximaciones experimentales, entre estas, [1] lesiones bilaterales de NSQ abolen la ocurrencia rítmica de diferentes parámetros, tales como el ritmo de ingesta de agua (Stephan y Zucker, 1972), la actividad locomotora (Stephan y Zucker, 1972), la secreción de corticoesteroides (Moore y Eichler, 1972) y el ciclo sueño-vigilia (Ibuka y Kawamura, 1975); [2] Así mismo se ha descrito que la eliminación de NSQ en neonatos de rata abaten de por vida los ritmos de actividad locomotora e ingesta de agua (Mosco y Moore, 1978). [3] Por otra parte la estimulación eléctrica del NSQ, altera la fase de los ritmos circadianos causando retrasos o avances dependiendo de la hora de estimulación (Rusak y Gross, 1982). [4] En estudios realizados *in vivo* e *in vitro* tanto de la actividad eléctrica, como de la actividad metabólica de las células del NSQ, se ha observado que estas exhiben ritmicidad circadiana aún en ausencia de información rítmica del medio ambiente (Shibata et al. 1982; Schwartz y Gainer, 1977). [5] Así mismo se ha

inducido la recuperación funcional de diversos parámetros rítmicos mediante trasplantes de NSQ fetal a animales arrítmicos por eliminación previa de NSQ (Druker-Colín y et. al. 1984; Aguilar-Roblero et. al. 1986; 1992; 1994).

[B] Osciladores Circadianos Múltiples

Existen un gran número de evidencias experimentales que confirman que los organismos multicelulares poseen múltiples osciladores circadianos, los cuales se encuentran interconectados entre sí, de tal forma que estos conforman un sistema circadiano jerárquico que regula diversos efectores discretos y rítmicos. En mamíferos el NSQ contiene osciladores circádicos autosostenidos (Welsh et al. 1995; Zhang y Aguilar-Roblero, 1995) que actúan como marcapaso en la cúspide de la jerarquía.

Una de estas evidencias experimentales es la *persistencia de diferentes parámetros rítmicos* aún cuando se lesiona el principal marcapaso circadiano de mamíferos (NSQ) tales como: el ritmo de cortisol en monos *rhesus* (Reppert et. al. 1981); el ritmo de temperatura corporal en monos araña por lesión de NSQ mientras que el de ingesta de alimento se abate (Fuller et. al. 1981; Albers et. al. 1984); en ratas persisten los ritmos de temperatura corporal (Satinoff y Prosser, 1988) y la actividad anticipatoria al alimento (Krieger et. al. 1974; Stephan, 1992) entre otros. Estos estudios evidencian que diferentes ritmos circadianos dependen de distintos osciladores circadianos (Rosenwasser y Adler, 1985).

Recientemente ha sido demostrado que un número sorprendente de tejidos periféricos exhiben oscilaciones circadianas. Yamazaki et al. (2000) estudiaron la organización del sistema circadiano de mamíferos en una cepa de ratas transgénicas, en estas la luciferasa era rítmicamente expresada ya que se encontraba bajo el control del promotor del gen reloj *mPer1*, en este estudio midieron la emisión de luz de rebanadas de NSQ, así como de tejidos periféricos tales como el hígado, pulmones y músculo esquelético. En esta cepa de ratas transgénicas encontraron

que la emisión de luz del NSQ *in vitro* mostraba oscilaciones rítmicas robustas, que persistían por más de 32 ciclos. Mientras que el hígado, el pulmón y el músculo esquelético *in vitro*, también exhibían ritmicidad, pero este se atenuaba después de 2 a 7 ciclos. En este mismo estudio, también estudiaron las respuestas de fase adelantando o retrasando el ciclo ambiental, con lo que encontraron que el ritmo circádico de emisión de luz del NSQ cambiaba más rápidamente que el ritmo de actividad locomotora y que los ritmos expresados en los tejidos periféricos. Este estudio sugiere que el NSQ cumple la función de un marcapaso circadiano autosostenido, que existen osciladores circadianos periféricos y que en ausencia del NSQ la ritmicidad expresada por estos se ve atenuada. Además, es claro en este estudio que el NSQ impone la fase a los osciladores circádicos periféricos para de esta forma mantener un control de fase adaptativo.

Por otra parte, se sabe que el NSQ se encuentra más de un oscilador, estudios de *rebanadas* de NSQ muestran que el patrón temporal de la actividad eléctrica de cada NSQ es asimétrica (Zhang y Aguilar-Roblero, 1995), lo que sugiere que cada núcleo funciona como oscilador independiente. Welsh et al. (1995) demostraron en cultivos disociados que cada neurona del NSQ exhibe ritmicidad circadiana con periodo y fase propios. Por otra parte, mediante el estudio de cultivos organotípicos del NSQ se han descrito variaciones circadianas independientes en el contenido del *péptido vasoactivo intestinal* y la *vasopresina* en el medio de cultivo (Shinohara et al. 1995).

[C] Organización del NSQ

Situado en el hipotálamo anteroventral se distinguen un par de grupos celulares, los cuales se sitúan dorsalmente a la parte caudal del quiasma óptico y rostral a las comisuras supraópticas. Estos núcleos están compuestos de aproximadamente 10,000 células de pequeñas dimensiones a cada lado de la línea

media del borde basal del III ventrículo (Van den Pol, 1980). Existen marcadas diferencias interespecíficas en cuanto a la forma y la geometría precisa del NSQ, en el caso de la rata el NSQ tiene un aspecto alargado con 950 μm en dirección rostro-caudal, 425 μm en dirección centro-lateral y 400 μm en dirección ventro-dorsal (Albers et. al. 1991). Las células de pequeñas dimensiones que comprenden el NSQ, en la rata su diámetro medio es de 7.8 μm y de las células laterales es de 9.6 μm (Guldner, 1976; Van den Pol, 1980).

El NSQ esta constituido primordialmente por cinco tipos de neuronas: *a)* bipolares simples con dos dendritas, *b)* monopolares, *c)* bipolares-rizadas con dos dendritas complejas, *d)* multipolares radiales con tres o cinco dendritas primarias y *e)* neuronas espinosas de soma redondo y dendritas variadas (Van den Pol, 1980).

Así mismo, el NSQ también esta compuesto de células gliales tipo astrogía, cuyo cuerpo celular tiene las mismas dimensiones que las neuronas y presentan de cinco a quince procesos, en los que en algunos casos presentan uniones tipo comunicantes con vasos sanguíneos (Moore, 1983).

Con base en características inmunohistoquímicas y estructurales, el NSQ se divide en dos regiones principales (Van den Pol, 1980; Card, 1981): pequeñas neuronas bipolares densamente empaquetadas conforman la *región dorsomedial*, con escasas ramificaciones dendríticas y en su mayoría las neuronas que contienen *vasopresina (VP)*. Mientras que neuronas multipolares de mayor tamaño se encuentran en la *región ventrolateral*, población neuronal se distingue por contener en su mayoría el *polipéptido vasoactivo intestinal (VIP)*. Se sabe que ambas subdivisiones contienen otros neurotransmisores co-localizados, tales como el *ácido gamma amino butírico* (Aguilar-Roblero et al. 1993c), *neurofísina*, *bombesina*, *péptido liberador de la gastrina* (Van den Pol, 1980; Van den Pol y Tsujimoto, 1985; Miller et. al. 1996) y *somatostantina* (Moore 1983).

[D] Vías Aferentes

Desde el punto de vista anatómico y funcional la aferencia mejor caracterizada hacia el NSQ es la que proviene de la retina. De hecho la demostración del tracto que se origina en la retina llevó a la identificación del NSQ como marcapaso circadiano, y en la actualidad se sabe que dicho tracto es esencial para que se lleve a cabo la sincronización a la luz de la actividad circadiana de las neuronas del NSQ (Moore, 1996).

La información sobre los cambios de iluminación ambiental se sabe que llega al NSQ por medio de dos principales vías:

- ◆ Por medio de una vía directa (Fig. 11) que se origina en un subgrupo de células ganglionares de la retina -CGR- (Leak y Moore, 1994). Estas CGR proyectan sus axones a través del nervio óptico al quiasma óptico hasta alcanzar la región ventrolateral del NSQ y en menor grado a la porción dorsomedial de este mismo núcleo (Moore et. al. 1971; Henrickson et. al 1988; Moore y Leen, 1972). Esta vía que se origina en la retina se le conoce como *tracto retino-hipotalámico (TRH)*. En este tracto se ha descrito que participan diferentes transmisores, entre estos se encuentra el *glutamato (glu)* y la *sustancia P* (Ganon y Rea, 1993).
- ◆ Se sabe que las proyecciones de TRH son suficientes para mantener la sincronización, lesiones de este tracto impiden que el reloj circadiano ajuste su fase a ciclos de iluminación impuestos, lo que también indica que este tracto es indispensable para preservar el proceso de sincronización (Johnson et. al. 1988). Por otra parte se ha determinado que estas proyecciones que provienen de la retina son totalmente independientes a las vías clásicas que participan en la percepción visual.
- ◆ Se han identificado colaterales del TRH (Fig. 11) que se proyectan de forma bilateral a la *Hojuela Intergeniculada (IGL)*, la cual forma parte

del complejo geniculado lateral del tálamo (Hickey y Spear, 1976). A partir de la IGL se origina una segunda vía indirecta hacia el NSQ denominada el *Tracto Geniculo Hipotalámico (TGH)*, cuyas proyecciones se encuentran sobrepuestas con las que provienen del TRH en el NSQ ventrolateral. Los transmisores que participan en el TGH son el *neuropéptido Y (NPY)* (Moore et. al. 1984) y el *GABA* (Moore y Speh, 1993; Moore y Card, 1994; Aguilar-Roblero et a. 1993c).

También se ha descrito la presencia de *aferencias serotoninérgicas* (Fig. 11) provenientes del *rafe medial* inervan el NSQ (Meyer-Bernstein et. al. 1996), las cuales son coextensivas con las aferencias visuales, de hecho se sabe que estas hacen sinapsis sobre neuronas VIPérgicas (Bosler y Beaudet, 1985). Evidencias experimentales sugieren que la serotonina actúa en el NSQ modulando la actividad de las aferencias de la retina (Morin, 1994).

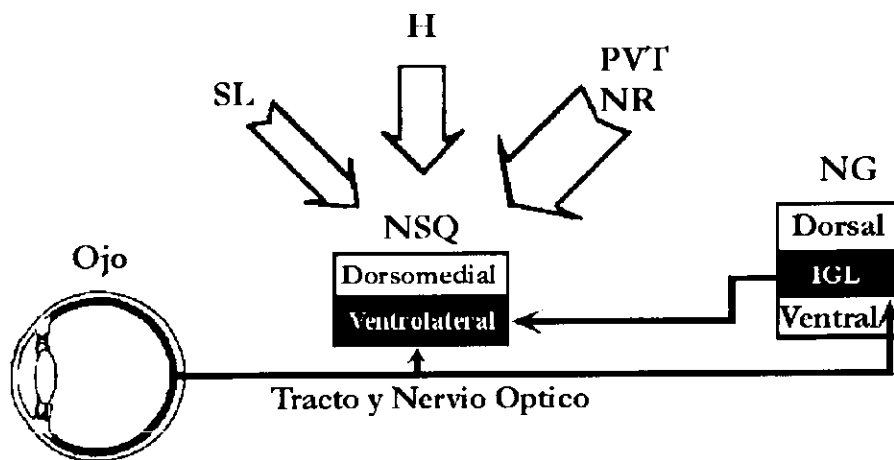


Fig. 11.- Las Principales vías aferentes al Núcleo Supraquiasmático del Hipotálamo (NSQ) provienen de la retina, septum lateral (SL), hipotálamo (H), núcleo paraventricular talámico (PVI), núcleos del rafe (NR) y del núcleo geniculado (NG) específicamente de la hojuela intergeniculada (IGL), para mayor detalles ver texto.

Así mismo se han identificado proyecciones hipotalámicas (Fig. 11) que incluyen el *área preóptica* (Swanson, 1976), *núcleo arcuato*, *núcleos ventromedial y dorsomedial* (Meibach y Siegel, 1977; Zaborsky y Matcara, 1979), *núcleo propio de la estría terminalis*, *núcleo hipotalámico lateral y caudal* (Card, 1999).

También existen proyecciones extra-hipotalámicas tales como: el *núcleo septal lateral*, *pretectum*, *zona incerta*, *subiculum ventral*, *corteza infralímbica* (Moore, 1996a; Card, 1999), así como del *núcleo paraventricular talámico* (Moga et. al. 1995) el cual presenta en su región rostral una densa concentración de sitios de unión a melatonina, por lo que se sugiere que este también participa en la sincronización de los ritmos circadianos (Weaver et. al. 1989).

[E] Vías Eferentes

De los estudios realizados sobre las eferencias del NSQ surgen tres puntos importantes: *i)* el NSQ proyecta a un grupo restringido de estructuras, principalmente al hipotálamo que lo rodea; *ii)* las áreas particulares que reciben una densa inervación pueden servir como relevos para la distribución de la información temporal que se origina en el NSQ; *iii)* con excepción de las conexiones comisurales, las eferencias de cada núcleo son predominantemente ipsilaterales (Card, 1999).

De acuerdo con Watts et. al. (1991) las eferencias del NSQ pueden ser divididas en seis grupos generales (Fig.12):

- ◆ *Área preóptica*, la relevancia de estas proyecciones radica en el hecho de que esta área hipotalámica contiene grupos celulares involucrados en la regulación del sueño, reproducción, homeostasis de fluidos y termorregulación (Watts et. al. 1991; Card, 1999).
- ◆ *Zona Subparaventricular* se estiman que estas eferencias constituyen las tres cuartas partes de todas las eferencias del NSQ (Watts et. al.

1991). Se sabe que el NSQ influye en la liberación de melatonina de la pineal y evidencias señalan que en esta vía multisináptica involucra el núcleo paraventricular hipotalámico (Moore, 1996b). De la misma forma se plantea que la zona subparaventricular tiene un importante papel en el control de los ritmos circadianos (Card, 1999).

❖ **Núcleo Dorsomedial del Hipotálamo** que a su vez da origen a una densa y compleja inervación intrahipotalámica, así como proyecciones al tallo cerebral y telencéfalo (Takeuchi et. al. 1992) por lo que se considera que por medio de esta el NSQ tiene influencia sobre una gran variedad de sistemas. Se sugiere que esta media los efectos del NSQ sobre el ritmo de corticosteroides plasmáticos (Card, 1999), así como la liberación rítmica de otras hormonas con un patrón circadiano (Buijs, 1996).

❖ **Conexiones comisurales** entre los dos NSQ, en la actualidad se posee poca información al respecto por lo que la organización de las proyecciones requieren ser establecidas con claridad (Buijs et. al. 1994; Picard y Silverman 1981). Estas conexiones sugieren una forma manera en que la actividad de los dos núcleos supraquiasmáticos sea integrada para que pueda llevarse a cabo el control de la función circadiana (Card, 1999).

Así mismo, se han descrito proyecciones prominentes hacia el núcleo paraventricular talámico, el núcleo geniculado lateral y hojuela intergeniculada (Card y Moore, 1989; Moore y Card, 1994), se sugiere que dichas proyecciones participan en la modulación de la actividad motora (Berendse et. al. 1988; Jonhson et. al. 1988).

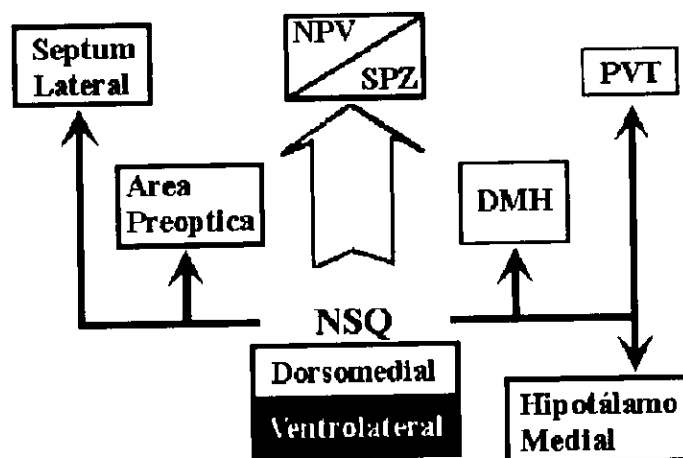


Fig. 12.- El Núcleo Supraquiasmático (NSQ) posee eferencias a diferentes núcleos hipotálamicos, tales como el núcleo paraventricular (NPV), el núcleo dorsomedial (DMH) y el hipotálamo medial, la zona subparaventricular (SPZ), el área preóptica. También posee eferencias extrahipotalámicas como el septum lateral, el núcleo paraventricular talámico (PVT) y el núcleo geniculado, para mayor detalles ver texto.

La Glándula Pineal como Integrador de Fase

A diferencia de aves y reptiles, la glándula pineal de mamíferos no participa en la generación de la ritmicidad circadiana (Finkelstein et al. 1978; Kincl et al. 1970; Gwinner et al. 1987; Takahashi y Menaker, 1979; Underwood y Goldman, 1987). Evidencias experimentales sugieren que en mamíferos la pineal esta involucrada en las respuestas al fotoperiodo (Goldman, 1983; Goldman y Darrow, 1983; Underwood y Goldman, 1987), así como en el acoplamiento temporal materno-fetal durante el embarazo (Davis y Mannion, 1988; Reppert y Weaver, 1989; Stetson et al. 1986).

Al parecer estas funciones están mediadas por medio de un tracto multisináptico en la que participa la retina, el NSQ y que termina en la glándula pineal a través de fibras noradrenérgicas provenientes del ganglio cervical superior (Moore, 1978). Las señales temporales de la pineal son transmitidas humoralmente

a estructuras blanco específicas mediante la secreción de *melatonina* (*Mel*) y posiblemente otros neuropéptidos (Reiter, 1980a; 1980b).

Se ha descrito que el NSQ de mamíferos posee receptores a *Mel* (Reppert et al. 1988; Vanecek et al. 1987; Weaver et al. 1989). Además se sabe que administración diaria de *Mel* produce un decremento en la actividad metabólica del NSQ durante la noche subjetiva (Cassone et al. 1988) e induce cambios de fase en la actividad eléctrica del NSQ *in vitro* (McArthur et al. 1991).

Mediante la administración diaria de *Mel* es posible sincronizar de diferentes ritmos conductuales en animales intactos en oscilación espontánea (Cassone et al. 1986a, Redman et al. 1982), así como también en hámsters previamente lesionados y con transplantes de NSQ fetal (Romero y Silver, 1889). Por otra parte los efectos sincronizadores de la *Mel* son abolidos mediante lesiones del NSQ (Cassone et al. 1986b).

Se sabe que la exposición a luz brillante inhibe la función de la pineal en diferentes especies, esto se manifiesta con una marcada reducción en la síntesis y secreción de la *Mel* (Illnerova et al. 1983; Klein y Weller, 1972; Zats, 1979) e inhibición de la actividad eléctrica de la pineal (Reus, 1987). También se ha estudiado el efecto de la luz brillante constante en la expresión de los ritmos circadianos a nivel conductual en roedores nocturnos, y se sabe que esta produce la partición del ritmo (Hoffman, 1971; Morin, 1988; Puchalski y Lynch, 1991), por lo que se ha sugerido que la inhibición de la glándula pineal por luz brillante puede estar de alguna forma involucrada en el fenómeno de partición del ritmo (Aguilar-Roblero y Vega-González, 1993).

En nuestro laboratorio se ha examinado la participación de la pineal en el fenómeno de partición del ritmo o splitting (Aguilar-Roblero y Vega-González, 1993), pregunta que se abordó estudiando el efecto de la pinealectomía en el curso temporal de la aparición del fenómeno de partición del ritmo de rueda de actividad

en hámsters. En estos estudios se encontró que la pinealectomía facilita la aparición del fenómeno de partición, acortando la latencia de inicio de los transitorios de la partición y alargando la duración de los transitorios antes del establecimiento del estado meta-estable durante la partición del ritmo.

C. S. Pittendrigh (1974) sugiere que la partición del ritmo ocurre cuando disminuye la interacción (o fuerza de acoplamiento) entre los diferentes osciladores, siendo que la fuerza de acoplamiento es en función de la relación de fase entre los distintos osciladores. Con base en las observaciones realizadas en hámsters pinealectomizados, se sugiere que la pinealectomía decrementa la fuerza de acoplamiento entre osciladores, esto puede deberse a (1) un incremento en la sensibilidad del sistema a la luz , o bien (2) a que fue eliminada la señal de comunicación interna de los diferentes osciladores endógenos. Por tal motivo, se sugiere que la pineal puede participar dentro del sistema circadiano como un integrador de fase de los diferentes osciladores circadianos que conforman el sistema (Aguilar-Roblero y Vega-González, 1993).

Mecanismos Celulares del Marcapaso Sincronizable a la Luz

En la actualidad no se conocen con precisión los mecanismos que participan en la sincronización del marcapaso a los ciclos L:O en mamíferos. Sin embargo, mediante el empleo del modelo de sincronización no paramétrica por pulsos de luz han sido dilucidados parte de los mecanismos de señalización intracelulares que ocurren dentro del NSQ de roedores.

Mediante esta estrategia, han sido identificadas dos vías de señalización intracelular las cuales se encuentran reguladas en el tiempo y que determinan la direccionalidad a los cambios de fase. En otras palabras, la activación de las vías

está restringida a ciertas fases del ciclo, en específico en aquellas en donde este marcapaso es susceptible a cambiar su fase por pulsos de luz y de acuerdo a que vía sea activada el marcapaso expresa avances o retrasos de fase (Gillette, 1996, Gillette y Tischkau, 1999). Un factor común entre ambas vías de señalización, es el primer evento de la cascada en la que el *glu* es liberado por las terminales del TRH (Fig. 13). De hecho ha sido constatado que el NSQ posee varias formas de receptores ionotrópicos a *glu* (Hastings et. al. 1996).

La primera vía de señalización (Fig. 13) es activada por la administración de pulsos de luz durante el inicio de la noche subjetiva, como resultado de la activación de esta vía el marcapaso circadiano exhibe retrasos de fase. El procesamiento de la información fótica se inicia con la activación de los receptores tipo NMDA del NSQ, provocando un incremento en el flujo de entrada de *calcio* (Ca^{2+}) (Bading et. al. 1993), lo que a su vez tiene como consecuencia de la liberación de *calcio intracelular* (Ca^{2+}) mediante el mecanismo conocido como liberación de calcio inducida por Ca^{2+} . El aumento de Ca^{2+} , produce la activación de los genes de expresión temprana.

Se ha corroborado la participación del Ca^{2+} en la generación de los retrasos en estudios *in vitro*, en donde la aplicación de *Tapsigarina* (fármaco que actúa depletando el Ca^{2+} de los reservorios por bloqueo de la ATPasa requerida para repletar el retículo sarcoplásmico) lo cual bloquea completamente los retrasos de fase en la actividad eléctrica del NSQ inducidos por *glu* y tiene pocos efectos en los avances de fase (Ding et al. 1998). De forma más específica se ha encontrado que el receptor de *Rianodina* (*RyR*) está presente en el NSQ (Díaz-Muñoz et al. 1999) y además se sabe que participa en esta vía, ya que en experimentos *in vitro* en los que se administran antagonistas de este receptor, como es el caso del *Dantroleno* se ha encontrado que bloquean los cambios de fase inducidos por *glu* (Ding et al. 1998),

por lo que se sugiere que la activación de RyR contribuye a dar la dirección en el cambio de fase expresado por el marcapaso (Ding et. al. 1998).

Queda aún por dilucidar los demás elementos que participan en esta vía, que llevan a la expresión de los genes de expresión temprana (*GER*), a los genes de expresión tardía (*GET*) o a los genes reloj (*GR*), los cuales también se sabe que son regulados en el tiempo y cuya expresión se encuentra relacionada a los mecanismos de ajuste de fase del marcapaso circadiano.

La segunda vía de señalización (Fig. 13) está involucrada en la generación de avances de fase del marcapaso circadiano y es activada por la administración de pulsos de luz exclusivamente durante la noche subjetiva tardía. Esta vía también involucra la activación de los receptores NMDA por *glu*, que produce a su vez el influjo de Ca^{2+} , el cual se une a la **Calmodulina (CaM)** y activan la **Oxido Nítrico Sintetasa (ONS)**, lo que va a producir el movimiento intercelular de **Oxido Nítrico (ON)**, señal gaseosa parácrina que se difunde libremente fuera de la célula que lo sintetiza, a células circundantes (Brendt y Snyder, 1992).

Una vez activada la *ONS* e incrementados los niveles de *ON*, se ha propuesto que también se activa a la **Guanidil ciclasa (GC)** por lo que los niveles de *cGMP* aumentan, dicho aumento induce la activación de la **Proteína Quinasa dependiente de cGMP (PKG)**. En experimentos *in vitro* los cambios de fase inducidos por pulsos de luz o por *glu* son bloqueados por la administración de inhibidores de la *PKG* (tal como el *KT5823*). Estos efectos no son observados cuando los inhibidores son administrados durante la noche subjetiva temprana, es decir, cuando se inducen retrasos de fase (Ding et. al. 1998).

En esta vía también queda aún por dilucidar los demás elementos que participan, ya que se sabe que la expresión de los *GER*, los *GET* y los *GR* se encuentran íntimamente relacionados a los mecanismos de ajuste de fase del marcapaso circadiano.

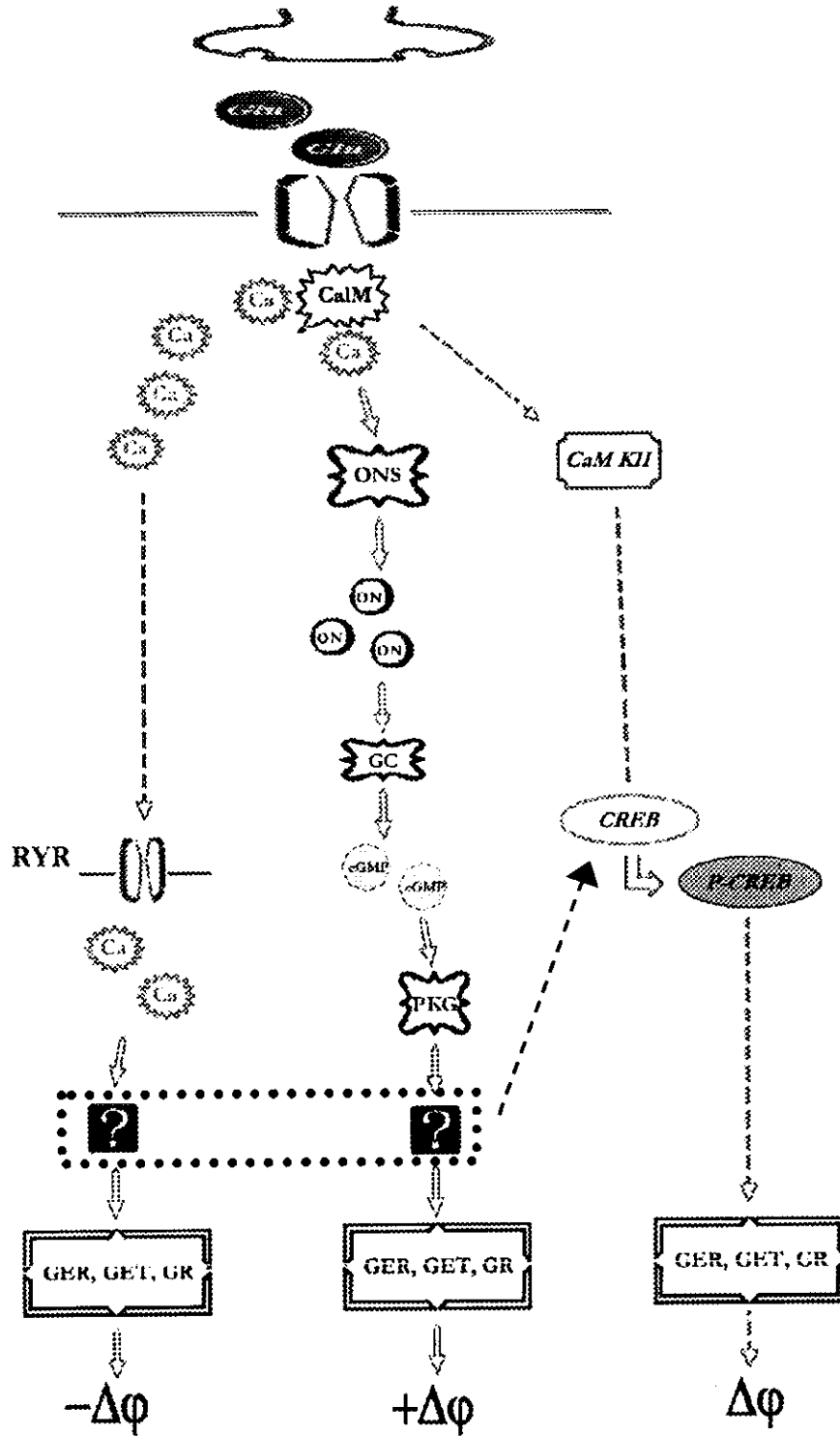


Fig. 13.- Resumen de las principales vías de señalización que tienen lugar durante la noche subjetiva, para mayor detalle ver texto.

Aparentemente, estas dos vías de señalización convergen en otro punto común (Fig. 13), en el que el *Elemento de Respuesta de la Proteína de Unión Ca²⁺/cAMP (CREB)* es fosforilado en la serina¹³³ (Hunter, 1995). Además, se sabe que la activación de los receptores *NMDA*, el subsecuente flujo de entrada de *Ca²⁺* y la activación de la *CaM*, puede activar a la *Proteína Quinasa* dependiente de *Calmodulina Tipo II (CaMKII)*, la cual fosforila y activa al *CREB* (Ginty et al. 1993).

Se ha encontrado que pulsos de luz, *glu* y *NO* inducen la fosforilación de *CREB* y la formación de la *serina¹³³ fosfo-CREB (P-CREB)* únicamente cuando se aplican durante la noche subjetiva, a pesar que los niveles de *CREB* no varían a lo largo del ciclo circadiano (Ginty et al. 1993; Ding et al. 1995). De hecho la aplicación de *KN-62*, inhibidor de la *CAMKII*, bloquea los cambios de fase inducidos por pulsos de luz a nivel conductual (Golombek y Ralph, 1994). Por lo que también se ha sugerido que la compuerta que proporciona la direccionalidad de los cambios de fase es previo a la activación de *CREB*.

A nivel molecular han sido identificados 6 genes de respuesta rápida que son inducidos por pulsos breves de luz, los cuales son: *c-fos*, *fos-B*, *jun-B*, *Zif 268* (o *NGFI-A*), *nur-77 (NGFI-B)* y *egr-3*. La inducción de estos genes por pulsos de luz depende de la fase en la que es aplicado el estímulo, además su expresión se presenta de forma específica en la región ventrolateral del NSQ.

De los genes de expresión temprana el que ha sido ampliamente estudiado es *c-fos*. Se sabe que la aplicación de pulsos de luz induce incrementos en la expresión de *c-fos* en el NSQ. Además, dicha inducción de la expresión muestra una estrecha relación con la fase en la que se aplica el estímulo fótico y se correlaciona con las características dinámicas de la CRF (Rusak et al. 1990; Kornhauser et al. 1992; Caldelas et al. 1998). Se han realizado estudios en los que simultáneamente a la aplicación de estímulos fóticos son administrados bloqueadores no competitivos

de los receptores tipo *NMDA* (*MK801*), en estos experimentos se ha encontrado que el bloqueo de estos receptores producen marcados decrementos en el número de células inmunoreactivas a *c-Fos* en el NSQ (Rea et al. 1993) y además también son inhibidos los cambios de fase conductuales (Colwell et al. 1990). Con base en un gran número de evidencias (para mayor detalle ver Hastings et. al 1996; Kornhauser et. al. 1996) se sugiere que la inducción de estos genes de expresión temprana son un paso intermedio en la vía de señalización que media la sincronización del marcapaso a los ciclos L:O (Fibling et. al. 1991; Morris et. al. 1998).

Así mismo, se han identificado en mamíferos (ratones) un grupo de genes homólogos al gen *per* de la *Drosophila*, a los cuales se les conoce como *mper1*, *mper2* y *mper3*. Estos genes muestran una clara ritmicidad circadiana (Albrecht et al. 1997; Shaerman et al. 1997; Sun et al. 1997, Tei et al. 1997) exhibiendo sus máximos niveles de mRNA durante el día subjetivo entre CT 06 y CT 09, y durante la noche subjetiva muestran sus niveles más bajos entre CT 15 y CT 21. La aplicación de pulsos de luz de 15 minutos de duración inducen un rápido y transitorio incremento en los niveles de mRNA de *mper1* (Shigeyoshi et. al. 1997, Zylka et al. 1998), tanto en la zona de retrasos como de avances de fase (CT14 y CT23 respectivamente). Mientras que *mper2* es predominantemente inducido durante las primeras horas de la noche subjetiva, es decir en la zona de retrasos de fase (Zylka et al. 1998), por lo que se ha sugerido que *mPer1* y *mPer2* además de participar en los mecanismos de reloj, también se encuentran involucrados en los mecanismos de sincronización fótica del marcapaso circadiano de mamíferos. En el caso de *mper3* se ha encontrado que este no responde a la luz (Shigeyoshi et. al. 1997, Zylka et al. 1998), por lo que se ha sugerido que *mper3* al parecer contribuye a las funciones del marcapaso del NSQ (Takumi et. al. 1998).

Transplantes de Tejido Fetal

Durante el siglo XX el uso de transplantes intracerebrales prosperó como un poderoso método para el estudio del desarrollo y plasticidad del sistema nervioso central (Le Gros Clark, 1942; Ranson, 1909; Sugar y Gerard 1940; Tello 1911). En la actualidad el uso de esta aproximación experimental ha proliferado, enfocado al entendimiento de las interacciones anatómicas y funcionales entre sistemas neurales y la reparación o reconstrucción de regiones del sistema nervioso central (SNC) lesionadas (Björklund y Stenevi, 1979).

Gran cantidad de estudios se avocaron a la identificación de los parámetros que influyen en la supervivencia y funcionamiento del tejido cerebral transplantado, entre estos se encuentran:

Edad del donador, el tejido nervioso transplantado muestra una óptima supervivencia si este proviene de tejido embrionario o bien si se deriva de tejido en algún estado activo de neurogénesis (Stenevi et al. 1976). El desarrollo del tejido neural es heterocrónico en todo el SNC, por lo que el momento óptimo para obtener el tejido a transplantar es específico al sitio de interés.

Edad del hospedero, Hallas et al. (1980) encontraron que la supervivencia neural en el transplante era similar en hospederos neonatos (ratas 10 días) que en adultos (ratas de 180 días). Solo en hospederos viejos la viabilidad del transplante muestra deficiencias, cuando el hospedero es mayor al 80% del tiempo de vida (Crutcher, 1990). En forma predominante su crecimiento se ve comprometido, afectando el crecimiento de neuritas (Gage et al. 1981), así como también una disminución en el número de células dentro del transplante (Crutcher, 1990).

La Vascularización del transplante, es otro de los factores que contribuyen a la supervivencia exitosa del tejido implantado. Se ha observado que cuando el tejido implantado se encuentra adyacente a la fisura coroidea, este muestra una rápida y eficiente vascularización (Dunn, 1917; Stenevi et al. 1976; Krom y

Rosenstein, 1988). Además se ha encontrado que hay una directa correlación entre el tamaño del trasplante y la vascularización dentro de este, en donde los trasplantes más grandes contienen mayor vasos sanguíneos (L'inger y Dunett 1989; Kromer et al. 1979).

Factores inmunológicos, se considera al cerebro como un sitio “inmunológicamente privilegiado” o una área que es menos susceptible inducir respuestas del sistema inmune. Esto se basa en estudios realizados en la sobrevivencia del trasplante dentro de cerebros hospederos inmunizados, en los que se observó que las respuestas inmunes en el SNC son menos vigorosas que en la periferia, esto no se refiere a una ausencia de respuesta inmune dentro del SNC, sino a un retraso en la respuesta del sistema inmune al tejido implantado en el cerebro, ya que estas son dependientes del origen del tejido donado (Medawar, 1948).

Se sabe que bajo condiciones adecuadas, los trasplantes de tejido nervioso son capaces de sobrevivir por periodos largos, en comparación de sitios periféricos. De hecho, el trasplante parece integrarse en el parénquima del hospedero (Winder y Brundin, 1988). Lo cual no implica que la reacción inmune no tenga lugar, ni tampoco que un tejido inmunológicamente incompatible tenga una supervivencia permanente. Este fenómeno en el que se evita el reconocimiento del trasplante en forma total o parcial se le denomina *restricción inmunológica* (Barker y Billingham, 1977). Se ha propuesto que este fenómeno puede ser facilitado por una deficiencia para detectar la presencia de antígenos ajenos al organismo y a la disminución de macrófagos. Se sabe que la presencia de la barrera hemato-encefálica no es fundamental, debido a que la mayoría de las técnicas desarrolladas involucran la ruptura de la misma en el área circundante al trasplante. Sin embargo, estos trasplantes sobreviven de forma adecuada (Rosenstein, 1987). Además se ha reportado que trasplantes intracerebrales de tejido nervioso parecen no

sensibilizar al sistema inmune del huésped. No obstante, si un transplante de piel se realiza antes que el de tejido nervioso, el sistema es sensibilizado y el rechazo del tejido nervioso es inmediato; lo cual sugiere que a pesar de la capacidad del sistema inmune para provocar el rechazo del transplante, este sistema carece de la capacidad de identificar los antígenos presentes en el implante (Wikstrand y Bigner, 1980).

[A] Aspectos Funcionales de los Transplantes

Tello (1911), así como Ramón y Cajal (1928) fueron los pioneros en utilizar secciones de nervios periféricos como “puentes” para promover la regeneración axonal. En la actualidad esta estrategia experimental ha sido retomada, se ha aplicado con un gran número de estructuras cerebrales con la finalidad de establecer los beneficios del uso de esta estrategia en diferentes padecimientos, en la Tabla 1 se hace un breve resumen de algunos de estos.

Con base a todo lo anteriormente mencionado, sabemos que los transplantes de tejido fetal poseen la capacidad para desarrollarse en nuevos ambientes, además estos se integran en el tejido hospedero, que también poseen factores tróficos y funcionales que promueven la regeneración funcional posterior a un daño cerebral previo (Björklund, 1991). Por tales motivos se ha recurrido a esta estrategia con la finalidad de promover la recuperación de funciones alteradas por lesiones o deficiencias congénitas en el SNC.

Se han propuesto dos mecanismos básicos a través de los cuales es posible la interacción entre el transplante y el cerebro hospedero. El primero de ellos se basa en el hecho de que en ciertas patologías la administración periférica de fármacos análogos a determinados neurotransmisores restauran funciones relacionadas con regiones conocidas del SNC.

Por tal motivo se considera que los trasplantes de tejido nervioso pueden proveer un sistema local liberador de neurotransmisores específicos, de tal forma que el trasplante funcionaria como una “bomba de secreción biológica”, con la prerrogativa de que de esta forma se evitaría el paso previo de la sustancia activa por la barrera hemato-encefálica y permitiendo dirigir de forma más específica las sustancias de interés a regiones cerebrales determinadas (Björklund, 1991).

El segundo mecanismo propuesto, se basa en el grado de re-inervación que presentan los trasplantes. Debido a la posibilidad de interconexión se ha sugerido que los trasplantes podrían participar en funciones integradas (Björklund et al. 1987).

Se ha observado que trasplantes de tejido mesencefálico ventral y sustancia nigra en animales previamente lesionados, regeneran conexiones interneurales complejas (Dunnet et al. 1981), además el tejido transplantado forma axones y crece extensivamente en el área cerebral previamente lesionada (Stenevi et al. 1976). Por otra parte, también se ha reportado que los trasplantes de tejido nervioso desarrollan las características morfológicas y neuroquímicas similares a las normalmente encontradas en el tejido cerebral adulto (Koutouzis et al. 1994).

[B] *Los Trasplantes de tejido fetal en la Cronobiología*

Mediante diversas evidencias experimentales se ha corroborado que el NSQ fetal transplantado es un oscilador circadiano. Mediante métodos de inmunohistoquímica, autorradiografía, electrofisiología y conductuales se ha demostrado que el NSQ fetal transplantado exhibe una diferenciación morfológica y funcional adecuada. En dichos estudios se ha encontrado que el NSQ transplantado se diferencia morfológicamente en las regiones que lo caracterizan en el adulto (grupo de células VIPérgicas adyacentes a otro grupo de neuronas Vasopresinérgicas), además dichas células muestran una clara ritmicidad circadiana

Tabla 1.- Resumen de algunas de las aplicaciones que ha tenido la estrategia de trasplantes de tejido fetal, en el estudio de diferentes padecimientos.

PADECIMIENTO	MODELO EXPERIMENTAL	SINTOMATOLOGÍA	TEJIDO TRANSPLANTADO	RESULTADOS
Diabetes Insipidus	Ratas Brattleboro (Valtin, 1967)	Inhabilidad de sintetizar Vasopresina, carecen de la hormona antidiurética, polidipsia, baja osmolalidad urinaria.	Hipotálamo Anterior (Gash et al. 1980; Scharoun et al. 1984)	Reducción transitoria de la polidipsia, incremento en la osmolalidad.
Mal de Hungtinton	Roedores con lesiones excitotóxicas con ácido cáinico del Estriado (McGeer y McGeer, 1976; Coyle y Schwarcz, 1976)	Hiperactividad, asimetría locomotora, falta de coordinación de las extremidades y disfunciones cognitivas (McGeer y McGeer, 1976; Coyle y Schwarcz, 1976)	Tejido del Estriado (Deckel et al. 1983; 1986; Dunnett et al. 1988; Isacson et al. 1984; 1986)	Reversión de la hiperactividad, reducción en la asimetría rotacional, normalización del uso de las extremidades, mejoras cognitivas probadas en laberintos T.
Mal de Parkinson	Roedores lesionados con la neurotoxina 6-OHDA en la Substancia Nigra o el Tracto Nigro Estriatal (Ungerstedt y Arbuthnoff, 1970)	Conducta de giro ipsilateral al sitio de la lesión, disminución en la respuesta a estímulos sensoriales contralaterales, uso no coordinado de las extremidades, akinesia (Ungerstedt y Arbuthnoff, 1970)	Sustancia Nigra (Björklund y Stenevi 1985; Dunnett et al. 1981; 1983) Médula Adrenal (Drucker-Colín et al. 1988)	Reducción de la conducta de giro, disminución de las deficiencias sensoriomotoras, mejora en la akinesia, pero persisten deficiencias en trabajos motores complejos.
Deficiencia de la Hormona Liberadora de la Gonadotropina (GnRh)	Ratones mutantes con Hipogonadismo (pp.) (Cattanach et al. 1977)	Marcada inmadurez en el sistema reproductivo (Cattanach et al. 1977)	Área Preóptica (Krieger et al. 1982; Gibson et al. 1984; Wiking y Silverman, 1985; Charlton et al. 1983)	En machos, incremento en el peso testicular y restauración completa de espermatogénesis. En hembras, desarrollo de ovarios, útero y ovulación normales. En ambos sexos, se incrementan a niveles normales los niveles plasmáticos de LH y FSH.

en su actividad metabólica y eléctrica (Aguilar-Roblero 1986; Aguilar-Roblero et al. 1992 a; 1992b).

Así mismo se ha observado que fibras de NPY o 5-HT¹ provenientes del hospedero inervan a los trasplantes de NSQ, específicamente a las células VIPérgicas dentro del trasplante (Lehman et al. 1991). Así mismo, dichos trasplantes son capaces de inducir la recuperación de la función rítmica en la conducta de ingesta de agua (Druker-Colín et al. 1984; Aguilar-Roblero et al. 1986), el ritmo de locomoción tanto en ratas, como en hámsters (Aguilar-Roblero et al. 1988, 1995).

Estudios realizados con *hámsters mutantes tau*, los cuales se caracterizan por exhibir un periodo circadiano menor (aproximadamente de 20h) como donadores de NSQ para animales con un periodo circadiano normal, así como el uso de xenotrasplantes de especies cruzadas de roedores (Saito et al. 1991; Sollars y Kimble, 1993), se encontró que estos exhiben una recuperación en la función y el periodo muestra inobjetablemente características genotípicas, es decir, el periodo característico del organismo del cual se obtuvo el tejido que se transplantó. También se han elaborado estudios en otras cepas de animales, tales como las *ratas Brattleboro*, cepa que se caracteriza por la deficiencia congénita de Vasopresina como receptores de trasplantes de NSQ obtenidos de ratas Long-Evans, cepa que posee los niveles normales de VP, en los que se encontró que estos mostraban ritmicidad circadiana en los niveles de VP en el líquido cefalorraquídeo, así como inmunorreactividad a este neuropéptido, cuyas características se asemejan a las exhibidas por células del NSQ (Farnest et al. 1989). Se han realizado trasplantes de células del NSQ previamente disociadas, con lo cual se ha demostrado que la organización típica del núcleo no es un requisito para la generación y la expresión del ritmo circadiano de locomoción, en oscilación espontánea (Silver et al. 1990).

Sin embargo prevalece aún la controversia de que si la localización del trasplante, así como las interacciones NSQ hospedero-trasplante son determinantes para restaurar la ritmicidad circadiana. Se ha reportado que la colocación de trasplantes hipotalámicos en el ventrículo lateral en hámsters previamente lesionados, tienen la capacidad de inducir la recuperación de la función rítmica (Aguilar-Roblero et al. 1994; Lehman et al. 1987), por tal motivo se ha sugerido la participación de un mecanismo humoral en dicha recuperación. Por el contrario, en otra serie de experimentos elaborada por Harrington et al. (1987) no observan la recuperación de la función rítmica previamente abolida por lesión del NSQ. Posteriormente se corroboró que la localización del trasplante no es relevante en la recuperación de la función rítmica, ya que en estudios donde a hámsters mutantes tau con lesiones bilaterales de NSQ recibieron trasplantes encapsulados con un polímero semipermeable que permitía la libre difusión de señales humorales, además estos experimentos confirmaron que señales humorales son suficientes para restaurar la ritmicidad conductual (Silver et al. 1996).

También ha sido empleada esta estrategia de trasplantes de NSQ fetal con la finalidad de abordar otros procesos, tal como el de acoplamiento de osciladores circadianos. En estos estudios roedores intactos reciben trasplantes de NSQ fetal en diferentes cavidades ventriculares y posterior a varios ciclos bajo condiciones de oscuridad continua es determinada la fase del NSQ hospedero y del NSQ transplantado utilizando la actividad metabólica (consumo de 2-Deoxy-glucosa) como marcador de fase. Se ha reportado que 14 días después de transplantado el tejido en el tercer ventrículo, el NSQ transplantado y el hospedero muestran la misma fase en actividad metabólica (Servière et al. 1994) y esta se mantiene después de permanecer 60 días en oscuridad continua (Aguilar-Roblero et al. 1998). Sin embargo cuando el trasplante de NSQ es colocado en el ventrículo lateral no se observa este mismo efecto (Servière et al. 1994a; Aguilar-Roblero et al. 1998).

Con base a lo anteriormente señalado, podemos concluir que el uso de los trasplantes de hipotálamo fetal son una valiosa estrategia experimental para el estudio de la participación del NSQ en los diferentes procesos involucrados en la ritmicidad circadiana, ya que el NSQ transplantado exhibe todas las características funcionales de un oscilador circadiano autosostenido.

Planteamiento Del Problema

Diversos estudios han demostrado que el sistema circadiano de mamíferos está constituido por más de un oscilador, sin embargo además del NSQ no se ha podido determinar la existencia de otros substratos anatómicos que cumplan con las características de un oscilador circadiano, lo que ha generado una seria limitación en el estudio de los mecanismos de acoplamiento de osciladores ubicados a distancia. *Por tal motivo nosotros proponemos el empleo del modelo experimental de trasplantes de NSQ fetal a animales intactos. Esta estrategia nos permite crear un sistema multioscilariorio con sustratos anatómicos identificables, mediante el cual es posible determinar el tipo de interacciones existentes entre el tejido transplantado y el hospedero.*

El NSQ transplantado se considera un oscilador, ya que como anteriormente se mencionó el NSQ transplantado se diferencia morfológicamente en las regiones que lo caracterizan en el adulto y también presenta las características funcionales rítmicas (Aguilar-Roblero et al. 1992a).

Por otra parte, estudios previos en los que se ha utilizado esta estrategia sugieren que la ubicación del trasplante dentro del organismo es determinante para que ambos osciladores ajusten o no su periodo y fase. Ya que cuando el trasplante es colocado en el tercer ventrículo (III V), tanto el NSQ hospedero como el transplantado muestran la misma fase en su actividad metabólica, lo que

sugiere que ambos osciladores se encuentran acoplados (Aguilar-Roblero, et. al. 1998; Servière, et. al. 1994a). Sin embargo, existen algunas discrepancias en los resultados obtenidos, cuando los trasplantes fueron colocados en el ventrículo lateral (*VL*). Servière et. al. (1994a) no observan ritmicidad en la actividad metabólica del trasplante, por lo que concluyen que el NSQ hospedero y trasplantado no se encuentran acoplados. Por otra parte, Aguilar-Roblero et. al. (1998) también encuentran que el trasplante de NSQ colocado en el ventrículo lateral no expresa ritmicidad en su actividad metabólica, a pesar de que el tejido trasplantado contiene un marcapaso circadiano, pero produce en el hospedero un marcado retraso de fase en el pico de actividad metabólica de aproximadamente 3 horas con respecto a los sujetos control y a sujetos con trasplante en el III V. La ausencia de ritmicidad en el NSQ trasplantado puede deberse a que los trasplantes bajo estudio se encontraban fuera de fase unos de otros, además se sugiere que la fase del tejido trasplantado no puede ser predicha por el ritmo conductual del hospedero después de 60 días bajo iluminación roja continua (Aguilar-Roblero et al. 1998).

Con base en las diferencias encontradas entre los sujetos con trasplante de NSQ en el tercer ventrículo y en el ventrículo lateral, Aguilar-Roblero et al. 1998 sugieren que es posible que puedan establecerse asimetrías en el proceso de comunicación entre el NSQ hospedero y el NSQ trasplantado, lo que produciría una influencia diferencial en la expresión de la ritmicidad. Esto podría deberse a que los trasplantes de NSQ colocados en el tercer ventrículo parecen establecer una comunicación bidireccional con el hospedero que permite ambos osciladores se acoplen. Mientras que los trasplantes colocados en el ventrículo lateral no ajustan su fase a la del hospedero, aun que estos parecen influir tanto en la fase del hospedero, o bien en la fase de la ritmicidad manifiesta.

Cabe hacer mención que las divergencias observadas en estos grupos de investigación posiblemente se deban predominantemente a la especie de roedores bajo estudio y en el número de muestras obtenidas a lo largo del ciclo. Servière et. al. (1994a) limitan sus observaciones a dos puntos del ciclo circadiano, lo cual resulta insuficiente para establecer claramente los patrones temporales de la actividad metabólica en ambos tejidos. Por otra parte Aguilar-Roblero, et. al. (1998) estudiaron 8 puntos del ciclo circadiano, lo cual aunque permite establecer con mayor precisión el patrón temporal de actividad metabólica, requiere un elevado número de sujetos para considerar que la muestra es representativa. Finalmente, la correlación entre el patrón temporal del tejido trasplantado y el hospedero no es suficiente para establecer relaciones funcionales.

Las observaciones anteriores nos plantean las siguientes preguntas: ¿Pueden acoplarse el NSQ hospedero y el NSQ fetal trasplantado?. En caso de ser afirmativo ¿Cómo afecta la localización del trasplante el acoplamiento entre ambos tejidos?, ¿Cómo participa la pineal en el proceso de acoplamiento?. Por lo que en el presente trabajo implementamos tres estrategias con la finalidad de validar nuestro modelo experimental de trasplantes de NSQ en animales intactos, así como examinar de forma más detallada el proceso de acoplamiento. Una de estas estrategias fue *i)* la obtención de las respuestas de fase a nivel conductual en animales con trasplante de NSQ en el IIIV o en el VL. Mediante la obtención de estas respuestas es posible determinar con precisión las características dinámicas del NSQ hospedero en presencia de otro oscilador. Por medio de esta estrategia es posible determinar los efectos que tiene la presencia de otro oscilador dentro del sistema y que posee las mismas características del hospedero, ya que si estos se encuentran acoplados esto puede verse manifestado en la forma de la curva de respuestas de fase, ya sea en lo que se refiere a la dirección de los cambios inducidos por pulsos de luz o bien en la magnitud de los cambios de fase; de igual

forma debido a la presencia de un segundo oscilador se esperaría observar un incremento en el número de ciclos transitorios requeridos para alcanzar el estado estable en la oscilación espontánea.

Una segunda estrategia fue *ii*) la obtención de las respuestas de fase a nivel celular, a través de la inducción por pulsos de luz y la detección inmunohistoquímica de los genes de expresión temprana c-Fos y Jun-b, los cuales son eficientes marcadores de fase a nivel celular. Con base a la expresión temporal y regional de estos dos genes de expresión temprana, consideramos que su inducción por pulsos de luz nos permiten establecer con mayor precisión la fase en la que se encuentra el NSQ hospedero y transplantado, que de encontrarse estos acoplados se esperaría que la expresión de estos genes fuera similar en ambos tejidos.

Finalmente, se desconocen los mecanismos y estructuras que participan en el acoplamiento de osciladores ubicados a distancia. Como anteriormente se mencionó, existen evidencias experimentales que sugieren la participación de la glándula pineal como integrador de fase del sistema circadiano, ya que la pinealectomía induce la partición del ritmo conductual en hámsters (Aguilar-Roblero y Vega-González, 1993) y la disociación en múltiples componentes ultradianos en ratas (Cassone, 1992); por lo que una tercera estrategia implementada en este estudio es el determinar la participación de la pineal en el proceso de acoplamiento, obteniendo las respuestas de fase en los dos niveles antes mencionados (conductual y celular) en animales pinealectomizados y con transplante de NSQ en el VL.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Hipótesis Generales

En un sistema circadiano multioscilar, el periodo y la fase que manifiesta el sistema está determinado por la interacción entre los osciladores involucrados, a dicho proceso le llamamos acoplamiento. Una forma de evidenciar dicha interacción es estudiando la curva de respuestas de fase inducida por luz, las características de dicha curva se modificarán ante cambios en el número de osciladores del sistema o la fuerza con la que interactúan.

En nuestro modelo experimental, el trasplante de NSQ fetal a un sujeto intacto es equivalente a agregar un oscilador adicional al sistema. Si este oscilador se acopla con el NSQ del hospedero, entonces se espera que la CRF a pulsos de luz se modifique. En contraste si la interacción entre el trasplante y el hospedero no involucra el acoplamiento de osciladores, o bien si no hay un oscilador en el trasplante, entonces la CRF no deberá afectarse.

Hipótesis Específicas

1.1 Si el NSQ transplantado y el hospedero establecen algún tipo de comunicación por medio de la cual ajusten su periodo y fase entre sí, entonces los cambios de fase inducidos por pulsos de luz diferirán entre animales intactos y animales con trasplante de NSQ.

1.2 Si se transplanta un tejido neural que no contenga oscilador circadiano, la interacción entre el NSQ hospedero y el trasplante no debe afectar el periodo o la fase del primero, debido a que el acoplamiento depende de la presencia de por lo menos dos osciladores. Por lo que los cambios de fase inducidos por pulsos de luz serán

similares entre animales intactos y animales con transplante de corteza cerebral.

1.3 Si el acoplamiento depende de conexiones neurales, entonces la localización del transplante afectará el acoplamiento entre el NSQ transplantado y el NSQ hospedero.

1.4 Si el acoplamiento depende de comunicación humoral, entonces la localización del transplante no afectará el acoplamiento entre el NSQ transplantado y el NSQ hospedero.

1.5 Si la pineal participa en mecanismos humorales de acoplamiento de osciladores entonces, la pinealectomía afectará el acoplamiento entre el NSQ del hospedero y de los transplantes colocados en el ventrículo lateral.

OBJETIVOS

I. Grupo de animales con trasplante de NSQ en el III ventrículo:

- I.1 Determinar los efectos de pulsos de luz en dos zonas de la CRF fase de la conducta de ingesta de agua.
- I.2 Comparar los cambio de fase exhibidos en el grupo control y en el grupo con trasplante de NSQ en el III ventrículo.
- I.3 Estimar el efecto de pulsos de luz en dos zonas de la CRF sobre la expresión de c-Fos y Jun-b en el NSQ hospedero y en el trasplante, comparando el número de células inmunoreactivas del grupo control y grupo con trasplante de NSQ en el III ventrículo.

II. Grupo de animales con trasplante de Corteza en el III ventrículo:

- II.1 Determinar los efectos de pulsos de luz en dos zonas de la CRF fase de la conducta de ingesta de agua.
- II.2 Comparar los cambio de fase exhibidos en el grupo control y en el grupo con trasplante de corteza en el III ventrículo.
- II.3 Estimar el efecto de pulsos de luz en dos zonas de la CRF sobre la expresión de c-Fos y Jun-b en el NSQ hospedero y en el trasplante, comparando el número de células inmunoreactivas del grupo control y grupo con trasplante de corteza en el III ventrículo.

III. Grupo de animales con trasplante de NSQ en el ventrículo lateral:

III.1 Determinar los efectos de pulsos de luz en dos zonas de la CRF fase de la conducta de ingesta de agua.

III.2 Comparar los cambio de fase exhibidos en el grupo control y en el grupo con trasplante de NSQ en el ventrículo lateral.

III.3 Estimar el efecto de pulsos de luz en dos zonas de la CRF sobre la expresión de c-Fos y Jun-b en el NSQ hospedero y en el trasplante, comparando el número de células inmunoreactivas del grupo control y grupo con trasplante de NSQ en el ventrículo lateral.

IV. Efecto de la localización del trasplante:

IV.1 Comparar las respuestas de fase exhibidos en el grupo con trasplante en el III ventrículo y el grupo con trasplante en el ventrículo lateral.

IV.2 Comparar el número de células inmunoreactivas a c-Fos y a Jun-b en el NSQ hospedero del grupo con trasplante en el III ventrículo y del grupo con trasplante en el ventrículo lateral.

IV.3 Comparar el número de células inmunoreactivas a c-Fos y a Jun-b en el NSQ transplantado en el III ventrículo y con el transplantado en el ventrículo lateral.

V. Grupo de animales Pinealectomizados con trasplante de NSQ en el ventrículo lateral:

V.1 Determinar los efectos de pulsos de luz en dos zonas de la CRF fase de la conducta de ingesta de agua.

V.2 Comparar los cambio de fase exhibidos en el grupo con trasplante de NSQ en el ventrículo lateral y en el grupo pinealectomizado con trasplante de NSQ en el ventrículo lateral.

V.3 Estimar el efecto de pulsos de luz en dos zonas de la CRF sobre la expresión de c-Fos y Jun-b en el NSQ hospedero y en el trasplante, comparando el número de células inmunoreactivas del grupo con trasplante de NSQ en el ventrículo lateral y grupo pinealectomizado con trasplante de NSQ en el ventrículo lateral.

Procedimientos Generales

[A] *Sujetos*

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar intactos, con un peso corporal de 180 a 200 g como receptores de los trasplantes. También fueron utilizadas hembras de la misma cepa con 17 días de gestación, las cuales fueron donadoras del tejido fetal para la realización de los trasplantes.

Los animales tanto hospederos como donadores, fueron mantenidos inicialmente bajo un ciclo luz-oscuridad (12:12). Una vez realizadas las cirugías y posterior a la recuperación quirúrgica, los animales hospederos fueron transferidos a condiciones de luz roja (50 lux) continua. En todo momento los animales tuvieron libre acceso a agua y alimento.

En el presente trabajo se estudiaron 5 grupos de animales:

- 1) Ratas intactas
- 2) Ratas con trasplante de NSQ en el tercer ventrículo (III V)
- 3) Ratas con trasplante de NSQ en el ventrículo lateral (V I.)
- 4) Ratas con trasplante de corteza occipital en el III V
- 5) Ratas pinealectomizadas y con trasplante de NSQ en el VL

[B] *Cirugías*

Todos los procedimientos quirúrgicos se realizaron bajo condiciones anti-sépticas. Los animales hospederos fueron anestesiados con Hidrato de cloral (440g/Kg de peso corporal). Para la elaboración de los *trasplantes de NSQ fetal*, una vez anestesiados, la cabeza de los hospederos fue rasurada y posteriormente fueron colocados en un aparato estereotáxico con la barra de incisivos en cero. Se realizó una incisión longitudinal sobre el cuero cabelludo (aproximadamente 2 cm)

sobre la línea media, la cual se extendía hasta la región occipital. La sutura sagital, así como bregma fueron expuestas moviendo el periosteo. Justo sobre bregma se realizó un trepano de 2 mm de diámetro, el hueso fue removido cuidadosamente evitando causar hemorragias del seno venoso sagital, el cual quedó expuesto al retirar el hueso. Con ayuda de un escalpelo del No. 10 se realizó una incisión lateral (aproximadamente 1mm) de la dura madre, la cual fue retraída junto con el seno venoso para insertar la cánula guía.

La cánula de acero inoxidable (calibre 18) fue colocada estereotáxicamente en las coordenadas A-P: 0.0, L: 0.0 y V: 8.0 con respecto a bregma para *transplantes al tercer ventrículo* y las coordenadas A-P: -0.8, L: 1.2 y V: 3.6 con respecto a bregma para *transplantes al ventrículo lateral* (Paxinos, 1986).

Las hembras donadoras de tejido fetal de 17 días de gestación, fueron anestesiadas y se expuso el útero mediante una laparotomía, posteriormente los fetos fueron extraídos en el momento del transplante. Una vez extraído uno de los fetos, este fue inmediatamente decapitado y el cerebro disecado, posteriormente se colocó sobre su cara dorsal en un vidrio de reloj con solución salina fisiológica a temperatura ambiente. Para los *transplantes de NSQ*, se localizó la convergencia de las arterias cerebrales anteriores y la emergencia de los nervios ópticos bajo un microscopio de disección. Se realizaron cortes a nivel rostral y caudal de la emergencia del nervio y las arterias mencionadas en sentido dorsomedial, formando un bloque de aproximadamente 0.5mm^3 en forma de pirámide cuadrangular cuya base era el quiasma óptico. Este bloque que contenía el NSQ se inyectó en 0.10 ml de solución salina al tercer ventrículo o al ventrículo lateral de los animales receptores (Fig. 14). El tiempo transcurrido entre la incisión del útero y la inyección del tejido varió entre 3 y 5 minutos.

Siguiendo este mismo procedimiento, un grupo adicional de animales intactos recibieron *transplantes de Corteza Occipital fetal*, en los cuales se realizó

el mismo procedimiento quirúrgico, con excepción de la disección del tejido en estos se obtuvo un bloque de aproximadamente 0.5mm^3 de Corteza Occipital, el cual fue inyectado con solución salina al tercer ventrículo.

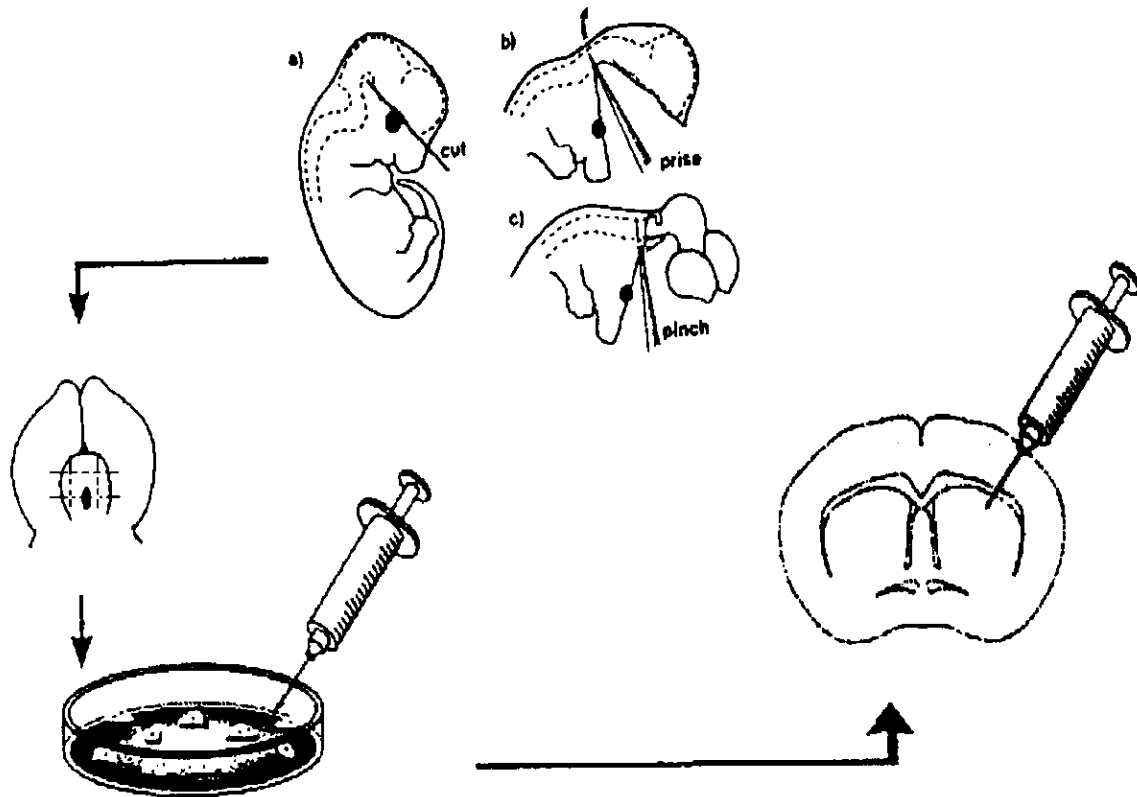


Fig. 14.- Técnica de transplantes intracerebrales a animales intactos. Para mayor detalle ver texto.

Por otra parte un grupo de animales con transplante de NSQ en el VL fueron sometidos a *pinealectomias*, posterior a la aplicación del protocolo de pulsos de luz (ver sección posterior). Para tal efecto los animales fueron nuevamente anestesiados bajo luz roja con Hidrato de cloral en la misma dosis antes mencionada, fueron nuevamente rasurados y colocados en el aparato

estereotáxico. Se realizó la incisión longitudinal sobre el cuero cabelludo y se expuso la sutura media del cráneo, bregma y lambda. Lateral a lambda se realizó un trepano de 4 mm de diámetro, se retiró el hueso y se realizó la incisión de la dura madre. La exéresis de la pineal se realizó con ayuda de una micropinza, la cual fue introducida por el trepano con una orientación de 45° en el plano frontal y aproximadamente 30° en el plano medio-sagital (Fig. 15) para evitar tocar la confluencia de los senos venosos. Se utilizaron las coordenadas del centro del cuerpo de la pineal A-P: 8.3, L: 0.0 y V: 3.0 con respecto a bregma (Paxinos, 1986).

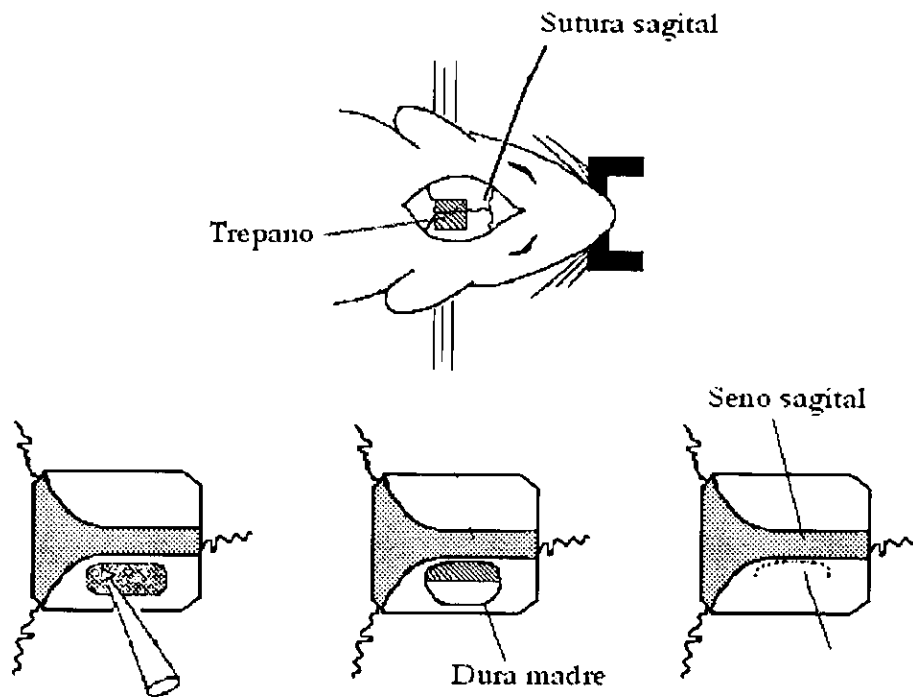


Fig. 15.- Técnica de pinealectomías en ratas con transplante en el ventrículo lateral. Para mayor detalle ver texto.

Una vez transcurridas 24 horas después de la cirugía, los animales fueron colocados de nueva cuenta en el cuarto de registro, bajo iluminación continua con luz roja.

[C] Registro conductual

Posteriormente al periodo de recuperación quirúrgica (20-25 días), los animales hospederos fueron transferidos a condiciones luz roja (50 lux) continua, condición bajo la cual se llevo a cabo el registro del patrón ritmo circadiano de ingesta de agua. Estos registros se realizaron mediante el sistema de monitoreo continuo SiMC, sistema de registro que fue desarrollado en el laboratorio de Cronobiología, del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (Márquez, 1998).

Para tal efecto, los animales hospederos fueron colocados en cajas individuales de acrílico transparente (40 x 25 x 20 cm), provistas en el piso del tercio frontal de la caja cubierto por una placa de aluminio, justo por encima de dicha placa era colocada la botella de agua, equipada con un bebedero de acero inoxidable aislado con un tubo de plástico 2 mm de espesor, que sobresalía 2 mm del orificio de salida del bebedero. De tal forma que para que la rata pudiera beber agua, tenía que colocarse sobre la placa de metal, introducir la lengua en el tubo de plástico y tocar el bebedero de acero. Al tener contacto el animal con estos dos elementos metálicos de la caja, eran contabilizados los contactos al bebedero, debido a que uno de los elementos metálicos se encontraba conectado al voltaje de alimentación y el otro a tierra, así que cada vez que era tocado el bebedero una pequeña corriente (495 nA) fluía a través del cuerpo del animal. Por medio del sistema SiMC se realizó la acumulación de cuentas de cada sujeto (canal), para obtener el total de eventos por el periodo de muestreo, posteriormente los datos fueron transmitidos a una computadora (IBM-PC), donde finalmente los datos

fueron almacenados en disco duro cada 15 minutos, para su posterior análisis en el sistema DiSPAC (Vega-González 1993) sistema que también fue desarrollado en nuestro laboratorio.

Los registros conductuales obtenidos del ritmo de ingesta de agua, fueron graficados en forma de actogramas dobles (doble plot), representación gráfica de los datos que consiste en el ordenamiento consecutivo de gráficas de ocurrencia de eventos, en donde en el eje de las ordenadas se presentan los días de registro y en las abscisas la hora del día. En el actograma doble, la misma gráfica se repite del lado izquierdo y desfasado por un día lo que proporciona una mejor apreciación del fenómeno rítmico bajo estudio.

[D] Estimación de las fases del ciclo circadiano

Para estimar la fase, se utilizaron por lo menos los últimos 10 días consecutivos bajo registro de la conducta de ingesta de agua de animales en oscilación espontánea. Habitualmente es utilizado el inicio de la fracción de actividad como fase de referencia, la cual por convención se le denomina como tiempo circadiano 12 (CT 12).

CT 12 se estimó trazando una línea sobre el inicio de la actividad de los últimos 10 días consecutivos bajo registro y proyectando esta línea un día adicional, para estimar el inicio del bloque actividad para el día en que se aplicaron los pulsos de luz.

A partir de CT 12 se calcularon las demás horas circadianas para obtener las respuestas de fase a pulsos de luz tanto a nivel conductual, como celular, en donde:

$$CT 13 = CT 12 + \left[1 * \tau / 24 \text{ h después del inicio de la actividad} \right]$$

mientras que para

$$CT 23 = CT 12 + \left[11 * \tau / 24 \text{ h después del inicio de la actividad} \right]$$

Posteriormente fueron relacionadas con la hora geográfica con la que concordaba para la aplicación de los pulsos de luz.

Una vez realizados los cálculos pertinentes, en la hora circadiana correspondiente los animales fueron colocados individualmente en una caja de acrílico transparente (40 x 25 x 20 cm) con tapa del mismo material, la cual a su vez fue introducida en el dispositivo en el que se administró un pulso de luz (400 lux) de una hora de duración. Inmediatamente después de aplicar el pulso de luz, los animales fueron regresados a sus cajas de registro, hasta alcanzar nuevamente el estado estable de la oscilación espontánea por lo menos durante 15 días.

Posterior al lapso de 15 días post-pulso de luz, fueron estimados la dirección y la magnitud de los cambios de fase inducidos por el pulso de luz, mediante la proyección de una línea sobre el inicio de la actividad del nuevo estado estable y comparándolo con el ajuste anterior, así mismo fueron contabilizados el número de ciclos transitorios requeridos para obtener el estado estable de oscilación espontánea. Se consideró el inicio del estado estable, cuando en el registro era observado el inicio del bloque de actividad estable por lo menos durante cinco ciclos consecutivos.

Mediante el programa StatView (Abacus Concepts Inc.) se realizó el análisis estadístico de la magnitud de los cambios de fase, así como del número de ciclos transitorios, se realizó mediante un ANOVA seguida de una prueba de comparaciones múltiples (Fisher).

[E] Detección inmunohistoquímica de c-Fos, Jun-b y VIP

En el presente trabajo se realizó la detección inmunohistoquímica de los genes de expresión temprana c-Fos y Jun-b, así como la detección de células y fibras inmunoreactivas a VIP. En el procedimiento general, los sujetos fueron

profundamente anestesiados con Anestosal bajo iluminación roja (400 lux) y preparados para su inmediata perfusión.

Las ratas fueron perfundidas con paraformaldehído-lisina-periodato (P.L.P) al 4%. Los cerebros fueron extraídos y criopreservados en concentraciones crecientes de sacarosa (10%, 20% y 30%). Posteriormente se realizaron secciones coronales de 40 μ m de grosor en un criostato (Reichter-Jung) a -18°C; las cuales se colectaron en buffer fosfatos (PB, 0.1 M, pH 7.2).

Para la detección inmunohistoquímica de c-Fos, Jun-b y VIP se usó la técnica de avidina-biotina-peroxidasa propuesta por Hsu et al. (1981). Las secciones se incubaron con el anticuerpo contra c-Fos (Sta. Cruz, dilución 1:2,500) o Jun-B (Donación de la Bristol Mayers, dilución 1:20,000) durante 72 horas, a 4°C. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS y se continuó con la exposición del tejido al anticuerpo secundario biotinilado durante 2 horas a temperatura ambiente; seguido de 3 lavados en PBS, para su posterior incubación con el complejo Avidina-Biotina (Vectastain, Vector lab.) durante 2 horas. Finalmente se reveló la reacción con Diaminobenzidina (DAB). Los cortes se montaron en porta objetos gelatinizados y la reacción se intensificó exponiendo las preparaciones a una solución de tetroxido de osmio al 1% durante 10 segundos. Finalmente los cortes fueron deshidratados en concentraciones crecientes de alcohol etílico (70%, 95% y absoluto), aclaradas con xilol y finalmente cubiertos con Permount (Baxter).

Mediante este mismo procedimiento se realizó la verificación histológica del tejido transplantado, para tal efecto fue utilizado otro juego de cortes el cual se expuso al anticuerpo contra VIP (Donación del Dr. R. Moore, dilución 1:2,000). Así mismo para delimitar el tejido transplantado se utilizó la tinción de Nissl, en donde los cortes fueron expuestos a violeta de cresilo, posteriormente fueron deshidratados, aclarados y cubiertos de la misma forma previamente señalada.

[G] Análisis Estereológico de c-Fos y Jun-b en el NSQ

La interpretación espacial de la expresión de estos genes en el NSQ, se realizó a través del método del *disector óptico* descrito por Sterio (1984). Este método consiste en contar los objetos que están presentes en una sección y que no son contenidos en la sección previa, de esta forma son sistemáticamente contados los objetos en las subsecuentes secciones de tejido que comprenden la región bajo estudio.

Este método estereológico tridimensional nos ofrece la ventaja que los objetos son muestreados con una probabilidad que es proporcional a su número y no a su tamaño, forma u orientación.

Mediante esta estrategia fue posible estimar la densidad de neuronas, así como hacer una inferencia del número total de neuronas inmunoreactivas a los productos de estos dos genes de expresión temprana en el NSQ.

El conteo de células se realizó mediante un microscopio Olympus (10x objetivo), la imagen del microscopio fue transferida mediante una video cámara (Sony CCD-blanco y negro) a la computadora, la cual estaba provista del programa para análisis de imágenes MCID mediante el cual se elaboró la rejilla de conteo, el conteo de c'IR y la estimación del área del NSQ.

El procedimiento para el conteo de c'IR se realizó de la siguiente forma: la imagen de cada una de las secciones que contenía el NSQ fue digitalizada y se superpuso a esta una rejilla constituida por cubos de $40\mu\text{m} \times 40\mu\text{m} \times 40\mu\text{m}$ (Fig. 16). De esta rejilla fueron contabilizadas las células inmunopositivas situadas dentro de los 9 cubos de muestreo que comprendían el NSQ y 7 cubos adicionales que comprendían la región externa al NSQ. Cada cubo fue asignado con las iniciales de acuerdo a su localización Ventro-Dorsal y Medio-Lateral en relación al NSQ. Estas

iniciales fueron asignadas con la finalidad de identificar cada cubo y ubicarlo espacialmente en cada corte.

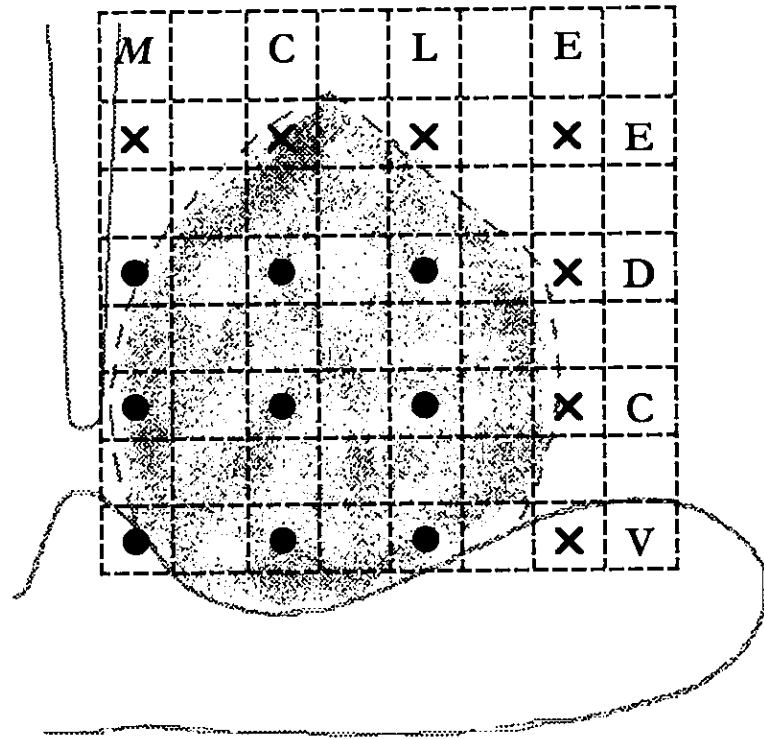


Fig. 16.- Esquema de la forma en la que fueron contabilizadas las células inmunoreactivas a c-Fos y a Jun-b en el NSQ de ratas intactas. Primero fue digitalizado el corte que contenía el NSQ, al cual se le superpuso una rejilla. En esta rejilla fueron contabilizadas las células inmunoreactivas situadas dentro de los cubos de muestreo en el NSQ (indicados por los círculos), así como en 7 cubos que correspondían a la zona externa del NSQ (indicado por las cruces). A cada cubo de muestreo le fue asignado una inicial la cual correspondía con su ubicación ventro-dorsalmente (V=Ventral, C=Central, D=Dorsal, E=Externa) y medio-lateral (M=Medial, C=Central, L=Lateral, E=Externa). El conteo se realizó rostro-caudalmente del NSQ.

A partir de los datos obtenidos en el MCID fueron estimados el volumen de referencia, la densidad neural y el número total de neuronas.

El *Volumen de referencia* (V_{ref}), es decir el volumen del NSQ, se determinó a partir de la fórmula de un objeto prismoidal (Ilanders et al. 1973):

$$V_{ref} = h/6 (A_0 + 4M + A_1)$$

En donde:

h = longitud del eje antero-posterior del NSQ

A_0 = área de la sección más anterior del NSQ

M = área de la sección media del NSQ

A_l = área de la sección más posterior del NSQ

Para la estimación de la *Densidad de neuronas* (Nv), se utilizó la siguiente fórmula (Chen et al. 1999):

$$Nv = \frac{\Sigma Q}{\Sigma_{Disector} \times A(fr)}$$

En donde:

ΣQ = número de células contadas

$\Sigma_{Disector}$ = suma del número de cuadros de disectores contados

$A(fr)$ = área asociada a cada cuadro del disector

Para la estimación del número total de células (N), se utilizó la fórmula (Chen et al. 1999):

$$N = Nv * V_{ref}$$

En donde:

Nv = densidad neuronal

V_{ref} = volumen de referencia

Finalmente para determinar las diferencias entre los diferentes grupos experimentales, se realizó un ANOVA seguida de una prueba de comparaciones múltiples (Fisher) mediante el programa StatView (Abacus Concepts Inc.).

[H] Respuestas de fase a nivel conductual en animales Transplantados

Con la finalidad de determinar el efecto de los trasplantes sobre las respuestas de fase inducidas por pulsos de luz en la conducta de ingesta de agua, fueron utilizadas un total de 35 ratas intactas con trasplante de NSQ (III V y VI), 8 ratas con trasplante de Corteza (III V) y 4 ratas pinealectomizadas y con trasplante de NSQ (VI) .

En estos experimentos se considero explorar únicamente las zonas de la CRF en las que se sabe que el marcapaso es susceptible a cambiar su fase, por lo que los pulsos de luz fueron administrados en CT 13 y CT 23, horas circadianas en las que son obtenidos (respectivamente) los máximos retrasos y avances de fase en ratas Wistar.

Una vez concluido el periodo post-operatorio, y obtenido el registro conductual de los animales de por lo menos 20 días continuos en oscilación espontánea, se estimó CT 12 para la aplicación de los pulsos de luz. De manera aleatoria los animales fueron asignados a dos grupos, el primero de ellos recibió el pulso de luz en CT 13, mientras que el segundo grupo recibió el pulso de luz en CT 23. El procedimiento de aplicación de los pulsos de luz se realizó de la forma señalada anteriormente.

Posterior a la aplicación de los pulsos de luz, los animales fueron regresados a su correspondiente caja de registro durante 15 días o bien hasta alcanzar el estado estable de la fase de referencia. Finalmente, fueron calculados la dirección y la magnitud de los cambios de fase inducidos a los animales con trasplante, así como el número de ciclos transitorios requeridos para adquirir el estado estable en la fase de referencia.

Los datos obtenidos tanto de los cambios de fase, así como del número de ciclos transitorios fueron analizados mediante una ANOVA, seguida de una prueba

de comparaciones múltiples (Fisher) mediante el programa StatView (Abacus Concepts Inc.).

[B] Respuestas de fase a nivel celular

Con la finalidad de determinar el efecto del transplante de NSQ sobre las respuestas de fase inducidas por pulsos a nivel celular, se determinó expresión de c-Fos y Jun-B en animales que recibieron transplante de NSQ (en el IIIV o VL), transplante de Corteza (IIIV) y en los animales pinealectomizados y con transplante de NSQ (VL). De igual forma que los experimentos a nivel conductual, solo fueron estudiadas las zonas de retrasos y avances de fase de la CRF.

Una vez determinados los cambios de fase conductuales en cada sujeto, nuevamente fue estimada CT 12 y los animales fueron programados para recibir un pulso de luz pero en la misma hora circadiana en la que previamente fueron expuestos en el protocolo de respuesta de fase a nivel conductual, de tal forma que cada animal fue su propio control.

Inmediatamente después de la aplicación del pulso de luz, los animales fueron anestesiados, perfundidos y los cerebros fueron procesados para la detección inmunohistoquímica de c-Fos, Jun-b y VIP. Así mismo se realizó la verificación histológica del tejido transplantado, así como para la localización del NSQ dentro del transplante mediante la detección inmunohistoquímica de cúmulos de células y fibras inmunoreactivas a VIP. Así mismo también se realizó la tinción de Nissl, para establecer con mayor precisión los límites del transplante.

Una vez obtenidas las laminillas, fueron contabilizadas el número de c'IR a c-Fos y a Jun-B en el *NSQ hospedero*, el conteo de células se realizó a lo largo rostro-caudal del NSQ de la misma forma previamente descrita. A partir de los datos obtenidos en el conteo de células fueron estimados el volumen de referencia, la densidad neural y el número total de neuronas.

Para el conteo de células del *NSQ transplantado*, se digitalizó el NSQ marcado con VIP en un canal y fue delimitado el borde del NSQ transplantado; en un segundo canal fue digitalizado el corte equivalente marcado con c-Fos, los dos cortes fueron sobrepuestos y alineados. Sobre la imagen digitalizada de c-Fos y el núcleo delimitado, se sobrepuso una rejilla de las mismas dimensiones a la anteriormente mencionada, de esta rejilla fueron contabilizadas las células inmunoreactivas situadas en los 49 cubos de muestreo (Fig.17). Se realizó este mismo procedimiento para el conteo de c'IR a Jun-b dentro del NSQ hospedero y transplantado. En los animales con transplante de corteza se eligió al azar una sección del transplante, la cual fue digitalizada y a la cual se le sobrepuso la rejilla de conteo, el cual se realizó de la misma forma previamente descrita.

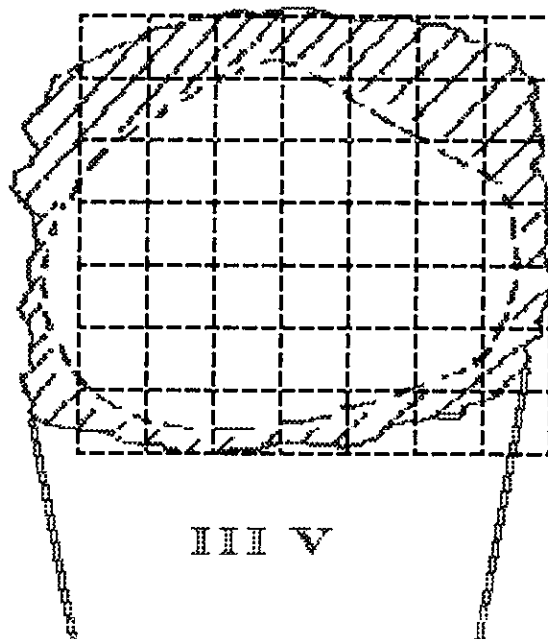


Fig. 17.- Esquema de la forma en la que fueron contabilizadas las células inmunoreactivas a c-Fos y a Jun-b en el NSQ transplantado. Primero fue digitalizado el corte que contenía el NSQ, al cual se le sobrepuso una rejilla constituida por cubos de $40\mu\text{m} \times 40\mu\text{m} \times 40\mu\text{m}$. En esta rejilla únicamente fueron contabilizadas las células inmunoreactivas situadas dentro de los 49 cubos de muestreo (indicados por las siglas).

A partir de los datos obtenidos en el MCID fueron estimados el volumen de referencia y el número total de neuronas mediante las fórmulas previamente descritas. Finalmente estos datos fueron analizados mediante una ANOVA seguida de una prueba de comparaciones múltiples (Fisher).

Nota Aclaratoria:

En esta sección no han sido mencionados los experimentos preliminares que se realizaron para abordar el tema principal de la tesis, en la sección de RESULTADOS se incluyen tanto la forma en que se realizaron estos experimentos, como los resultados obtenidos en estos.

Para mayor claridad, se decidió incluir en esta sección únicamente los procedimientos generales, en la sección de RESULTADOS serán especificados los diseños de cada uno de los experimentos realizados en el presente trabajo.

Estudios Preliminares en Ratas Intactas

[A] Detección Inmunohistoquímica de c-Fos

De forma inicial se realizó una curva de diluciones de la expresión de c-Fos en el NSQ, con la finalidad de determinar la concentración óptima de anticuerpo primario a utilizar en nuestros posteriores experimentos. Para tal efecto fueron utilizadas ratas intactas Wistar (n=10), las cuales inicialmente se encontraban sincronizadas a un ciclo L:D (12:12) durante por lo menos 15 días, posteriormente fueron transferidas a condiciones de luz roja (50 lux) continua durante 3 ciclos (72 horas). De forma aleatoria los animales se asignaron a uno de los dos grupos experimentales:

- ◆ Un grupo recibió un pulso de luz (1h, 400 lux) durante la noche subjetiva (CT 13), inmediatamente después de la administración del estímulo fótico los animales fueron anestesiados bajo luz roja, perfundidos y los cerebros procesados para la detección inmunohistoquímica de c-Fos (para mayor detalle ver sección de “Detección inmunohistoquímica de c-Fos, Jun-b y VIP”).
- ◆ El segundo grupo de animales (grupo control) fueron anestesiados y perfundidos a la misma hora circadiana (CT 13), pero sin la previa aplicación del pulso de luz. Los cerebros obtenidos fueron procesados para inmunohistoquímica.

La curva de diluciones se obtuvo, exponiendo las secciones de tejido cerebral a nivel del NSQ de ambos grupos experimentales a concentraciones crecientes del anticuerpo primario, anti c-Fos (1:10,000; 1:7,500; 1:5,000; 1:2,500; 1:1,000 y 1:500) durante 72hr a 4°C y se continuó con el procesamiento normal del tejido, tal como se mencionó anteriormente.

Mediante el digitalizador de imágenes (MCID) se determinó el número de células inmunoreactivas (c'IR) a c-Fos, la densidad óptica relativa tanto de la marca, como del fondo, así como la relación señal/fondo de la reacción. Todas estas mediciones se realizaron únicamente en la región central del NSQ de ambos grupos experimentales y para cada una de las concentraciones del anticuerpo primario.

En todas las concentraciones bajo estudio, se observó que el grupo de animales que recibió el pulso de luz mostraban un incremento en el número de c'IR en el NSQ, en comparación del grupo control. Con relación al efecto que posee la concentración del anticuerpo primario sobre el número de c'IR, se observó que a concentraciones bajas del anticuerpo, el número de c'IR a c-Fos disminuye (Fig. 18), el decremento más notorio se observó en las diluciones 1:7,500 y 1:10,000.

También, se midió la densidad óptica relativa (DOR) de la marca (células inmunoreactivas a c-Fos) y del fondo, en esta se observó una tendencia similar, en donde los valores de la DOR decrecen a medida que se disminuye la concentración de anticuerpo primario (Fig. 19).

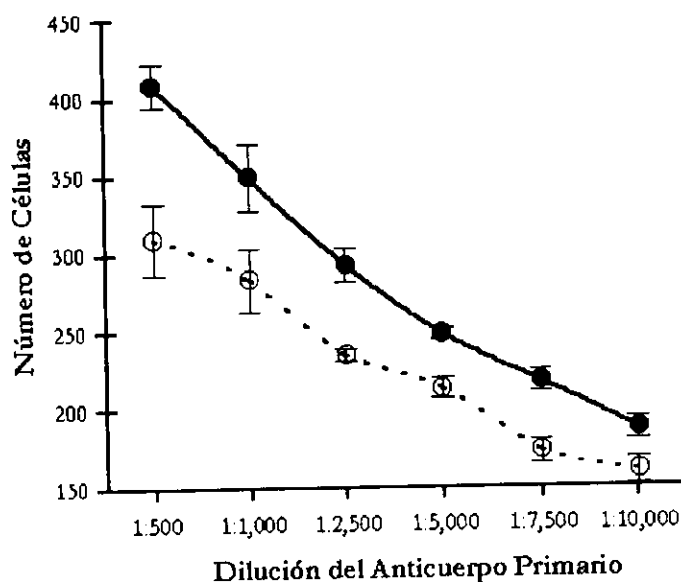


Fig. 18.- Curva de Diluciones del anticuerpo primario anti c-Fos en el NSQ de ratas Wistar mantenidas en oscuridad continua (círculos vacíos) y ratas que recibieron un pulso de luz durante la noche subjetiva (círculos negros). Media y desviación estándar del número de células inmunoreactivas (c'IR) a c-Fos.

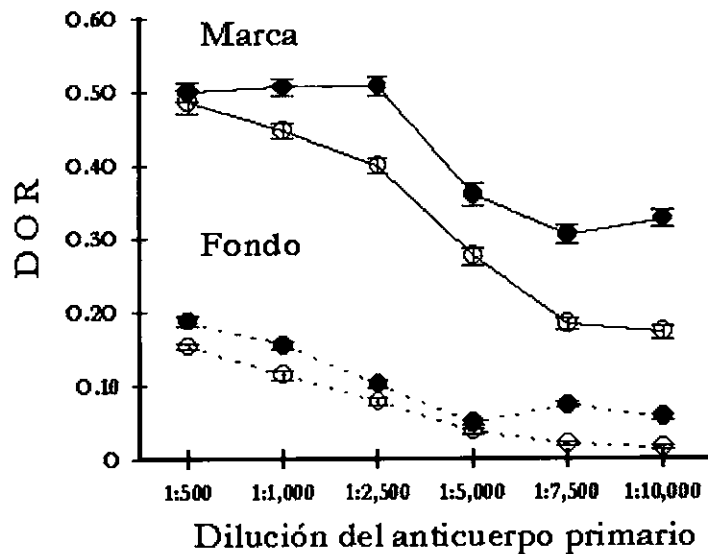


Fig. 19.- Densidad óptica relativa (DOR) de la marca y del fondo, de la detección inmunohistoquímica de c-Fos en el NSQ de ratas Wistar mantenidas en oscuridad continua (círculos vacíos) y de ratas que recibieron un pulso de luz (círculos negros) durante la noche subjetiva. Las secciones de tejido fueron expuestas a diferentes concentraciones de anticuerpo primario anti c-Fos.

Es de notarse, que en la dilución 1:2,500 la marca mantiene valores altos en la DOR, mientras que los del fondo disminuyen notablemente en ambos grupos experimentales. Tendencia que fue constatada con la obtención de la relación señal-ruido (Fig. 20).

Una vez obtenida la curva de diluciones, se probó la especificidad del anticuerpo primario anti c-Fos, por lo que fueron realizados los experimentos de inmuno-adsorción.

Para tal efecto fueron utilizadas ratas intactas Wistar (n=10), las cuales fueron mantenidas bajo las mismas condiciones que el experimento anterior (Curva de diluciones) y también fueron asignados los animales a dos grupos experimentales, uno que recibió un pulso de luz (CT 13) y su control.

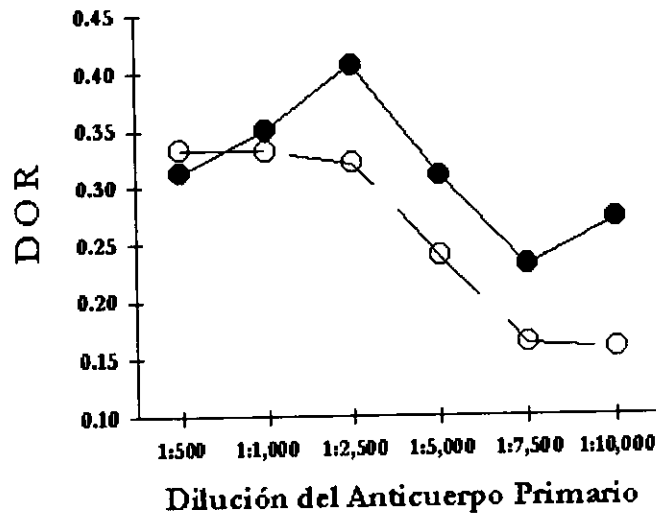


Fig. 20.- Relación Señal-Ruido obtenida de la Densidad Óptica Relativa (DOR) de la marca y el fondo de la detección inmunohistoquímica de c-Fos en el NSQ de ratas mantenidas en oscuridad continua (círculos vacíos) y de ratas que recibieron un pulso de luz (círculos negros) durante la noche subjetiva. El tejido obtenido de ambos grupo de animales fue expuesto a diferentes concentraciones de anticuerpo primario anti c-Fos.

Una vez obtenido el tejido se hizo una preincubación durante 12 horas del anticuerpo primario (anti c-Fos) en dos diluciones (1:2,500 y 1:500) con el antígeno (péptido control) a concentraciones crecientes (1:10,000; 1:2,000; y 1:1,000 y 1:2,000, 1:1,000, 1:500 respectivamente). Transcurridas las horas de pre-incubación del anticuerpo y el antígeno, se expuso el tejido al complejo anticuerpo-antígeno durante 72 h a 4°C y se continuo con el procesamiento normal de inmunohistoquímica previamente mencionado.

De igual forma que en el experimento anterior, mediante el digitalizador de imágenes (MCID) se determinó el número de c'IR a c-Fos en la región central del NSQ de ambos grupos experimentales y para las diferentes concentraciones de anticuerpo primario y antígeno.

En los experimentos de inmunoadsorción para c-Fos, se encontró que cantidades mínimas del antígeno producen una notable disminución del número de c'IR a c-Fos en ambos grupos de animales (Fig. 21). Datos que fueron corroborados

por un segundo experimento en el que se utilizó una mayor concentración de anticuerpo primario (1:500) y diferentes concentraciones de antígeno. Experimento en el que se observó esta misma tendencia, en donde concentraciones de antígeno cuatro veces inferiores a las del anticuerpo primario, fueron suficientes para bloquear casi en su totalidad la expresión de c-Fos en el NSQ.

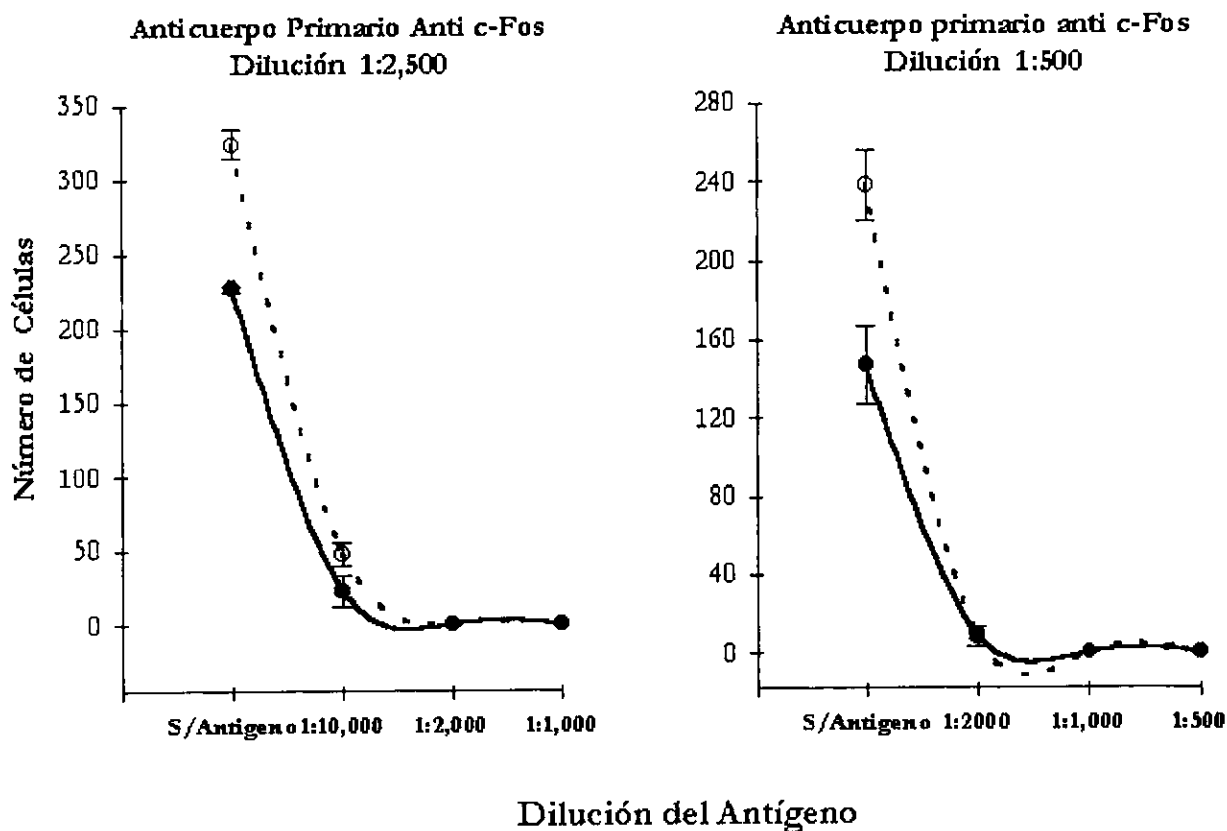


Fig. 21.- Experimentos de inmuno-adsorción, en donde el anticuerpo primario anti c-Fos se utilizó dos concentraciones (1:2,500 y 1:500). Estas curvas fueron obtenidas del NSQ de ratas Wistar, las cuales fueron mantenidas bajo oscuridad continua (círculos negros) y ratas que recibieron un pulso de luz (círculos vacíos) durante la noche subjetiva.

[B] Determinación de c-Fos como marcador de fase

Con base a la CRF conductual previamente obtenida en nuestro laboratorio (Salazar-Juárez y Aguilar-Roblero 1997), se determinó la eficiencia de la expresión de

c-Fos como marcador de fase en el NSQ. Por lo que ratas intactas mantenidas bajo condiciones de luz roja continua fueron asignadas aleatoriamente a dos grupos experimentales:

- Un grupo de animales (n=12) fue expuesto a un pulso de luz (1h duración, 400 lux intensidad) en una de las tres zonas de la curva de respuestas de fase (CT 06, 13 y 23), inmediatamente después los animales fueron anestesiados bajo luz roja, perfundidos y los cerebros procesados para determinación inmunohistoquímica de c-Fos.
- De forma simultánea se proceso otro grupo de ratas controles (n=12) las cuales fueron sacrificadas a las mismas horas circadianas, pero sin la previa aplicación del pulso de luz.

Una vez obtenidos los cerebros, estos fueron procesados para la detección inmunohistoquímica de c-Fos como anteriormente ha sido mencionado. Posteriormente fue contabilizado el número de c'IR a c-Fos en la región central del NSQ, en tres horas circadianas antes mencionadas y en ambos grupos de animales.

También fueron revisadas otras estructuras cerebrales que reciben información fótica tales como la hojuela intergeniculada, el núcleo geniculado lateral, el área tegmental mesencefálica y el colículo superior, con la finalidad de determinar si la inducción fótica de esta proteína estaba regulada de forma circadiana en otras estructuras centrales que reciben información visual (para mayor detalle ver ANEXO 1).

En lo que se refiere a la expresión de la proteína c-Fos, no se encontraron variaciones en la su expresión en función de la hora circadiana en el grupo de ratas al que no les fue administrado el estímulo fótico, ya que el número de células inmunopositivas a Fos en el NSQ fue similar en las tres horas circadianas que se estudiaron. Por el contrario, encontramos que la administración del pulso de luz

produjo incrementos en la expresión de c-Fos en el NSQ y además dichos incrementos eran dependientes de la fase circadiana en la que fue aplicado el estímulo fótico.

En CT 06 (zona muerta) el estímulo fótico no indujo cambios en la expresión basal de la proteína Fos, pero los pulsos aplicados en CT 13 (zona de retrasos de fase) y 23 (zona de adelantos de fase) produjeron marcados incrementos en el número de c-IR en el NSQ (Fig. 22), siendo este incremento mayor en CT 23 (para mayor detalle ver ANEXO 1).

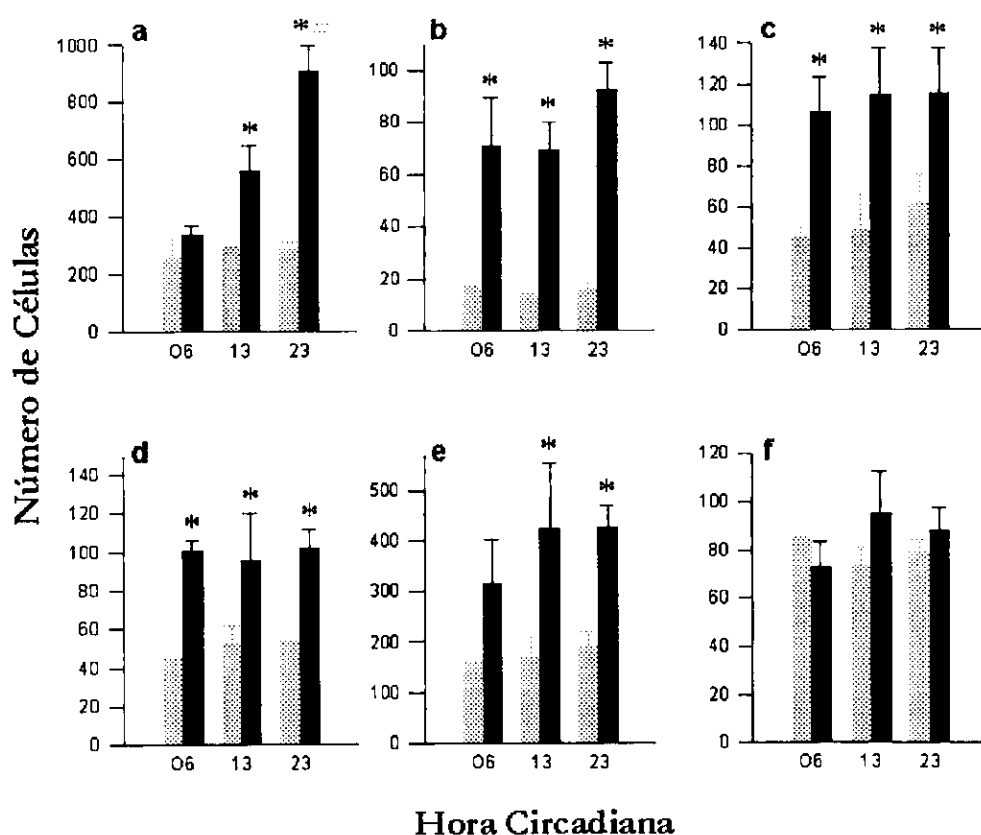


Fig. 22.- Número de células inmunoreactivas a c-Fos (Media \pm desviación estándar) en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo (a), en la hojuela intergeniculada (b), en el núcleo geniculado lateral ventral (c), en el área tegmental (d), en el colículo superior (e) y en el núcleo paraventricular talámico (f) de ratas Wistar sometidas a oscuridad continua (barras claras) y de ratas que recibieron un pulso de luz en tres diferentes fases circadianas (barras negras).

Cuando se analizó la inducción fónica de c-Fos en las otras estructuras cerebrales que reciben información visual se observó, que todas estas estructuras mostraban un incremento en la cantidad de c'IR a c-Fos como respuesta a la aplicación del pulso de luz, pero no se encontraron variaciones de acuerdo a la hora circadiana en la que fue aplicado el pulso de luz.

[C] Inducción Fótica de c-Fos y Jun-b en el NSQ de Ratas Intactas

Con la finalidad de poder establecer con mayor precisión la fase del NSQ a nivel celular, esta parte del estudio la enfocamos a analizar la inducción fótica de dos diferentes marcadores de activación celular en el NSQ de ratas intactas. Esto se realizó con el propósito de determinar si existía una expresión diferencial de las proteínas c-Fos y Jun-b por la aplicación de pulsos de luz en diferentes fases circadianas.

Para tal efecto, un grupo de ratas intactas (n=16) fueron alojadas en cajas de acrílico transparente individuales (40 x 25 x 20 cm) y bajo iluminación roja constante (50 lux) fue monitoreado el ritmo de ingesta de agua por lo menos durante 15 días o bien hasta que los animales exhibieran el estado estable en la oscilación espontánea. Posteriormente fue determinado CT 12 de la forma previamente descrita y los animales fueron asignados aleatoriamente a los siguientes grupos: [1] Grupo de ratas recibió un pulso de luz en la zona de retrasos de fase (CT 13+), [2] un grupo testigo al cual no se le administró el pulso de luz (CT 13-), [3] grupo que recibió el pulso de luz en la zona de avances de fase (CT 23+), y [4] su grupo testigo que no recibió el pulso del luz (CT 23-).

Inmediatamente después de la aplicación del pulso de luz o bien en la hora circadiana establecida, los animales fueron anestesiados y profundidos. Una vez obtenidos los cerebros, estos fueron procesados de forma simultánea para la detección inmunohistoquímica para c-Fos (1:2,500) y Jun-b (1:20,000) en el NSQ, de tal forma que de cada sujeto fue obtenida la expresión de estas dos proteínas. Posteriormente se realizó el análisis estereológico en la forma descrita previamente. Este análisis, que la administración de pulsos de luz en la zona de retrasos de fase de la CRF (CT 13) produjo un incremento significativo en el número total de células inmunopositivas c-Fos ($F = 8.4$, $p < .05$) estimadas en todo el NSQ en relación a animales que no recibieron pulso de luz (Tabla 2). Cuando analizamos la

expresión de esta proteína en las diferentes regiones del NSQ, encontramos que el incremento de c-Fos ocurrió predominantemente en la región ventral y central del núcleo (Fig. 23), la región dorsal no exhibió cambios significativos asociados a la aplicación del pulso de luz en CT 13.

Tabla 2.- Resultados del análisis esterológico de la inducción fótica de *c-Fos* y *Jun-b* en el NSQ de ratas intactas, en los que se obtuvo el Volumen de referencia (V_{ref}), la densidad de células inmunopositivas (NV) y también se estimó el total de células positivas en todo el NSQ (N). Esto se realizó en animales que recibieron un pulso de luz en la zona de retrasos descrita de fase (CT 13+) y en la zona de avances de fase (CT 23+) de la curva de respuestas de fase, así como en animales controles que no recibieron el pulso de luz (CT 13 y CT 23, respectivamente). * indica $p < .05$ entre controles y animales que recibieron pulsos de luz; † indica $p < .05$ entre animales con pulso de luz en CT 13 y CT 23.

c-Fos	V_{ref} (mm ³)	NV (neuronas/mm ³)	N (mm ³)
CT 13	0.029 ± 0.003	41927.1 ± 11193.2	1257.0 ± 333.3
CT 13+	0.026 ± 0.002	115191.0 ± 19906.3	3050.5 ± 521.5 *
CT 23	0.027 ± 0.003	60677.1 ± 18224.2	1300.2 ± 486.0
CT23+	0.031 ± 0.007	193923.6 ± 36833.0	7766.6 ± 2460.2*†
Jun-b			
CT 13	0.029 ± 0.003	13628.5 ± 2537.7	381.8 ± 36.2
CT 13+	0.026 ± 0.002	43316.0 ± 6857.8	1117.7 ± 129.6*
CT 23	0.027 ± 0.003	23784.7 ± 11892.0	335.5 ± 107.9
CT23+	0.031 ± 0.007	46961.8 ± 11969.4	1839.5 ± 673.0*

Encontramos una tendencia similar en la expresión de Jun-b (Tabla 2), en donde el pulso de luz indujo un incremento significativo ($F= 24.9$, $p<.001$) en el número de células inmunopositivas, este incremento se encontró en las regiones ventral y central del NSQ (Fig. 24).

En la hora circadiana 23, la administración del pulso de luz también indujo un incremento significativo en el número total de células inmunopositivas a c-Fos ($F= 5.2$, $p<.05$) en el NSQ en relación a los animales que no fueron expuestos al pulso de luz (Tabla 2). Este incremento en la expresión predominantemente ocurrió en las regiones ventral y central del NSQ (Fig. 23). En la expresión de Jun-b encontramos una tendencia similar en esta hora circadiana, en donde hay un notorio incremento en el número de células inmunoreactivas ($F=4.3$, $p<.05$), pero este incremento solo se observó en la región ventral del NSQ (Fig. 24).

Vale la pena mencionar que en estos experimentos la expresión de c-Fos inducida por el pulso de luz en la zona de avances de fase fue significativamente mayor ($F=5.18$, $p<.05$) al observado en la zona de retrasos de fase (CT 13). Mientras que la inducción fótica de Jun-b no se observaron diferencia en las dos zonas de respuesta de la CRF bajo estudio (Tabla 2, Fig. 25).

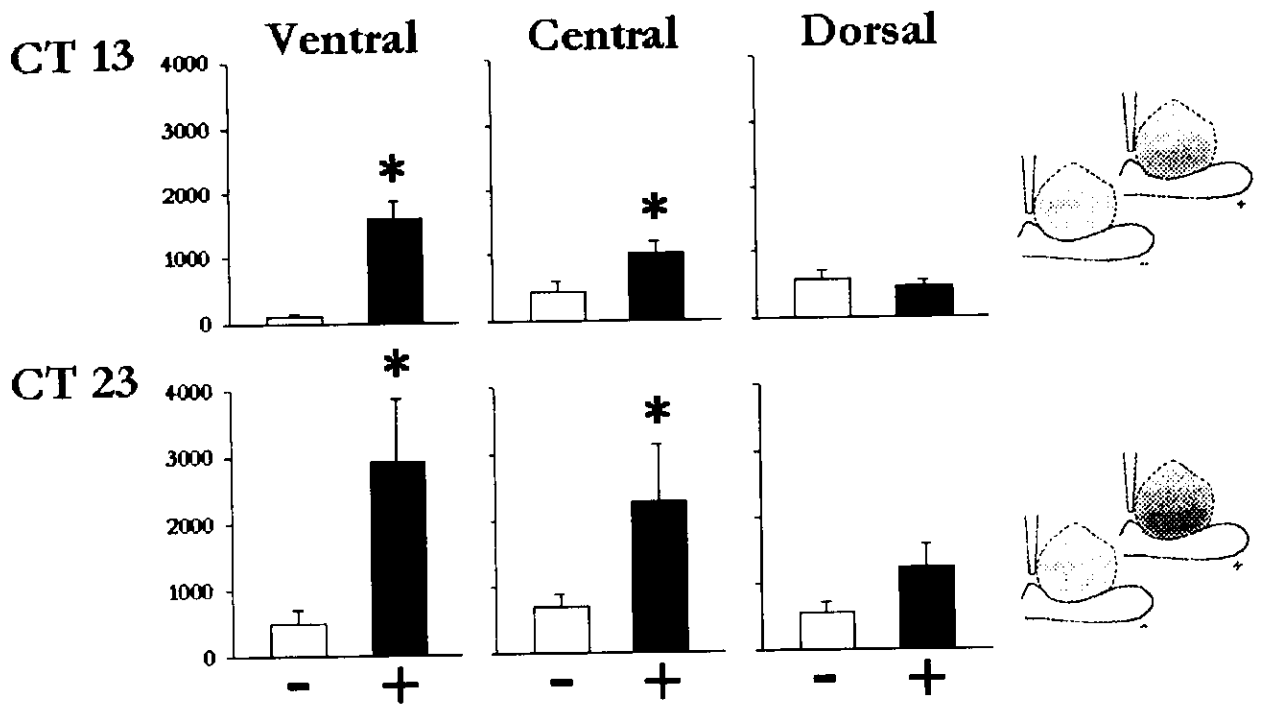


Fig. 23.- Número de células inmunopositivas (Media \pm Error estándar) a *c-Fos* en las diferentes regiones del NSQ de ratas intactas que recibieron un pulso de luz (+) y sus controles que no recibieron el estímulo fótico (-) en la zona de retrasos (CT 13) y avances (CT 23) de fase de la curva de respuestas de fase. En los esquemas se representa al NSQ y la expresión observada en cada grupo de animales. * indica $p < .05$ entre animales controles y que recibieron el pulso de luz.

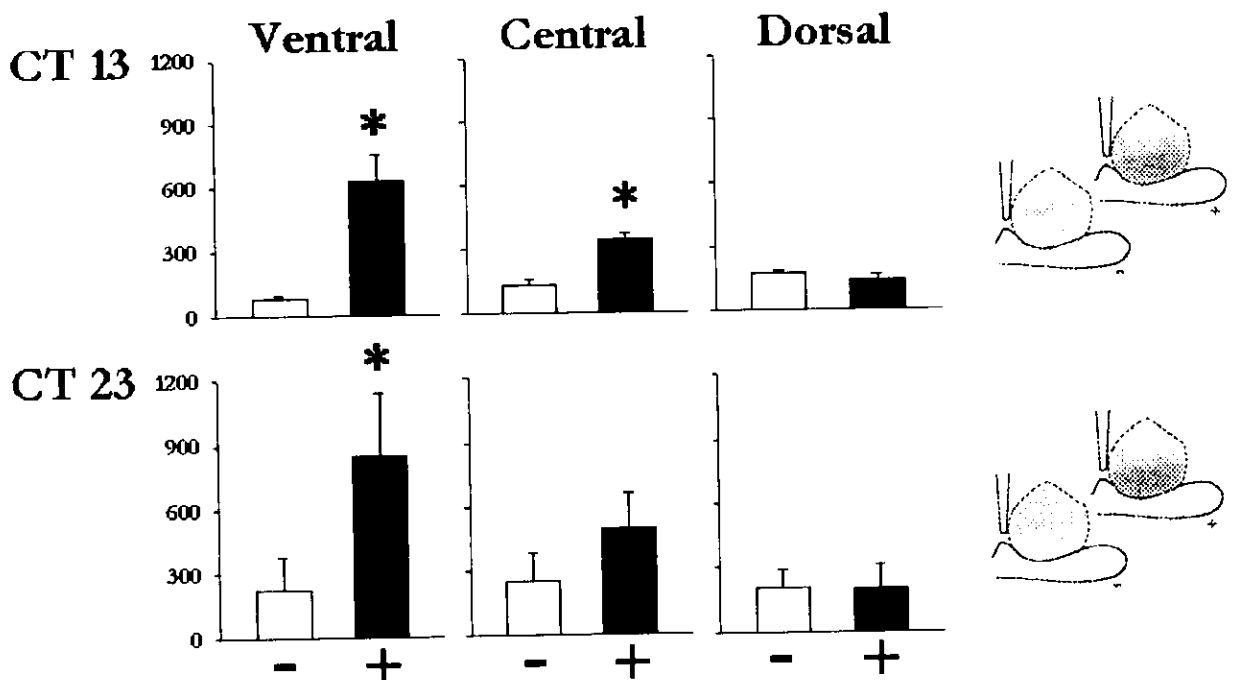


Fig. 24.- Número de células inmunopositivas (Media \pm Error estándar) a *Jun-b* en las diferentes regiones del NSQ de ratas intactas que recibieron un pulso de luz (+) y sus controles que no recibieron el estímulo fótico (-) en la zona de retrasos (CT 13) y avances (CT 23) de fase de la curva de respuestas de fase. En los esquemas se representa al NSQ y la expresión observada en cada grupo de animales. * indica $p < .05$ entre animales controles y que recibieron el pulso de luz.

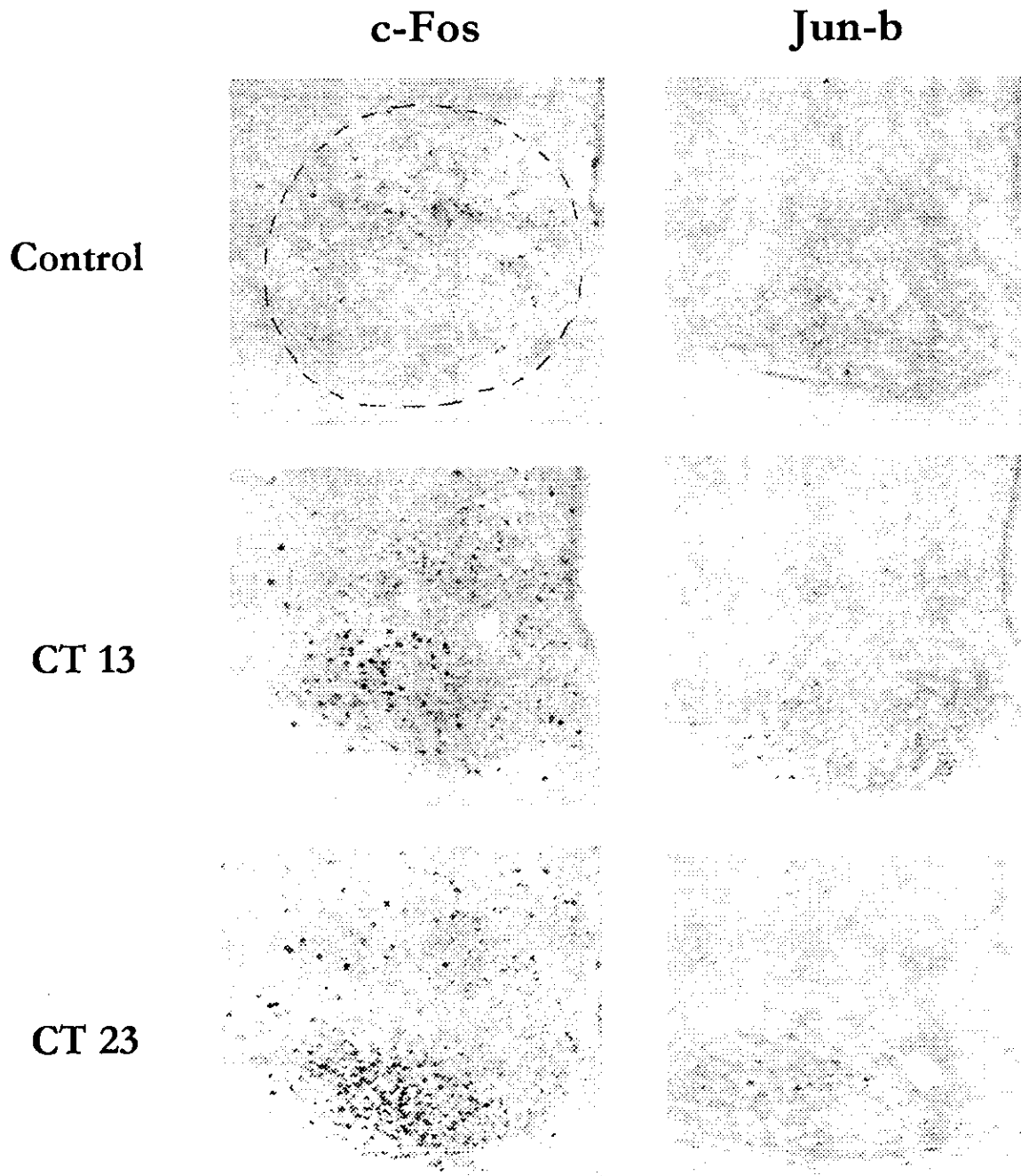


Fig. 25.- Expresión de *c-Fos* y de *Jun-b* en NSQ de ratas Wistar. En la parte superior se muestra 1 expresión basal de estas dos proteínas bajo condiciones constantes de iluminación roja tenue (5 lux). En las imágenes centrales e inferiores, se muestra la inducción de estas dos proteínas por pulsos de luz (400 lux intensidad, 1 h de duración) en la zona de retrasos (CT 13) y avances (CT 23 de fase de la curva de respuestas de fase.

[D] Protocolo de doble pulso de luz en ratas intactas

Con la finalidad de determinar la velocidad de reinicio del marcapasos circadiano inducido por un pulso de luz, mapeando su posición en la CRF implementamos y validamos un *protocolo de dobles pulsos de luz*. En este protocolo se asume que la forma inicial de la CRF se conserva por el pulso inicial, de tal forma que esta es utilizada para predecir cómo el reloj podía responder ante un segundo pulso de luz de la misma duración e intensidad.

Para elaborar este protocolo, fueron tomadas en consideración las características de la CRF por pulsos de luz para nuestra cepa de animales (Salazar-Juárez y Aguilar-Roblero 1997). Esta curva se caracteriza por presentar la ligeros o ningún cambio entre CT 01 y CT 07, el punto de transición a la región de retrasos de fase se encuentra en CT 08; esta región se extiende hasta CT 16. En CT 17 se observa una abrupta transición de retrasos a avances de fase, y a partir de esta hora circadiana se extiende la región de avances de fase hasta CT 00 (para mayor detalle ver ANEXO 2).

Para la implementación este protocolo, inicialmente se realizó en ratas adultas intactas (n=64), los cuales fueron aleatoriamente asignados a uno de ocho grupos experimentales.

La primera serie de experimentos fueron diseñados para determinar el efecto de los pulsos de luz en la dirección del cambio de fase, por lo que decidimos trabajar en el punto de transición de la CRF en el que cambia la dirección de los cambios de fase para tal efecto fueron utilizados tres grupos de animales:

- A el primer grupo de ratas se les aplicó el primer pulso de luz en CT 12, seguido del pulso de prueba en CT 17 (Fig. 26-1a). En este caso se asumió que la aplicación del primer pulso de luz en CT 12 indujo un retraso de fase "instantáneo" de aproximadamente 2 h (tal como observa

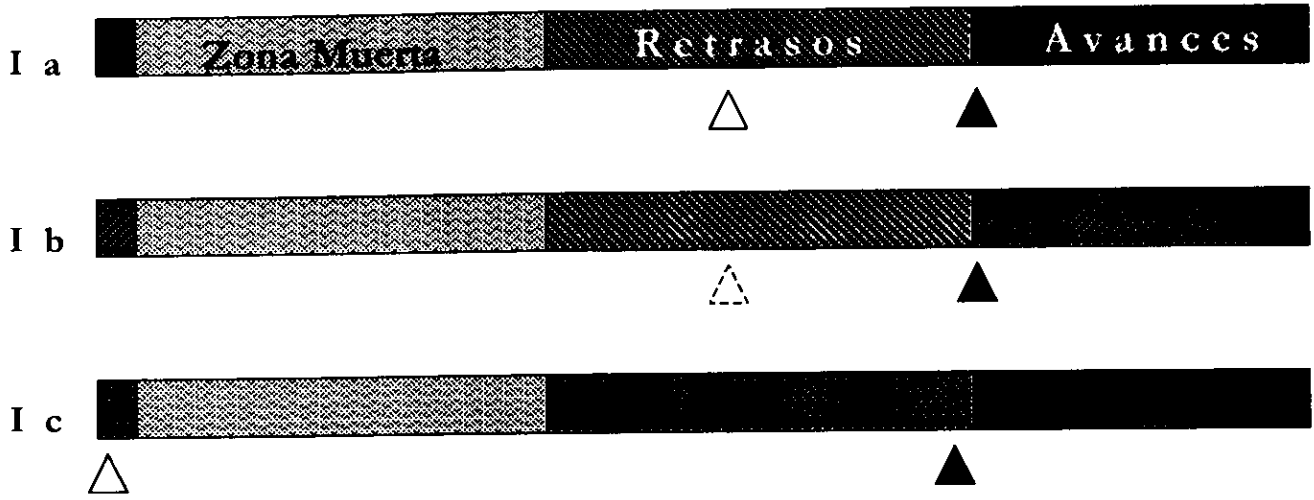
con la aplicación de un pulso de luz), de tal forma que la aplicación del pulso de prueba en CT 17 induciría bajo estas condiciones un retraso de fase en lugar del avance de fase normalmente inducido en esta hora circadiana.

Tal como se contemplaba en la predicción realizada, todos los animales de este grupo mostraron retrasos de fase (Fig. 27). Los cambios de fase inducidos fueron significativamente mayores ($F=141.23$, $p<0.0001$) a los obtenidos con un solo pulso de luz en CT 12 (-156 ± 7 min) o CT 15 (-95 ± 9 min), ya que en esta fase normalmente son inducidos avances de fase (para mayor detalle ver ANEXO 2).

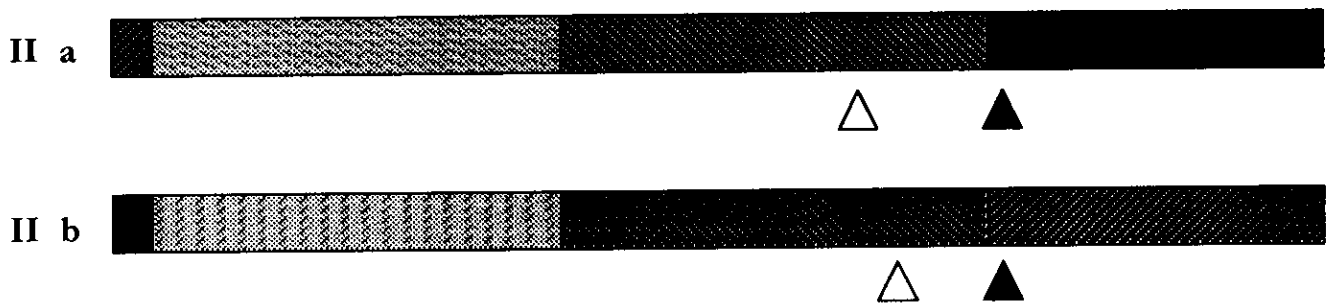
◆ Debido a que la aplicación de los pulsos de luz involucraba que los animales fueran removidos de sus cajas de registro para ser colocados en el dispositivo en el que estos eran aplicados, se utilizó un *grupo control* con la finalidad de determinar los efectos de esta manipulación sobre la fase del marcapaso. Para tal efecto los animales fueron colocados en el dispositivo de aplicación de pulsos de luz en CT 12 en el que permanecieron durante una hora pero no les fue administrado el pulso de luz (Fig. 26-Ib), posteriormente en CT 17 los animales fueron colocados de nueva cuenta en el dispositivo y se les administró el pulso de luz de la intensidad y duración previamente señalada.

En este grupo de animales se observó que el cambio de fase inducido fue de aproximadamente 1h 11min., magnitud similar a la obtenida por un pulso de luz en CT 17. Con base en estas observaciones sabemos que la manipulación de los animales para la administración de los pulsos de luz, no tiene ningún efecto en la fase del marcapasos circadiano.

Experimento I



Experimento II



Experimento III

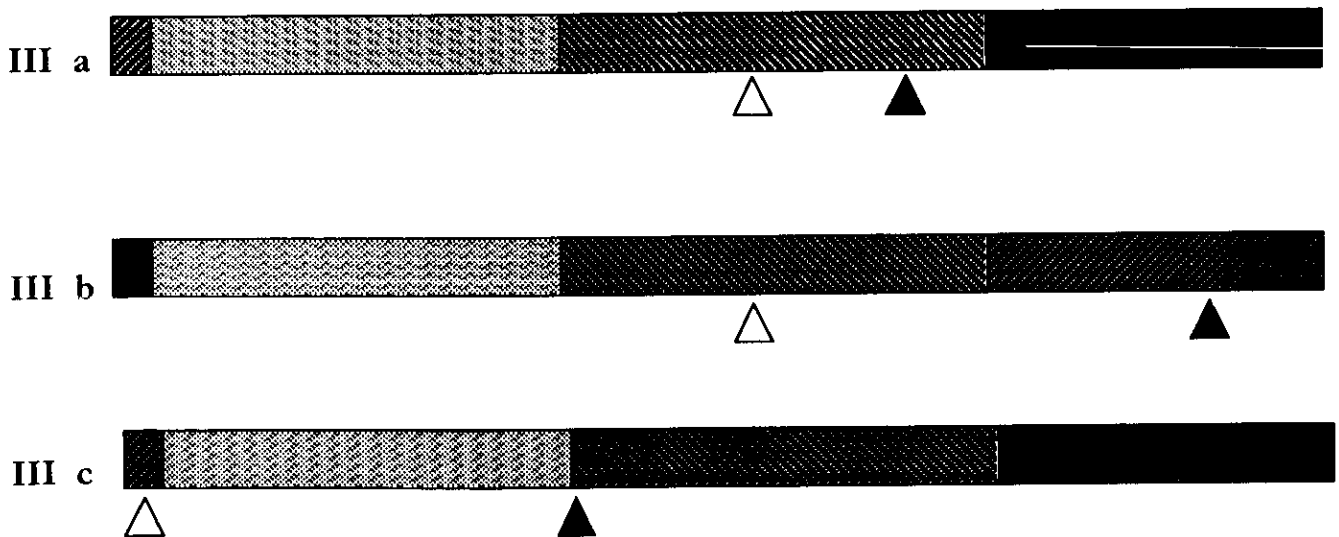


Fig. 26.- Resumen del diseño experimental de la obtención de las respuestas de fase en animales intactos. Las barras horizontales indican el ciclo circadiano, así como el día y la noche subjetiva. En los experimentos I, II y III se muestra el diseño del protocolo de dobles pulsos de luz, en donde el ciclo circadiano se encuentra dividido de acuerdo a las zonas de respuesta de la CRF. Los triángulos indican el momento en que los pulsos de luz fueron aplicados, el triángulo vacío indica el primer pulso de luz, mientras que el triángulo negro indica el pulso de prueba, en el grupo control el triángulo punteado indica que el animal fue colocado en la cámara de pulso de luz, pero que no recibió el estímulo fótico.

• Otro grupo de animales, recibieron el primer pulso en CT 23 y el pulso de prueba en CT 16 (Fig. 26-Ic). En este se esperaba que la aplicación del primer pulso de luz en CT 23 indujera un avance de fase "instantáneo" de aproximadamente 1 h 30 min., de tal forma que la aplicación del pulso de prueba en CT 16 induciría un avance de fase, en lugar del retraso de fase normalmente inducido en esta hora circadiana.

De acuerdo con nuestra predicción realizada, los dos animales bajo estudio mostraron avances de fase de aproximadamente 94 ± 12 min (Fig. 27), en lugar de los retrasos de fase que normalmente ocurren en CT 16 (-91 ± 8 min). Los cambios de fase exhibidos por este grupo fueron estadísticamente diferentes a los observados en CT 16, pero los cambios de fase fueron similares a los obtenidos en CT 17 que sería la fase esperada en el que el pulso de prueba fuera aplicado considerando que la fase del marcapaso había sido cambiada por el primer pulso (para mayor detalle ver ANEXO 2).

Por otra parte, se encontró un incremento en el número de ciclos transitorios en los animales que recibieron dobles pulsos de luz en comparación de los animales que recibieron un pulso de luz ($F= 20.74, p<0.05$).

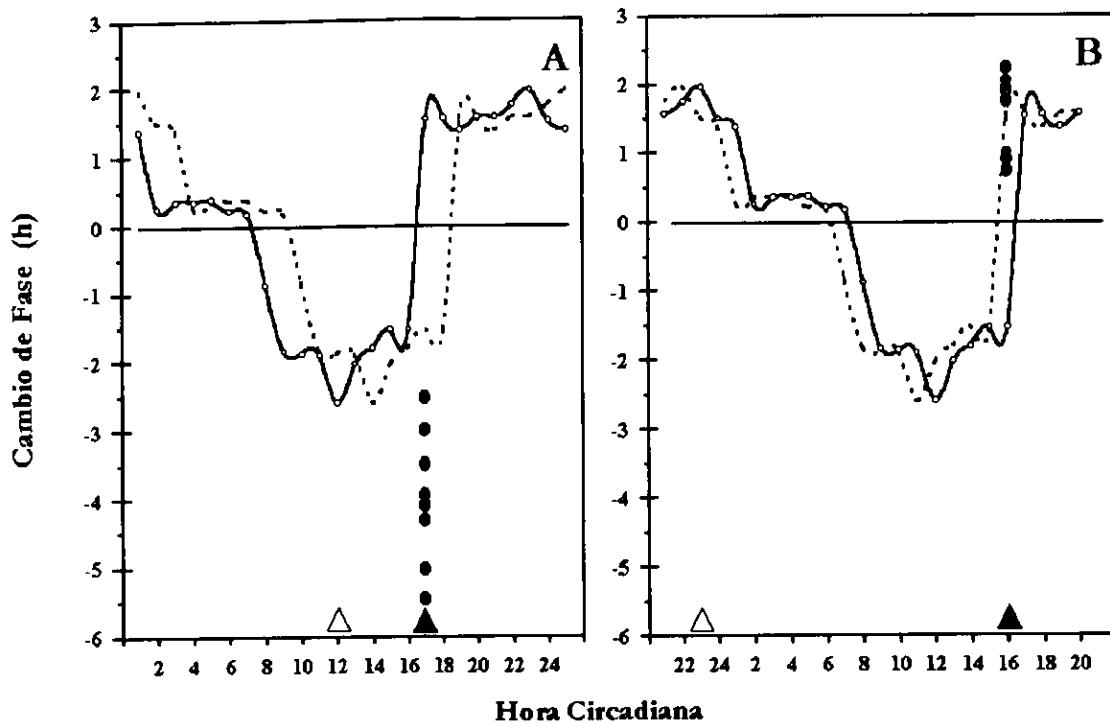


Fig. 27.- Respuestas de fase individuales (círculos) de ratas intactas en el protocolo de doble pulso de luz, en la figura A se muestran a los animales que recibieron el primer pulso de luz en CT 12 y el pulso de prueba en CT 17. En la gráfica B se muestran los cambios de fase exhibidos por los sujetos que recibieron el primer pulso de luz en CT 23 y el pulso de prueba en CT 16. La CRF predicha por un pulso (triángulo vacío) está indicado por la línea continua. La CRF predicha para el pulso de prueba (triángulo negro) considerando que el primer pulso había cambiado la fase del marcapaso, está indicada por la línea punteada.

En la *segunda serie de experimentos* se trató de discernir el intervalo mínimo requerido para cambiar la fase del marcapaso, para tal efecto se utilizaron dos grupos de ratas intactas, siguiendo el protocolo del experimento Ia.

- ◆ El primer grupo de estos recibió el primer pulso de luz en CT 15 y el pulso de prueba en CT 17 (Fig. 26-IIa). Mientras que otro grupo de ratas recibieron el primer pulso de luz 30 min. después, es decir, en CT 15.5 y el pulso de prueba en CT 17 (Fig. 26-IIb).

Estos grupos experimentales mostraron tendencias similares. En donde mostraron cambios en la dirección del cambio de fase inducido por el pulso de prueba en CT 17 cuando los animales fueron expuestos al

primer pulso de luz en CT 15 o CT 15.5 (Fig. 28). En el primer caso los retrasos de fase fueron de -210 ± 40 min, mientras que para los segundos los retrasos de fase fueron de -219 ± 17 min. La magnitud de estos cambios de fase fueron significativamente diferentes a los inducidos por pulsos únicos de luz en CT 14 y CT 16. Cabe hacer mención que la magnitud de los cambios de fase obtenidos en estos dos grupos de animales fueron similares a los obtenidos en el experimento previo del grupo CT 12 + 17.

En cuanto al número de ciclos transitorios requeridos por estos grupos de animales. En este caso no se observaron diferencias significativas en comparación de los transitorios exhibidos por pulsos únicos de luz a estas mismas horas circadianas. Pero en comparación al grupo CT 12 + CT 17, los transitorios requeridos por este grupo fueron menores (para mayor detalle ver ANEXO 2).

Finalmente, en la *tercera serie de experimentos* fueron diseñados para determinar el efecto de los dos pulsos de luz en la magnitud del cambio de fase, por lo que se utilizaron tres grupos de animales.

- El primer grupo de ratas recibieron dos pulsos de luz que producen cambios de fase en la misma dirección, es decir, ambos pulsos se administraron en la zona de retrasos de fase. El primer pulso se administró en CT 12 y el pulso de prueba en CT 16 (Fig. 26-IIIa). En este grupo se observó que todos los sujetos fueron inducidos retrasos de fase de mayor magnitud (-246 ± 17 min) en comparación a los inducidos por un solo pulso de luz en CT 12, como en CT 16 ($F=35.31$, $p<0.0001$).

- Un segundo grupo de animales recibieron pulsos de luz que producen cambios de fase con diferente dirección. El primer pulso se aplicó en CT 12 hora circadiana que corresponde a la zona de retrasos de fase,

mientras que el pulso de prueba se aplicó en CT 22 que corresponde a la zona de avances de fase (Fig. 26-IIIb).

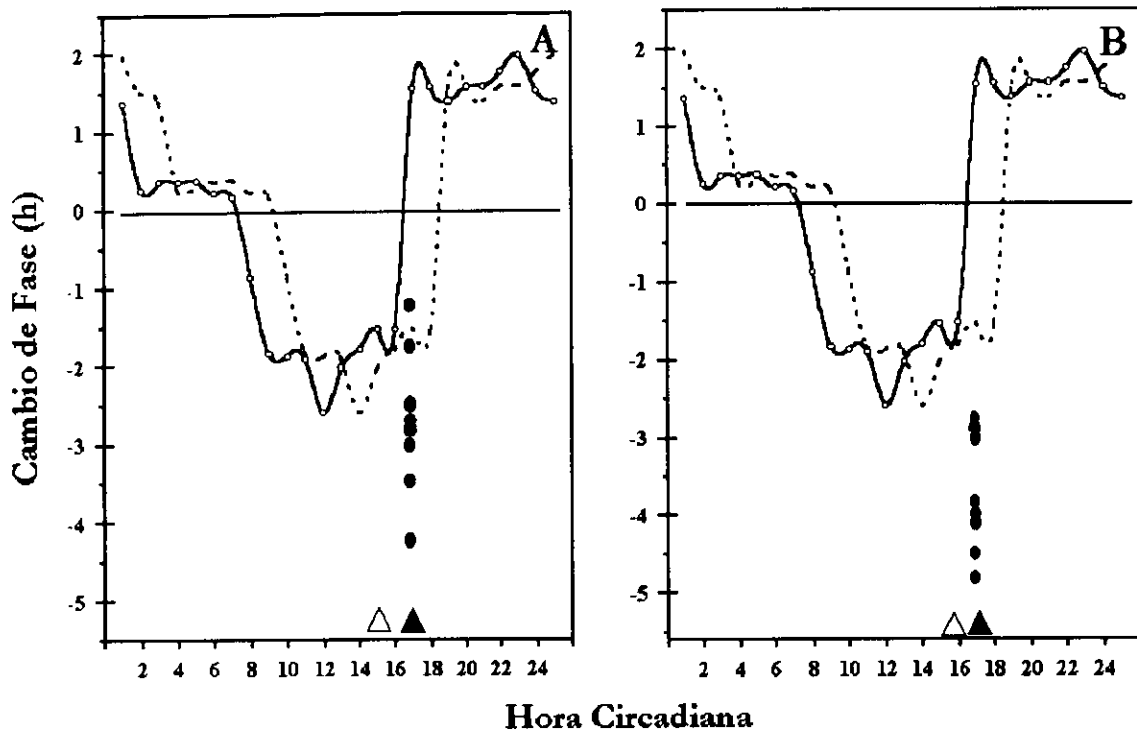


Fig. 28.- Respuestas de fase individuales (círculos) de ratas intactas en el protocolo de doble pulso de luz, en la figura A se muestran a los animales que recibieron el primer pulso de luz en CT 15 y el pulso de prueba en CT 17. En la gráfica B se muestran los cambios de fase exhibidos por los sujetos que recibieron el primer pulso de luz en CT 15.5 y el pulso de prueba en CT 17. La CRF predicha por un pulso (triángulo vacío) está indicada por la línea continua. La CRF predicha para el pulso de prueba (triángulo negro) considerando que el primer pulso había cambiado la fase del marcapaso, está indicada por la línea punteada.

En estos encontramos que seis de los 8 animales de este grupo mostraron avances de fase (Fig. 29) con una magnitud ligeramente menor a los cambios inducidos por un pulso de luz en CT 22 (110 ± 8 min). Los dos animales restantes mostraron retrasos de fase que van de 30 y 60 minutos respectivamente, hasta 2 horas.

• El último grupo de ratas recibieron pulsos de luz que inducen cambios de fase con dirección opuesta, pero en este caso el primer pulso fue aplicado en CT 23, hora circadiana que corresponde a la zona de avances de fase; mientras que el pulso de prueba se aplicó en CT 08, la cual forma parte de la zona de retrasos de fase (Fig. 26-IIIc).

De este grupo 7 de los 8 animales mostraron retrasos de fase ligeramente mayores (-88 ± 44 min; Fig. 29) a los obtenidos con un pulso de luz en CT 08 (-56 ± 5 min). Solo un sujeto de este grupo mostró un inusual avance de fase de 180 min.

Estos grupos de animales mostraron incrementos significativos en cuanto al número de ciclos transitorios requeridos con relación a los animales que recibieron un solo pulso de luz en la región de avances y de retrasos de fase.

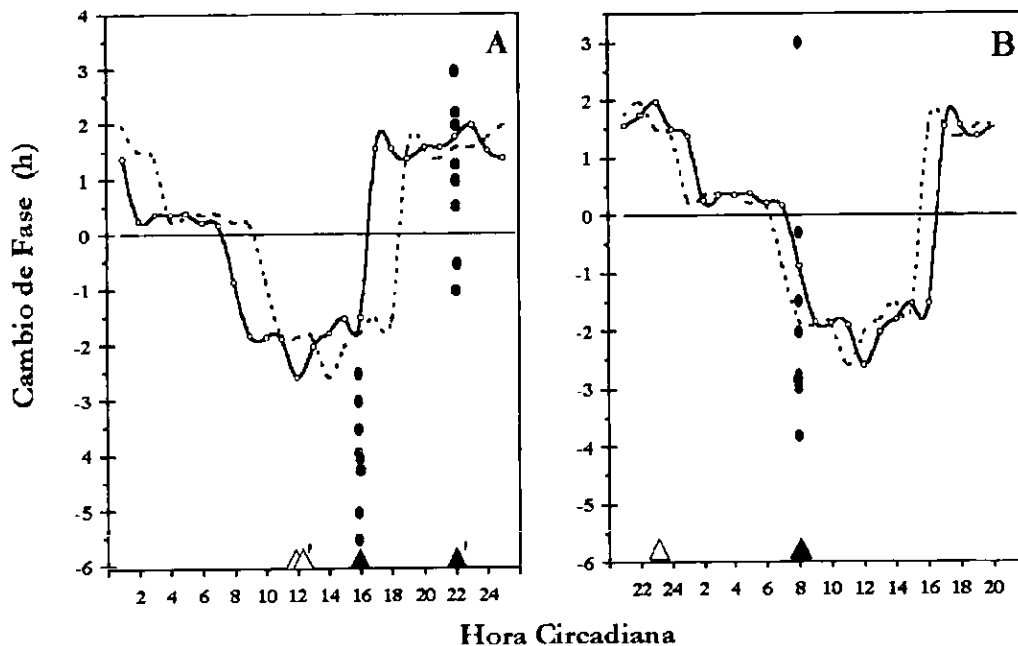


Fig. 29.- Respuestas de fase individuales (círculos) de ratas intactas en el protocolo de doble pulso de luz, en la figura A se muestran a los animales que recibieron el primer pulso de luz en CT 12 y el pulso de prueba en CT 16 o en CT 22. En la gráfica B se muestran los cambios de fase exhibidos por los sujetos que recibieron el primer pulso de luz en CT 23 y el pulso de prueba en CT 08. La CRF predicha por un pulso (triángulo vacío) está indicado por la línea punteada. La CRF predicha para el pulso de prueba (triángulo negro) considerando que el primer pulso había cambiado la fase del marcapaso, está indicada por la línea continua.

Respuestas de Fase en Ratas con Transplante de NSQ en el III V

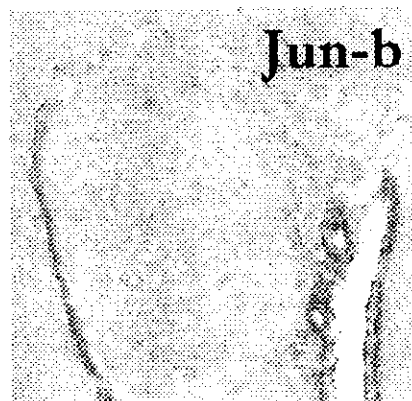
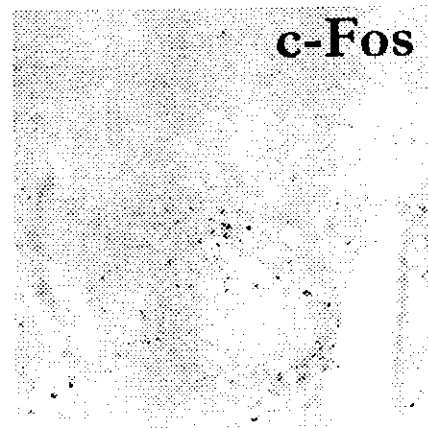
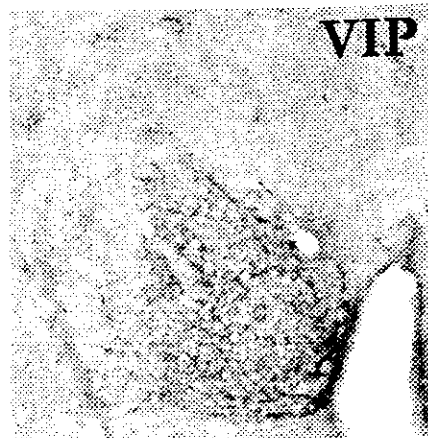
[A] Respuestas de fase a nivel conductual

Un total de 15 animales recibieron transplante de NSQ en el IIIV, lo cual fue corroborado mediante la detección inmunohistoquímica de fibras y neuronas inmunopositivas a VIP (Figs. 30 y 31).

Inicialmente fueron estudiadas las respuestas de fase por pulsos de luz en las dos zonas de respuesta de la CRF a nivel conductual. Para tal efecto los animales transplantados fueron asignados de forma aleatoria a dos grupos, por lo que 5 sujetos recibieron un pulso de luz en la zona de retrasos de fase (CT 13) y 6 sujetos recibieron un pulso de luz en la zona de avances de fase (CT 23) de la forma descrita previamente.

Para cuantificar el efecto del transplante de NSQ sobre las respuestas de fase inducidas por pulsos de luz, comparamos la magnitud y la dirección de los cambios de fase inducidos en animales intactos contra los animales con transplante de NSQ en el IIIV en las dos horas circadianas bajo estudio. En CT 13 la aplicación del pulso de luz indujo retrasos de fase en ambos grupos de animales, la magnitud de los cambios de fase observados fueron similares entre los animales transplantados y los intactos (Tabla 3, Figs. 32 y 33). Por el contrario, en CT 23 encontramos que los cambios de fase inducidos en los animales transplantados difieren tanto en la dirección, como en la magnitud del cambio de fase inducido en ratas intactas. La aplicación de pulsos de luz en CT 23 a los animales intactos produce avances de fase (Figs. 32 y 33), mientras que en los animales transplantados fueron inducidos en todos los casos retrasos de fase, este cambio entre sujetos intactos y transplantados es estadísticamente significativo ($F=18.10$, $p<.0001$).

A



B

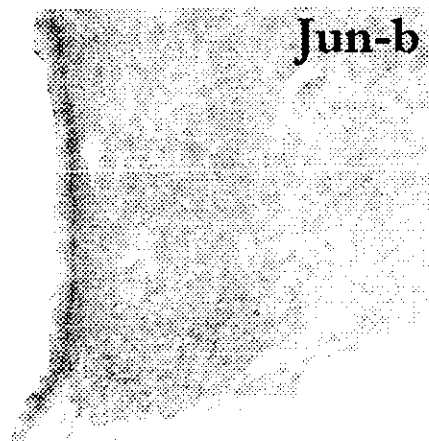
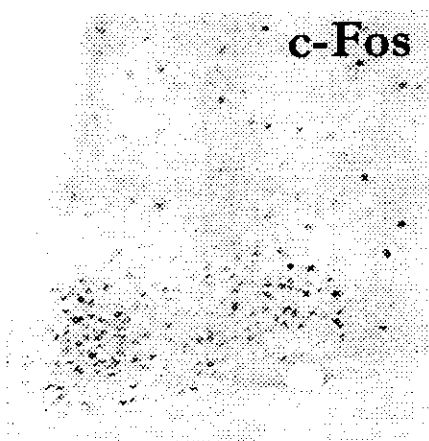


Fig. 30.- Fotografías de un sujeto representativo que recibió transplante de NSQ en el IIIIV. En el cual se muestra el NSQ transplantado (a) y el NSQ hospedero (b). En estas también se muestra la expresión de c-Fos y Jun-b inducidas por un pulso de luz en la zona de avances de fase (CT 13) de la curva de respuestas de fase.

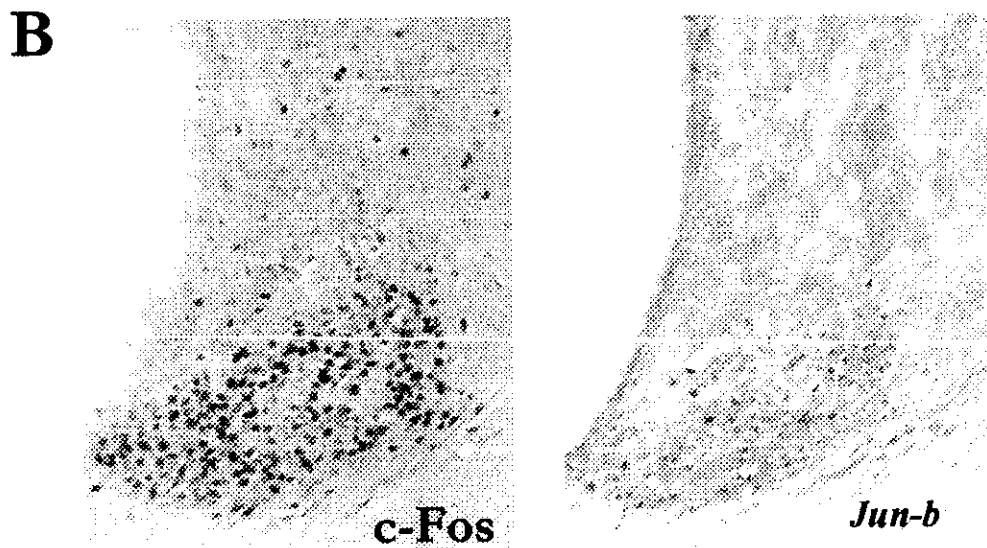
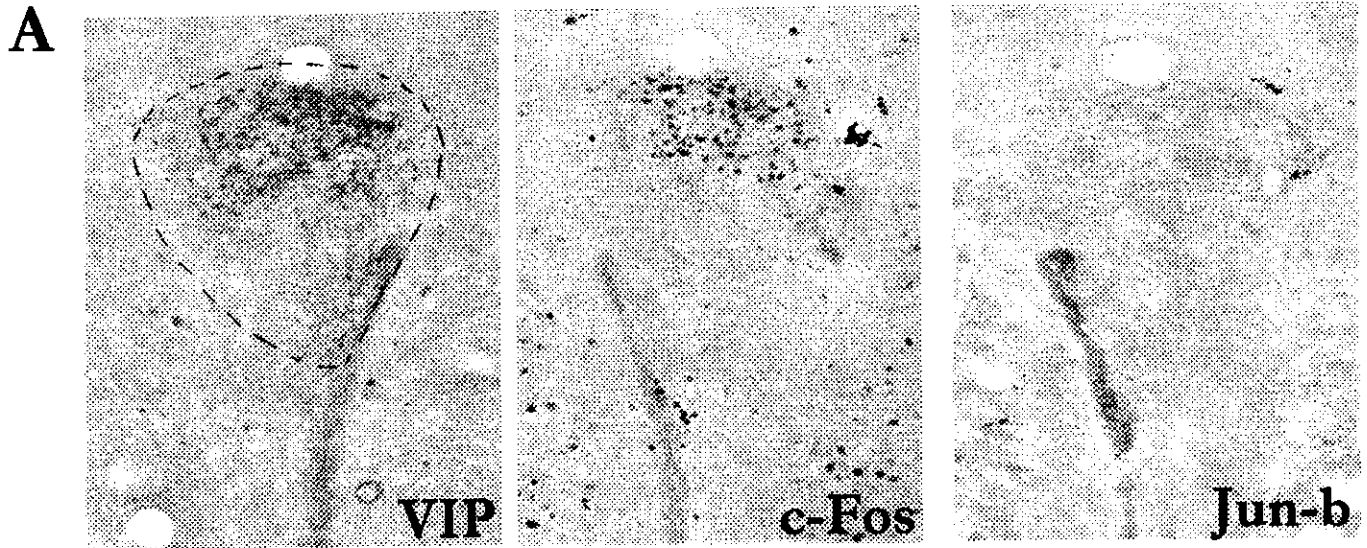


Fig. 31.- Fotografías de un sujeto representativo que recibió transplante de NSQ en el IIV. En el cual se muestra el NSQ transplantado (a) y el NSQ hospedero (b). En estas también se muestra la expresión de c-Fos y Jun-b inducidas por un pulso de luz en la zona de avances de fase (CT 23) de la curva de respuestas de fase.

Tabla 3.- Magnitud de los cambios de fase inducidos (Media \pm Error estándar) por pulsos de luz en la zona de retrasos (CT 13) y avances (CT 23) de fase de la curva de respuestas de fase en ratas intactas y en ratas que recibieron transplante de núcleo supraquiasmático en el tercer ventrículo (*T-NSQ IIIV*). * indica $p < .05$ entre animales intactos y transplantados.

	<i>CT 13</i>	<i>CT 23</i>
<i>INTACTOS</i>	$-02^h36^m \pm 00^h07^m$	$+01^h51^m \pm 00^h10^m$
<i>T-NSQ IIIV</i>	$-03^h40^m \pm 00^h48^m$	$-03^h34^m \pm 00^h46^m$ *

Con la finalidad de determinar si los cambios de fase observados en estos animales transplantados se debía al orden de aplicación de los pulsos de luz, se utilizaron los animales con transplante de NSQ en el IIIV restantes y mediante un diseño contrabalanceado se realizó la administración de los pulsos de luz. En este, dos animales recibió un pulso de luz en CT 13 de la misma intensidad y duración antes mencionada, aproximadamente 20 días después de la aplicación del primer pulso de luz, estos mismos animales recibieron un pulso de luz en CT 23. Los dos animales restantes recibieron un pulso de luz en CT 23, y aproximadamente 20 días después les fue aplicado otro pulso de luz en CT 13.

Los cambios de fase obtenidos con este diseño experimental fueron análogos en cuanto a su dirección y magnitud, a los mencionados previamente; por lo que descartamos la posibilidad de que el orden de administración de los pulsos de luz tuvieran algún efecto sobre los cambios de fase mostrados por animales con transplante de NSQ en el IIIV.

Además en las dos horas circadianas bajo estudio, se observó que los animales transplantados requirieron un mayor número de ciclos transitorios ($F = 16.32$, $p < .0001$) para adquirir el estado estable en oscilación espontánea en comparación a los animales intactos (Tabla 4).

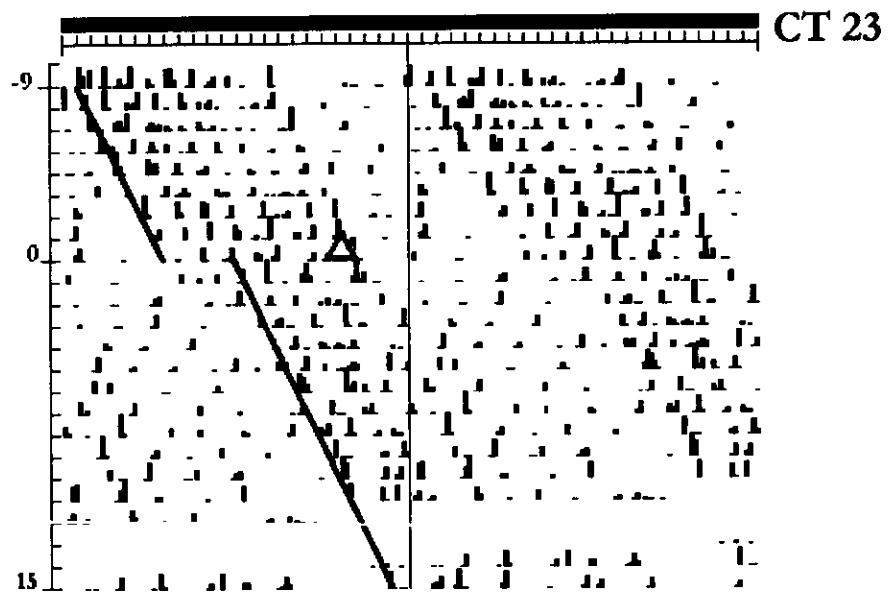
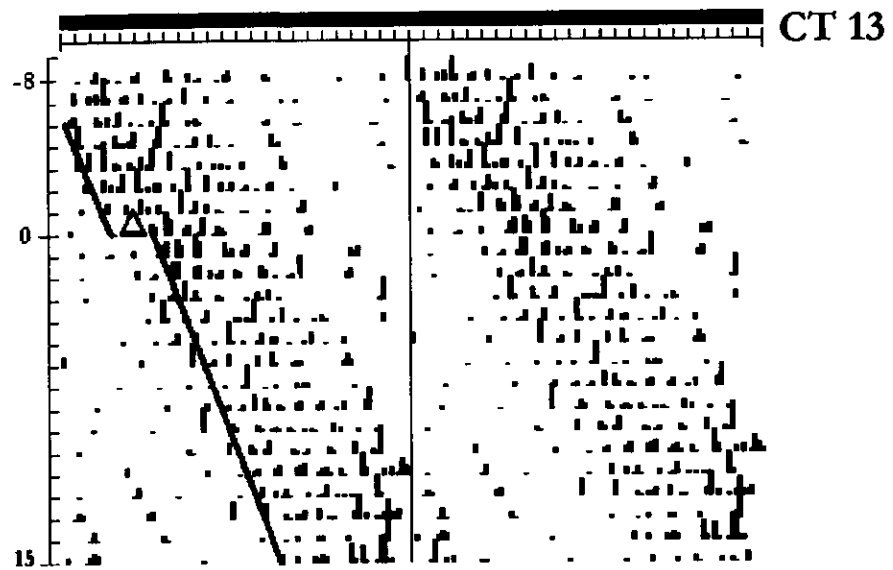


Fig. 32.- Actogramas representativos de los cambios de fase inducidos por pulsos de luz en la zona de retrasos de fase (CT 13) y en la zona de avances de fase (CT 23) de dos animales que recibieron transplante de NSQ en el IIIV.

Tabla 4.- Número de ciclos transitorios (Media \pm Error estándar) requeridos para alcanzar el estado estable, posterior a la aplicación de pulsos de luz en la zona de retrasos (CT 13) y avances (CT 23) de fase de la curva de respuestas de fase en ratas intactas y en ratas que recibieron transplante de núcleo supraquiasmático en el tercer ventrículo (*T-NSQ III*). * indica $p < .05$ entre animales intactos y transplantados.

	<i>CT 13</i>	<i>CT 23</i>
<i>INTACTOS</i>	1.7 \pm 0.39	2.7 \pm 0.61
<i>T- NSQ III</i>	5.5 \pm 0.53 *	7.0 \pm 0.63 *

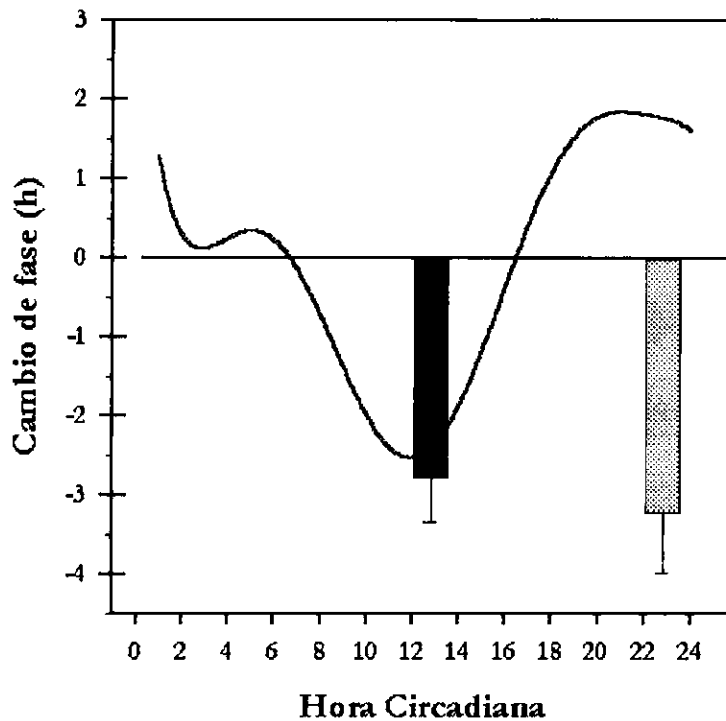


Fig. 33.- Dirección y magnitud de los cambios de fase inducidos por pulsos de luz en ratas con transplantes de NSQ en el IIIV (barras) en las dos zonas de respuestas de la curva de respuestas de fase, CT 13 (barra negra) y en CT 23 (barra gris). Con fines comparativos se muestra la curva de respuestas de fase en ratas intactas (línea)

[B] Respuestas de fase a nivel celular

Se realizó el análisis estereológico de la expresión de c-Fos y Jun-b en el *NSQ hospedero* y en el *NSQ transplantado* de este grupo de animales que recibieron transplante de NSQ en el tercer ventrículo (n=8).

Con la finalidad de establecer los efectos del NSQ transplantado sobre las respuestas de fase a nivel celular, se comparó la expresión de c-Fos y de Jun-b en el NSQ hospedero de este grupo transplantado contra animales intactos.

En este grupo encontramos que la administración de pulsos de luz durante la noche subjetiva indujo la expresión de la proteína c-Fos en el *NSQ hospedero* (Fig. 30 y 31).

La administración de pulsos de luz en CT 13 indujo un incremento significativo ($F=8.23$, $p<.05$) en el número total de células inmunopositivas a c-Fos estimadas en todo el NSQ hospedero en relación a los animales intactos (Tabla 5). Mientras que en CT 23 la aplicación del estímulo indujo una expresión similar entre ambos grupos de animales (Tabla 5).

En relación a la distribución espacial de las células inmunopositivas a Fos dentro del NSQ hospedero, se encontró que la aplicación del estímulo fótico en CT 13 indujo un incremento significativo ($F=7.82$, $p<.05$) en las regiones ventral y central del NSQ hospedero de los animales que recibieron el transplante de NSQ en el III V, en comparación de animales intactos que recibieron un pulso de luz en esta misma hora circadiana (Fig. 34). En CT 23 la distribución espacial de las células inmunopositivas en el NSQ hospedero fue similar a la observada en animales intactos (Fig.34).

En cuanto a la expresión de Jun-b en el *NSQ hospedero*, encontramos que la aplicación de pulsos de luz durante la noche subjetiva induce la expresión de esta proteína en el NSQ hospedero de los animales que recibieron transplante de NSQ en el III V (Fig. 30 y 31).

Tabla 5.- Resultados del análisis esterológico de la inducción fótica de *c-Fos* en el NSQ de ratas intactas (*INTACTAS*) y en el NSQ hospedero de ratas que recibieron un trasplante de NSQ en el tercer ventrículo (*T- NSQ IIIV*), en los que se obtuvo el Volumen de referencia (V_{ref}), la densidad de células inmunopositivas (*NV*) y también se estimó el total de células positivas en todo el NSQ (*N*). Esto se realizó en animales que recibieron un pulso de luz en la zona de retrasos de fase (**CT 13+**) y en la zona de avances de fase (**CT 23+**) de la curva de respuestas de fase. * indica $p < .05$ entre el grupo transplantado y el intacto.

CT 13

	$V_{ref}(mm^3)$	<i>NV</i> (neuronas/ mm^3)	<i>N</i> (mm^3)
<i>INTACTAS</i>	0.0263 ± 0.0023	115191.0 ± 19906.3	3050.5 ± 521.5
<i>T- NSQ IIIV</i>	0.0402 ± 0.00681	183507 ± 19830.9	$7619.9 \pm 1504.2 *$

CT 23

	0.0313 ± 0.0074	193923.6 ± 36833.0	7766.6 ± 2460.2
<i>INTACTAS</i>	0.0313 ± 0.0074	193923.6 ± 36833.0	7766.6 ± 2460.2
<i>T- NSQ IIIV</i>	0.0363 ± 0.01852	171094 ± 8955.3	7350.1 ± 515.8

En el análisis esterológico de la expresión de Jun-b en el hospedero de estos animales transplantados se encontró que la inducción fótica de esta proteína fue similar a la observada en animales intactos, tanto en el número de células inmunopositivas estimadas en todo el NSQ (Tabla 6), como en la distribución espacial de las células positivas a Jun dentro del NSQ en las dos horas circadianas bajo estudio (Fig. 35).

Con la finalidad de establecer las respuestas de fase en el *NSQ transplantado*, también se realizó el análisis esterológico de la inducción fótica de *c-Fos* y Jun-b en los animales con trasplante de NSQ en el IIIV.

Los resultados obtenidos en el NSQ transplantado fueron contrastados contra los resultados previamente mencionados en el NSQ hospedero de estos mismos animales. También fueron contrastados contra animales intactos que recibieron un pulso de luz en la misma hora circadianas y contra animales intactos que no recibieron el estímulo fótico.

Tabla 6.- Resultados del análisis esterológico de la inducción fótica de *Jun-b* en el NSQ de ratas intactas (*INTACTAS*) y en el NSQ hospedero de ratas que recibieron un trasplante de NSQ en el tercer ventrículo (*T- NSQ IIIV*), en los que se obtuvo el Volumen de referencia (V_{ref}), la densidad de células inmunopositivas (NV) y también se estimó el total de células positivas en todo el NSQ (N). Esto se realizó en animales que recibieron un pulso de luz en la zona de retrasos de fase (**CT 13+**) y en la zona de avances de fase (**CT 23+**) de la curva de respuestas de fase. * indica $p < .05$ entre el grupo transplantado y el intacto.

CT 13

	$V_{ref}(mm^3)$	NV (neuronas/ mm^3)	N (mm^3)
<i>INTACTOS</i>	0.0263 ± 0.0023	43316.0 ± 6857.8	1117.7 ± 129.6
<i>T- NSQ IIIV</i>	0.0402 ± 0.00681	43055.6 ± 34864.4	1242.3 ± 332.4

CT 23

	$V_{ref}(mm^3)$	NV (neuronas/ mm^3)	N (mm^3)
<i>INTACTOS</i>	0.0313 ± 0.0074	46961.8 ± 11969.4	1839.5 ± 673.0
<i>T- NSQ IIIV</i>	0.0363 ± 0.01852	43750 ± 491.1	1835.9 ± 173.2

En el análisis del NSQ transplantado encontramos un marcado decremento en el número total de células inmunopositivas a c-Fos ($F = 17.7$, $p < .005$) en comparación del NSQ hospedero (Tabla 7), en la dos fases circadianas bajo estudio (Fig. 30 y 31). De igual forma, el número de células inmunoreactivas a esta proteína en el NSQ transplantado (Tabla 7) fue significativamente inferior al encontrado en el NSQ de ratas intactas que recibieron el pulso de luz y al de ratas intactas a las que no les fue administrado el pulso de luz en esta hora circadiana (Tabla 2). Siendo que en ratas intactas la administración de pulsos de luz durante la noche subjetiva induce la expresión de esta proteína en el NSQ, observándose la máxima inducción de esta proteína en la zona de avances de fase. Por el contrario en el NSQ transplantado no se observó inducción fótica de c-Fos, además el número de células inmunopositivas a Fos fue inferior en la zona de avances de fase (CT 23), que en la zona de retrasos de fase (CT 13).

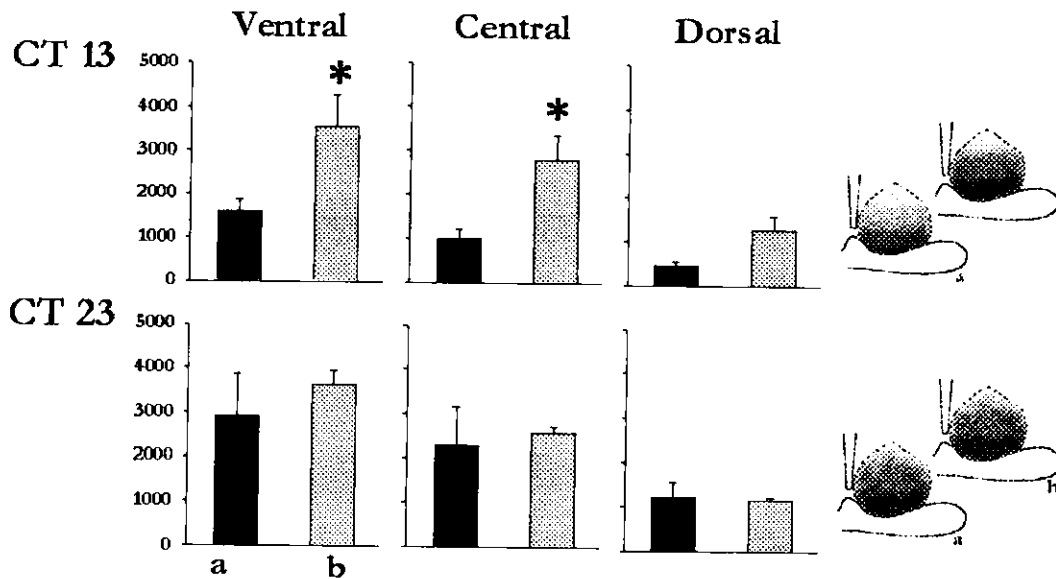


Fig. 34.- Número de células inmunopositivas (Media \pm Error estándar) a *c-Fos* en las diferentes regiones del NSQ hospedero de ratas intactas (a), que recibieron transplantes de corteza en el HIV (b), y transplante de NSQ en el HIV (c), a los cuales se les administró un pulso de luz en la zona de retrasos (CT 13) y avances (CT 23) de fase de la curva de respuestas de fase. En los esquemas se representa al NSQ y la expresión observada en cada grupo de animales. * indica $p < .05$ diferencias significativas entre animales transplantados e intactos.

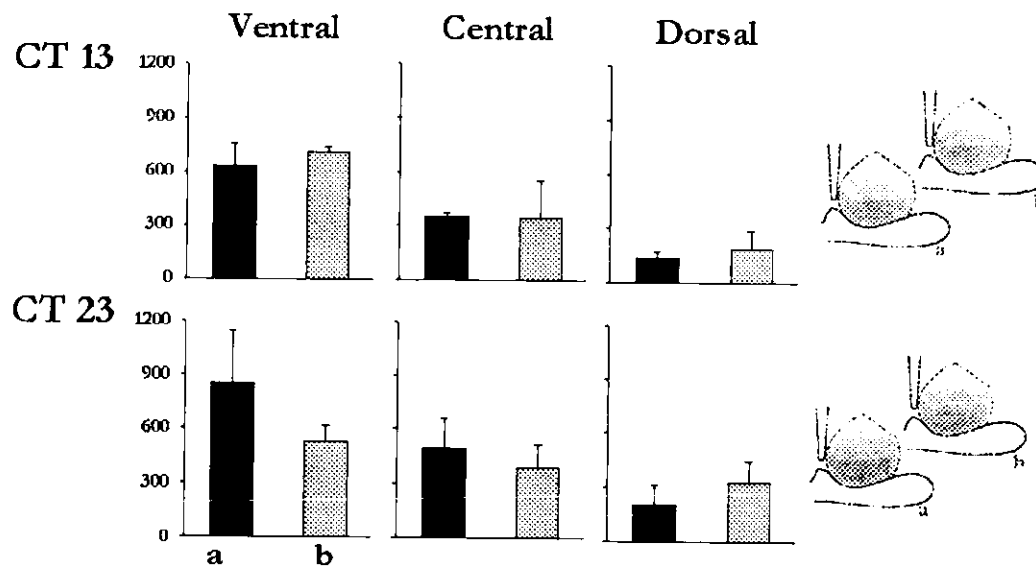


Fig. 35.- Número de células inmunopositivas (Media \pm Error estándar) a *Jun-b* en las diferentes regiones del NSQ hospedero de ratas intactas (a), que recibieron transplantes de corteza en el HIV (b), y transplante de NSQ en el HIV (c), a los cuales se les administró un pulso de luz en la zona de retrasos (CT 13) y avances (CT 23) de fase de la curva de respuestas de fase. En los esquemas se representa al NSQ y la expresión observada en cada grupo de animales. * indica $p < .05$ diferencias significativas entre animales transplantados e intactos.

Esta misma tendencia se observó en la inducción fótica de Jun-b en las dos zonas de respuesta de la CRF en el NSQ transplantado (Fig. 30 y 31), en donde el número total de células inmunopositivas a Jun-b del transplante fue significativamente inferior al encontrado en el NSQ hospedero, al de animales intactos que recibieron un pulso de luz y al de ratas intactas a las que no les fue administrado el pulso de luz (Tablas 2, 6 y 8).

Tabla 7.- Resultados del análisis esterológico de la inducción fótica de *c-Fos* en el NSQ transplantado en el tercer ventrículo, en los que se obtuvo el Volumen de referencia (V_{ref}), la densidad de células inmunopositivas (NV) y también se estimó el total de células positivas en todo el NSQ (N). Esto se realizó en animales que recibieron un pulso de luz en la zona de retrasos de fase (CT 13) y en la zona de avances de fase (CT 23) de la curva de respuestas de fase. * indica las diferencias significativas ($p < .05$) contra el NSQ hospedero de estos mismos animales, ratas intactas que recibieron un pulso de luz (Intacto +) y que no les fue administrado el estímulo fótico (Intacto -).

CT 13	V_{ref} (mm ³)	NV (neuronas/mm ²)	N	NSQ Hosp	Intacto +	Intacto -
T-NSQ IIV	0.0276 ± 0.0058	3044.1 ± 1899.5	100.8 ± 57.6	*	*	*
CT 23						
T-NSQ IIV	0.0168 ± 0.0074	520.8	29.7	*	*	*

Tabla 8.- Resultados del análisis esterológico de la inducción fótica de *Jun-b* en el NSQ transplantado en el tercer ventrículo, en los que se obtuvo el Volumen de referencia (V_{ref}), la densidad de células inmunopositivas (NV) y también se estimó el total de células positivas en todo el NSQ (N). Esto se realizó en animales que recibieron un pulso de luz en la zona de retrasos de fase (CT 13) y en la zona de avances de fase (CT 23) de la curva de respuestas de fase. * indica las diferencias significativas ($p < .05$) contra el NSQ hospedero de estos mismos animales, ratas intactas que recibieron un pulso de luz (Intacto +) y que no les fue administrado el estímulo fótico (Intacto -).

CT 13	V_{ref} (mm ³)	NV (neuronas/mm ²)	N	NSQ Hosp	Intacto +	Intacto -
T-NSQ IIV	0.0276 ± 0.0058	14055.8 ± 1462.3	411.6 ± 117.4	*	*	*
CT 23						
T-NSQ IIV	0.0168 ± 0.0074	10167.7 ± 2793.9	142.6 ± 43.1	*	*	*

Respuestas de Fase en Ratas con Transplante de Corteza en el III V

[A] Respuestas de fase a nivel conductual

Un total de 9 animales recibieron transplante de corteza en el IIIV, lo cual fue corroborado mediante la detección inmunohistoquímica de neuronas y fibras positivas a VIP. Se observaron algunas neuronas dispersas dentro del transplante inmunopositivas a VIP de forma ovoide y poliédricas (semejando a neuronas piramidales), pero en ninguno de los sujetos fueron observados cúmulos de neuronas o fibras inmunopositivas a VIP característicos en los animales que recibieron transplante de NSQ (Fig. 36 y 37). De estos sujetos fueron obtenidas las respuestas de fase por pulsos de luz sobre el ritmo de ingesta de agua, en las dos zonas de respuesta de la CRF.

Con la finalidad de cuantificar el efecto de trasplantes de tejido que no posee la capacidad de generar oscilaciones circadianas autosostenidas, sobre las respuestas de fase inducidas por pulsos de luz a nivel conductual; comparamos la magnitud y la dirección de los cambios de fase inducidos en las ratas que recibieron transplante de corteza en el IIIV contra ratas intactas.

La administración de pulsos de luz en la zona de retrasos de fase indujo cambios de fase con dirección adecuada en los animales que recibieron transplante de corteza (Fig. 38), la magnitud de los cambios de fase inducidos en este grupo de animales fueron similares a los observados en ratas intactas (Tabla 9). De igual forma, encontramos que la aplicación de pulsos de luz en la zona de avances de fase indujo cambios de fase en todos los animales transplantados con la misma dirección y similar magnitud a la observada en animales intactos (Fig. 39).

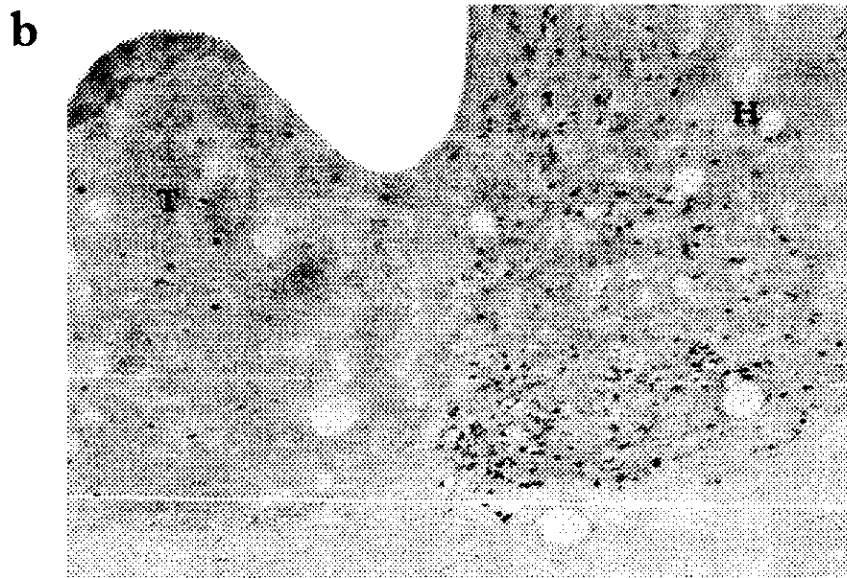
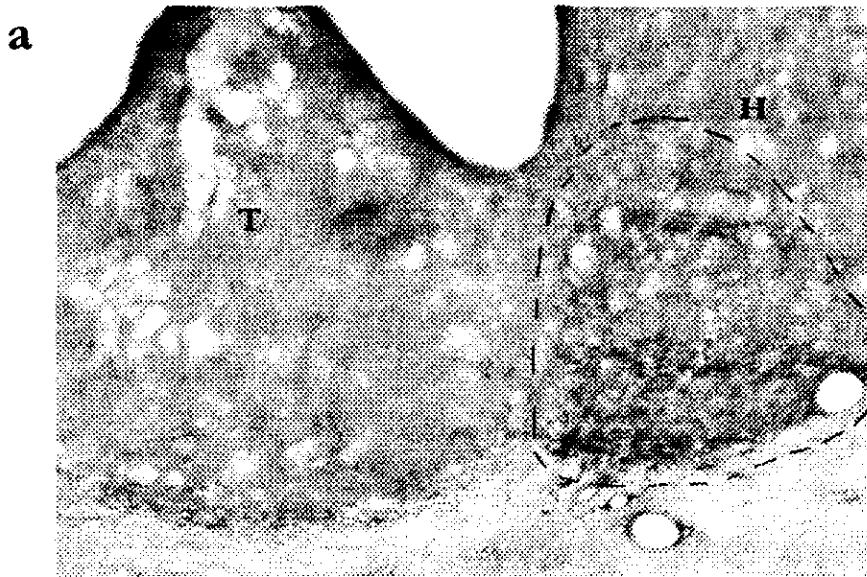


Fig. 36.- Fotografías de un sujeto representativo que recibió transplante de corteza en el tercer ventrículo. En el cual se muestra el tejido transplantado (T) y el NSQ hospedero (H). En estas también se muestra la expresión de VIP (a) y de c-Fos (b) inducida por un pulso de luz en la zona de retrasos de fase (CT 13) de la curva de respuestas de fase.

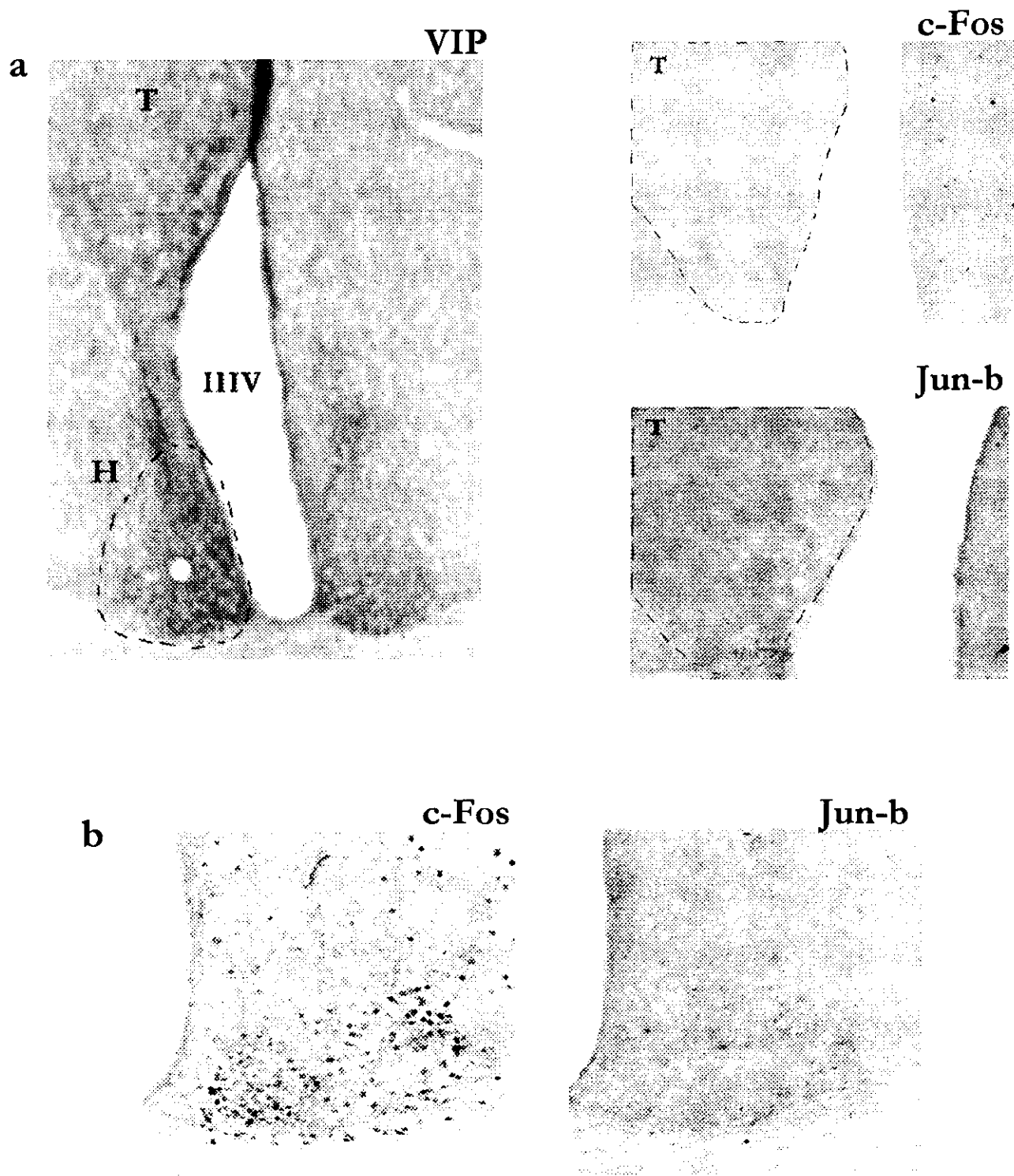


Fig. 32.- Fotografías de un sujeto representativo que recibió trasplante de corteza en el tercer ventrículo. En el cual se muestra el tejido transplantado (a) y el NSQ hospedero (b). En estas también se muestra la expresión de células y fibras inmunopositivas VIP en el NSQ hospedero y la ausencia de este cúmulo de este tipo de células en el trasplante. De igual forma se muestra la expresión de c-Fos y de Jun-b inducidas por un pulso de luz en la zona de avances de fase (CT 23) de la curva de respuestas de fase. La T indica el tejido transplantado y la H el NSQ hospedero.

Tabla 9.- Magnitud de los cambios de fase inducidos (Media \pm Error estándar) por pulsos de luz en la zona de retrasos (CT 13) y avances (CT 23) de fase de la curva de respuestas de fase en ratas intactas y en ratas que recibieron transplante de corteza en el tercer ventrículo (*T-Co IIIV*).

	<i>CT 13</i>	<i>CT 23</i>
<i>INTACTOS</i>	$-02^h36^m \pm 00^h07^m$	$+01^h51^m \pm 00^h10^m$
<i>T- Co IIIV</i>	$-02^h09^m \pm 00^h22^m$	$+01^h37^m \pm 00^h009^m$

En relación al número de ciclos transitorios requeridos para alcanzar el estado estable en la nueva fase, no se encontraron diferencias significativas entre los animales con transplante de corteza en el III V y los animales intactos (Tabla 10).

Tabla 10.- Número de ciclos transitorios (Media \pm Error estándar) requeridos para alcanzar el estado estable, posterior a la aplicación de pulsos de luz en la zona de retrasos (CT 13) y avances (CT 23) de fase de la curva de respuestas de fase en ratas intactas y en ratas que recibieron transplante de corteza en el tercer ventrículo (*T-Co IIIV*).

	<i>CT 13</i>	<i>CT 23</i>
<i>INTACTOS</i>	1.7 ± 0.39	2.7 ± 0.61
<i>T- Co IIIV</i>	2.5 ± 0.26	4.0 ± 0.25

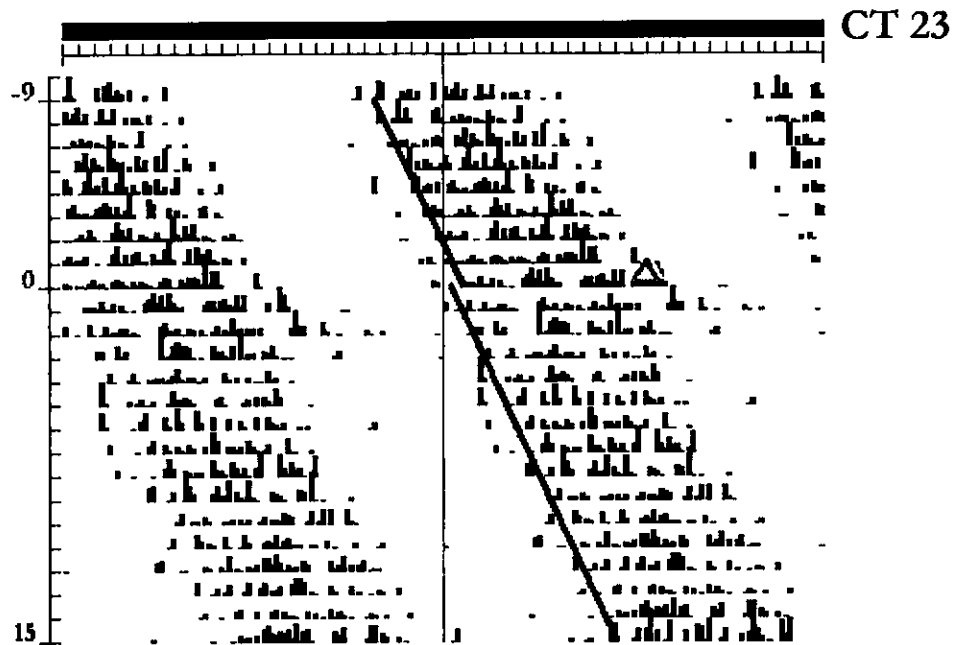
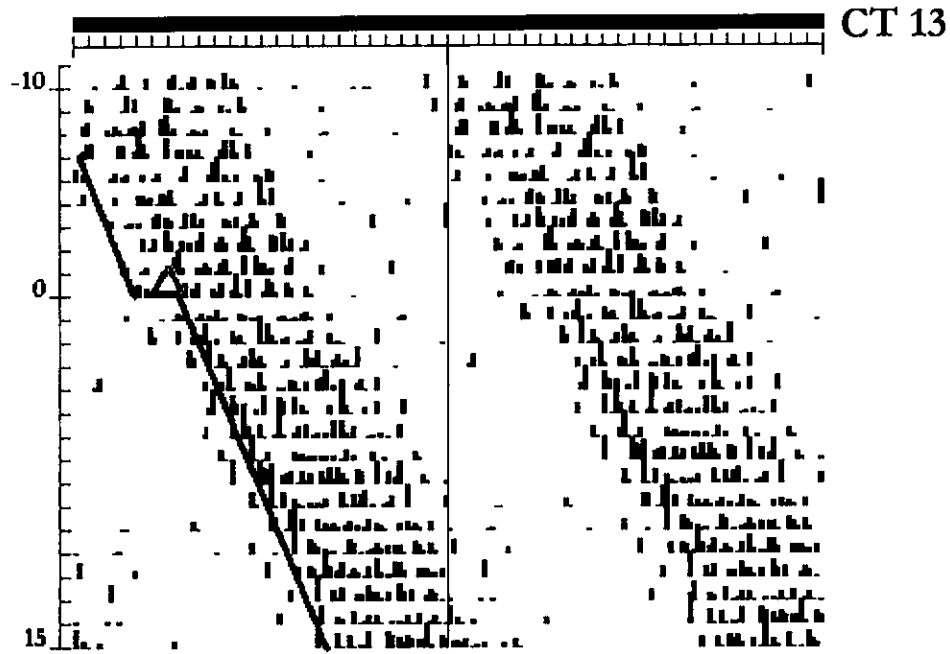


Fig. 38.- Actogramas representativos de los cambios de fase inducidos por pulsos de luz en la zona de retrasos de fase (CT 13) y en la zona de avances de fase (CT 23) de dos animales que recibieron transplante de Corteza en el IIIV.

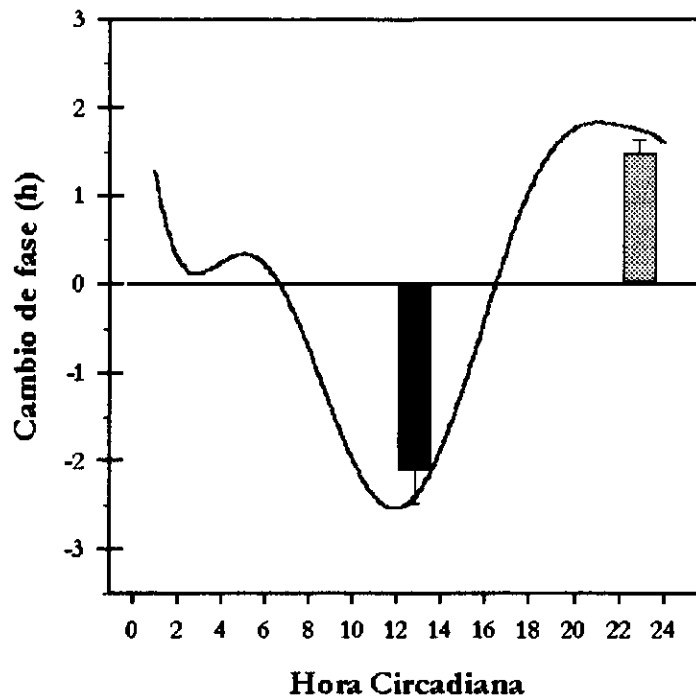


Fig. 39.- Dirección y magnitud de los cambios de fase inducidos por pulsos de luz en ratas con trasplantes de Corteza en el IIIV (barras) en las dos zonas de respuestas de la curva de respuestas de fase, CT 13 (barra negra) y en CT 23 (barra gris). Con fines comparativos se muestra la curva de respuestas de fase en ratas intactas (línea)

[B] Respuestas de fase a nivel celular

En este grupo de animales transplantados, también se realizó el estudio estereológico de la expresión de c-Fos y de Jun-b en el *NSQ hospedero* y en el *tejido transplantado* (n= 8). Para establecer los efectos asociados a la presencia del trasplante de corteza en elIIIV sobre las respuestas de fase a nivel celular, se contrastó la inducción fótica de estas proteínas en el NSQ hospedero de los animales transplantados contra la de animales intactos.

En general encontramos que la administración de pulsos de luz durante la noche subjetiva induce la expresión de la proteína c-Fos en el NSQ hospedero de los animales que recibieron el trasplante de corteza (Fig. 36 y 37) .

La administración de pulsos de luz en la zona de retrasos de fase produjo un incremento significativo ($F= 9.14, p<.05$) en el número total de células

inmunopositivas a Fos estimadas en todo el NSQ hospedero en relación a los intactos (Tabla 11). Este incremento ocurrió exclusivamente en la región ventral del NSQ hospedero (Fig. 40). Por el contrario, en la zona de avances de fase la expresión de c-Fos en estas ratas con trasplante de corteza, fue similar a la encontrada en el NSQ de animales intactos, tanto en el número total de células inmunopositivas estimadas en todo el núcleo (Tabla 11), como en la distribución espacial de estas (Fig. 40).

Tabla 11.- Resultados del análisis esterológico de la inducción fótica de *c-Fos* en el NSQ de ratas intactas (*INTACTAS*), y en el NSQ hospedero de ratas que recibieron trasplantes de corteza en el tercer ventrículo (*T- Co III*), en los que se obtuvo el Volumen de referencia (V_{ref}), la densidad de células inmunopositivas (NV) y también se estimó el total de células positivas en todo el NSQ (N). Esto se realizó en animales que recibieron un pulso de luz en la zona de retrasos de fase (**CT 13+**) y en la zona de avances de fase (**CT 23+**) de la curva de respuestas de fase. * indica $p < .05$ entre el grupo transplantado y el intacto.

CT 13

	$V_{ref}(mm^3)$	NV (neuronas/ mm^3)	N (mm^3)
<i>INTACTAS</i>	0.0263 ± 0.0023	115191.0 ± 19906.3	3050.5 ± 521.5
<i>T- Co III</i>	0.0474 ± 0.00083	126389 ± 18711.4	5970.0 ± 627.8 *

CT 23

	$V_{ref}(mm^3)$	NV (neuronas/ mm^3)	N (mm^3)
<i>INTACTAS</i>	0.0313 ± 0.0074	193923.6 ± 36833.0	7766.6 ± 2460.2
<i>T- Co III</i>	0.0387 ± 0.00422	141493 ± 27866.6	6326.3 ± 1448.6

Debido a que la inducción fótica de Jun-b fue estudiada únicamente en dos sujetos que recibieron trasplante de Corteza en el IIIV, no fue posible realizar el análisis estadístico de los datos, por lo que solamente se hará mención de una tendencia general. En relación a la foto inducción de la proteína Jun-b, encontramos que la administración de pulsos de luz durante la noche subjetiva

indujo la expresión de esta proteína en el NSQ del hospedero (Fig. 36 y 37). En donde el número total de células inmunopositivas, fue similar al encontrado en animales intactos en las dos horas circadianas bajo estudio (Tabla 12). De igual forma, la distribución espacial de las células inmunoreactivas fue similar entre el grupo transplantado y el grupo de animales intactos (Fig. 41).

Tabla 12.- Resultados del análisis esterológico de la inducción fótica de *Jun-b* en el NSQ de ratas intactas (*INTACTAS*), y en el NSQ hospedero de ratas que recibieron trasplantes de corteza en el tercer ventrículo (*T- Co IIIV*), en los que se obtuvo el Volumen de referencia (V_{ref}), la densidad de células inmunopositivas (*NV*) y también se estimó el total de células positivas en todo el NSQ (*N*). Esto se realizó en animales que recibieron un pulso de luz en la zona de retrasos de fase (**CT 13+**) y en la zona de avances de fase (**CT 23+**) de la curva de respuestas de fase. * indica $p < .05$ entre el grupo transplantado y el intacto.

CT 13

	$V_{ref}(mm^3)$	<i>NV</i> (neuronas/ mm^3)	<i>N</i> (mm^3)
<i>INTACTOS</i>	0.0263 ± 0.0023	43316.0 ± 6857.8	1117.7 ± 129.6
<i>T- Co IIIV</i>	0.0474 ± 0.00083	21527.8	991.1

CT 23

<i>INTACTOS</i>	0.0313 ± 0.0074	46961.8 ± 11969.4	1839.5 ± 673.0
<i>T- Co IIIV</i>	0.0387 ± 0.00422	3263839	1616.6

Con la finalidad de establecer las respuestas de fase en el *tejido transplantado*, también se realizó el análisis estereológico de la inducción fótica de *c-Fos* y *Jun-b* en este grupo de animales con trasplante de corteza. Los resultados obtenidos en el tejido transplantado fueron contrastados contra los resultados previamente mencionados en el NSQ hospedero de estos mismos animales. También fueron contrastados contra animales intactos que recibieron un pulso de luz en la misma hora circadianas y contra animales intactos que no recibieron el estímulo fótico.

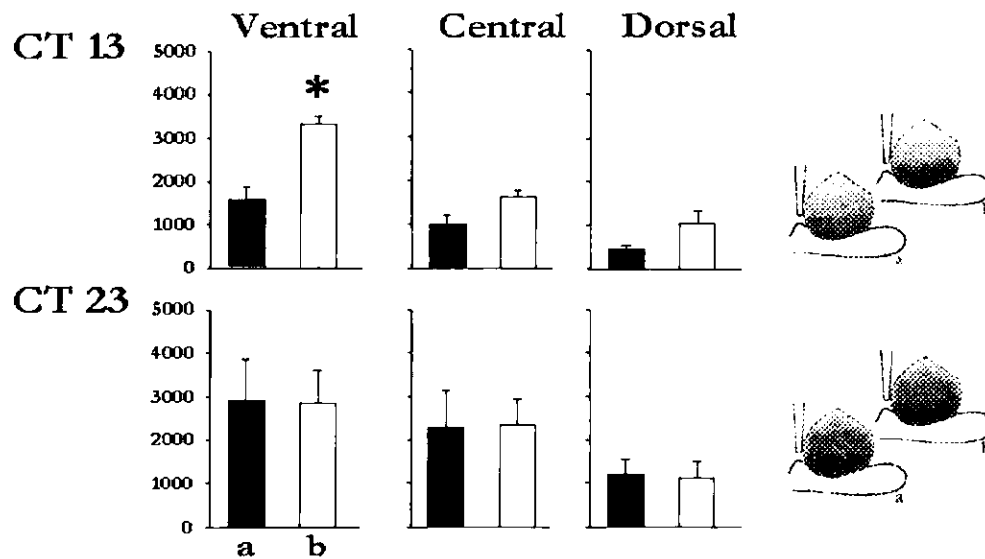


Fig. 40.- Número de células inmunopositivas (Media \pm Error estándar) a *c-Fos* en las diferentes regiones del NSQ hospedero de ratas intactas (a) y que recibieron transplantes de corteza en el IIIV (b), a los cuales se les administró un pulso de luz en la zona de retrasos (CT 13) y avances (CT 23) de fase de la curva de respuestas de fase. En los esquemas se representa al NSQ y la expresión observada en cada grupo de animales. * indica $p < .05$ diferencias significativas entre animales transplantados e intactos.

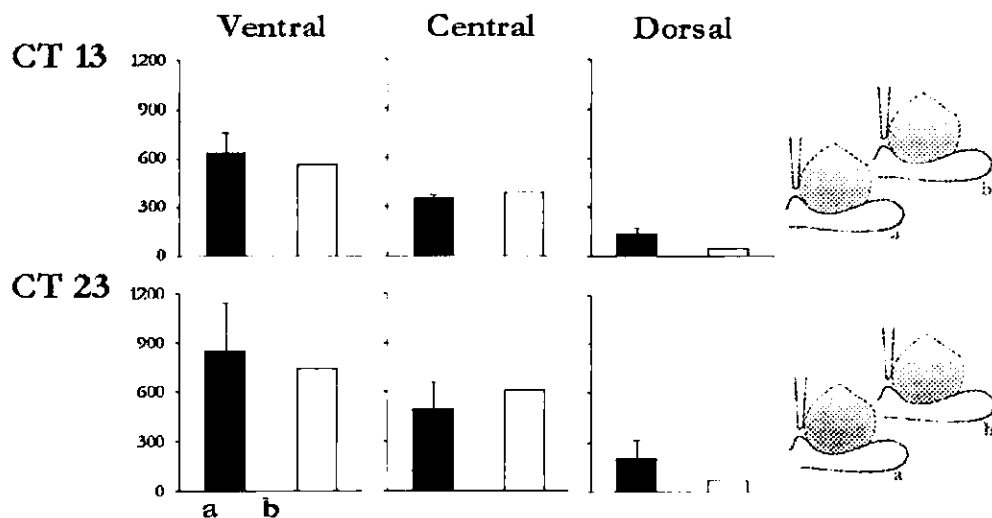


Fig. 41.- Número de células inmunopositivas (Media \pm Error estándar) a *Jun-b* en las diferentes regiones del NSQ hospedero de ratas intactas (a) y que recibieron transplantes de corteza en el IIIV (b), a los cuales se les administró un pulso de luz en la zona de retrasos (CT 13) y avances (CT 23) de fase de la curva de respuestas de fase. En los esquemas se representa al NSQ y la expresión observada en cada grupo de animales. * indica $p < .05$ diferencias significativas entre animales transplantados e intactos.

En el análisis del tejido transplantado encontramos un marcado decremento en el número total de células inmunopositivas a c-Fos ($F= 26.3$, $p<.001$) y a Jun-B en comparación del NSQ hospedero, cuando el pulso fue administrado en CT 13 (Fig. 36). De igual forma, el número de células inmunoreactivas a estas dos proteínas en el tejido transplantado fue significativamente inferior al encontrado en el NSQ de ratas intactas que recibieron el pulso de luz y de ratas intactas a las que no les fue administrado el pulso de luz en esta hora circadiana (Tabla 2, 13 y 14).

Tabla 13.- Resultados del análisis esterológico de la inducción fótica de *c-Fos* en el *tejido transplantado* en el tercer ventrículo, en los que se obtuvo el Volumen de referencia (V_{ref}), la densidad de célula inmunopositivas (NV) y también se estimó el total de células positivas en todo el NSQ (N). Esto se realizó en animales que recibieron un pulso de luz en la zona de retrasos de fase (**CT 13**) y en la zona de avances de fase (**CT 23**) de la curva de respuestas de fase. * indica las diferencias significativas ($p<.05$ contra el NSQ hospedero de estos mismos animales, ratas intactas que recibieron un pulso de luz (*Intacto +*) y que no les fue administrado el estímulo fótico (*Intacto -*).

<i>CT 13</i>	V_{ref} (mm ³)	NV (neuronas/mm ³)	N	<i>NSQ Hosp</i>	<i>Intacto +</i>	<i>Intacto -</i>
<i>T-CO HIV</i>	0.0224 ± 0.0084	1594.4	26.2	*	*	*
<i>CT 23</i>						
<i>T-CO HIV</i>	0.0265 ± 0.0087	620.0	20.9	*	*	*

Esta misma tendencia fue observada en el tejido transplantado en el grupo de animales que recibieron el pulso de luz en CT 23 (Fig.37). En donde el número total de células inmunopositivas a c-Fos y a Jun-b en el trasplante fue significativamente inferior al encontrado en el NSQ hospedero, al de animales intactos que recibieron un pulso de luz y al de ratas intactas a las que no les fue administrado el pulso de luz (Tabla 2, 13 y 14).

Tabla 14.- Resultados del análisis esterológico de la inducción fótica de *Jun-b* en el *tejido transplantado* en el tercer ventrículo, en los que se obtuvo el Volumen de referencia (V_{ref}), la densidad de célula inmunopositivas (NV) y también se estimó el total de células positivas en todo el NSQ (N). Esto se realizó en animales que recibieron un pulso de luz en la zona de retrasos de fase (**CT 13**) y en la zona de avances de fase (**CT 23**) de la curva de respuestas de fase. * indica las diferencias significativas ($p < .05$) contra el NSQ hospedero de estos mismos animales, ratas intactas que recibieron un pulso de luz (*Intacto +*) y que no les fue administrado el estímulo fótico (*Intacto -*).

<i>CT 13</i>	V_{ref} (mm ³)	NV (neuronas/mm ³)	N	$\frac{NSQ}{Hosp}$	<i>Intacto +</i>	<i>Intacto -</i>
T-CO HIV	0.0224 ± 0.0084	2954.9 ± 1232.6	71.6 ± 37.3	*	*	*
CT 23						
T-CO HIV	0.0265 ± 0.0087	12737.4 ± 10722.0	219.2 ± 100.4	*	*	*

Respuestas de Fase en Ratas con Transplante de NSQ en el VL

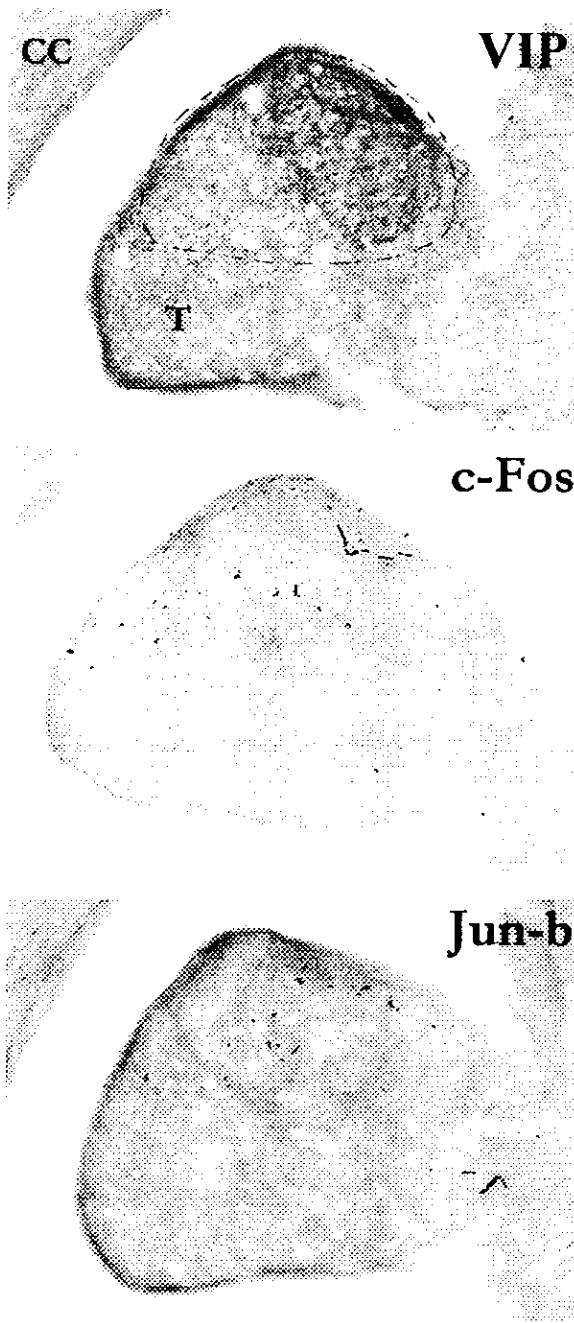
[A] Respuestas de fase a nivel conductual

Un total de 17 animales recibieron transplante de NSQ en el VL, lo cual fue corroborado mediante la detección inmunohistoquímica de células y fibras positivas a VIP. En todos los sujetos de este grupo fueron claramente identificados uno o dos cúmulos de neuronas y fibras positivas a VIP (Fig. 42 y 43).

En este grupo de animales transplantados en el VL fueron obtenidas las respuestas de fase inducidas por pulsos de luz en las dos zonas de respuesta de la CRF sobre el ritmo de ingesta de agua. Para tal efecto 6 sujetos de este grupo transplantado recibieron un pulso de luz en la zona de retrasos de fase y 4 sujetos recibieron un pulso en la zona de avances de fase. Para cuantificar el efecto del transplante de NSQ sobre las respuestas de fase inducidas por pulsos de luz, fueron comparados tanto la magnitud, como la dirección de los cambios de fase inducidos en los animales con transplante de NSQ en el VL contra animales intactos.

En la zona de retrasos de fase (CT 13) la administración de pulsos de luz indujo retrasos de fase con magnitudes similares ambos grupos de animales (Fig. 44 y 45). Mientras que la aplicación de pulsos de luz en la zona de avances de fase (CT 23) los cambios de fase inducidos en los animales transplantados difieren tanto en la dirección, como en la magnitud del cambio de fase a los observados en animales intactos (Fig. 45). Ya que en esta fase circadiana, los pulsos de luz en animales intactos normalmente son inducidos avances de fase, mientras que en los animales transplantados fueron inducidos retrasos de fase en todos los casos, ($F=18.1$, $p<.0001$; Fig. 45).

NSQ Transplantado



NSQ Hospedero

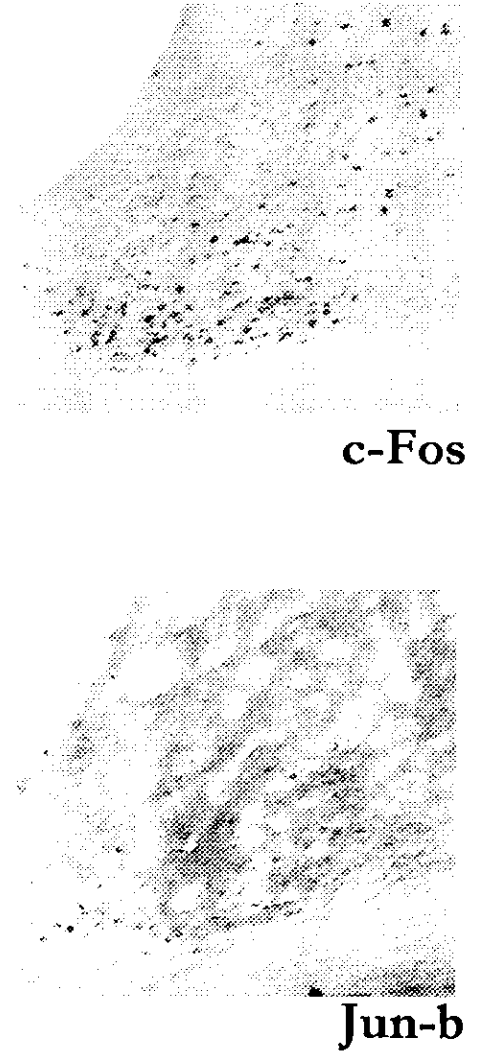
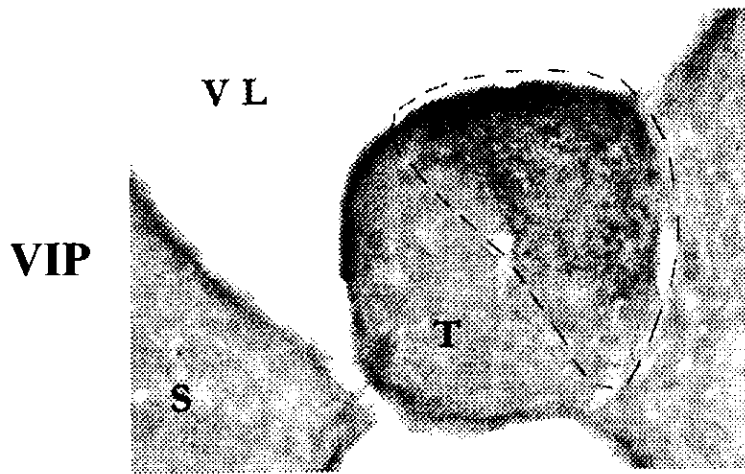


Fig. 42.- Fotografías de un sujeto representativo que recibió transplante de NSQ en el ventrículo lateral. En el cual se muestra el tejido transplantado (T) y el NSQ hospedero. En estas también se muestra la expresión de VIP dentro del transplante, así como la expresión de c-Fos y de Jun-b inducida por un pulso de luz en la zona de retrasos de fase (CT 13) de la curva de respuestas de fase. CC indica cuerpo calloso.

NSQ Transplantado



NSQ Hospedero

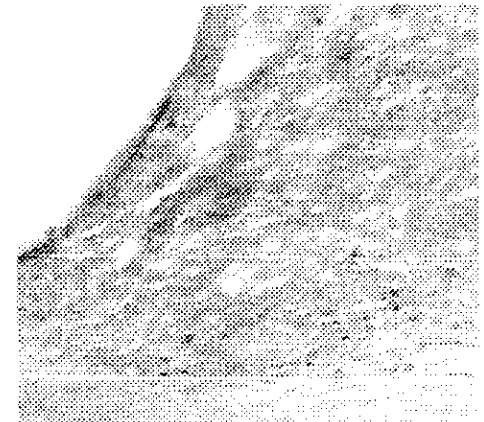
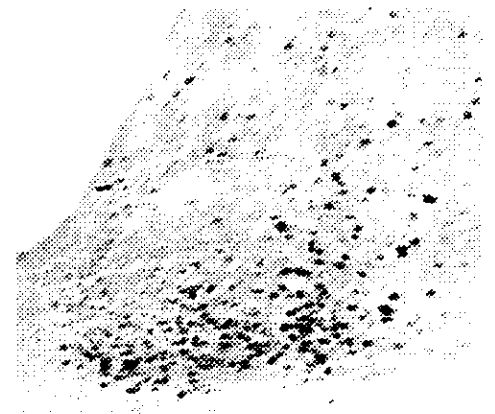
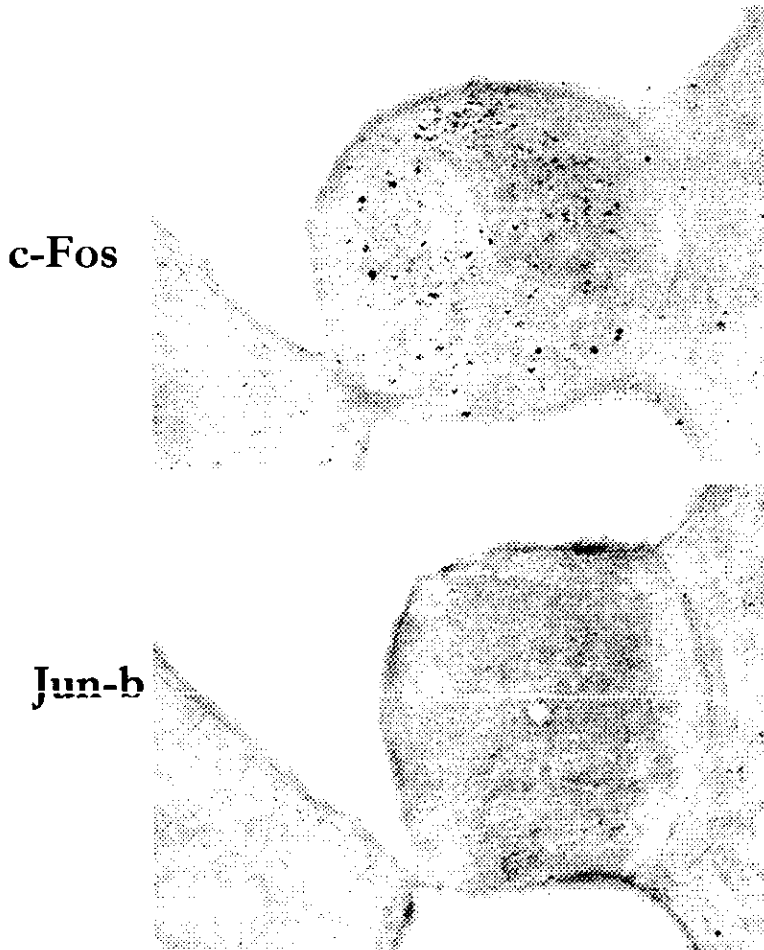


Fig. 43.- Fotografías de un sujeto representativo que recibió transplante de NSQ en el ventrículo lateral. En el cual se muestra el tejido transplantado (**T**) y el NSQ hospedero. En estas también se muestra la expresión de VIP dentro del transplante, así como la expresión de c-Fos y de Jun-b inducida por un pulso de luz en la zona de avances de fase (CT 23) de la curva de respuestas de fase. VL= ventrículo lateral, S= septum.

Tabla 15.- Magnitud de los cambios de fase inducidos (Media \pm Error estándar) por pulsos de luz en la zona de retrasos (CT 13) y avances (CT 23) de fase de la curva de respuestas en ratas intactas y en ratas que recibieron transplante de núcleo supraquiasmático en el ventrículo lateral (*T-NSQ VL*) * indica $p < .05$ entre estos dos grupos de animales transplantados.

	<i>CT 13</i>	<i>CT 23</i>
<i>INTACTAS</i>	$-02^h36^m \pm 00^h07^m$	$+01^h51^m \pm 00^h10^m$
<i>T-NSQ VL</i>	$-03^h00^m \pm 00^h28^m$	$-03^h30^m \pm 00^h26^m$ *

También se determinó el efecto del orden de la aplicación de los pulsos de luz, sobre los cambios de fase inducidos en animales con transplante de NSQ en el VI. Por lo que a 7 sujetos restantes de este grupo se les aplicaron pulsos de luz basándonos en el diseño contrabalanceado anteriormente mencionado. En este encontramos que los cambios de fase fueron similares en cuanto a la dirección y la magnitud a los anteriormente señalados. Con base en estos datos encontramos que el orden en la que son administrados los pulsos de luz no tiene ningún efecto en los cambios de fase obtenidos en animales con transplante de NSQ en el VI.

En cuanto al número de ciclos transitorios requeridos para alcanzar el estado estable en la nueva fase, observamos que en las dos horas circadianas bajo estudio, los animales transplantados mostraron un incremento significativo ($F = 16.32$, $p < .0001$) en el número de ciclos transitorios en comparación a los animales intactos (Tabla 16).

Con la finalidad de determinar el efecto de la localización del transplante sobre el proceso de acoplamiento, comparamos los cambios de fase exhibidos en este grupo de animales con transplante de NSQ en el VI. contra el grupo de animales con transplante de NSQ en el IIIV. En los parámetros bajo estudio, no fueron encontradas diferencias significativas entre estos dos grupos de animales, ya que la dirección, la magnitud y el número de ciclos transitorios fueron análogos

entre ambos grupos en las dos horas circadianas en las que fueron aplicados los pulsos de luz (Tablas 3 y 15, 4 y 16).

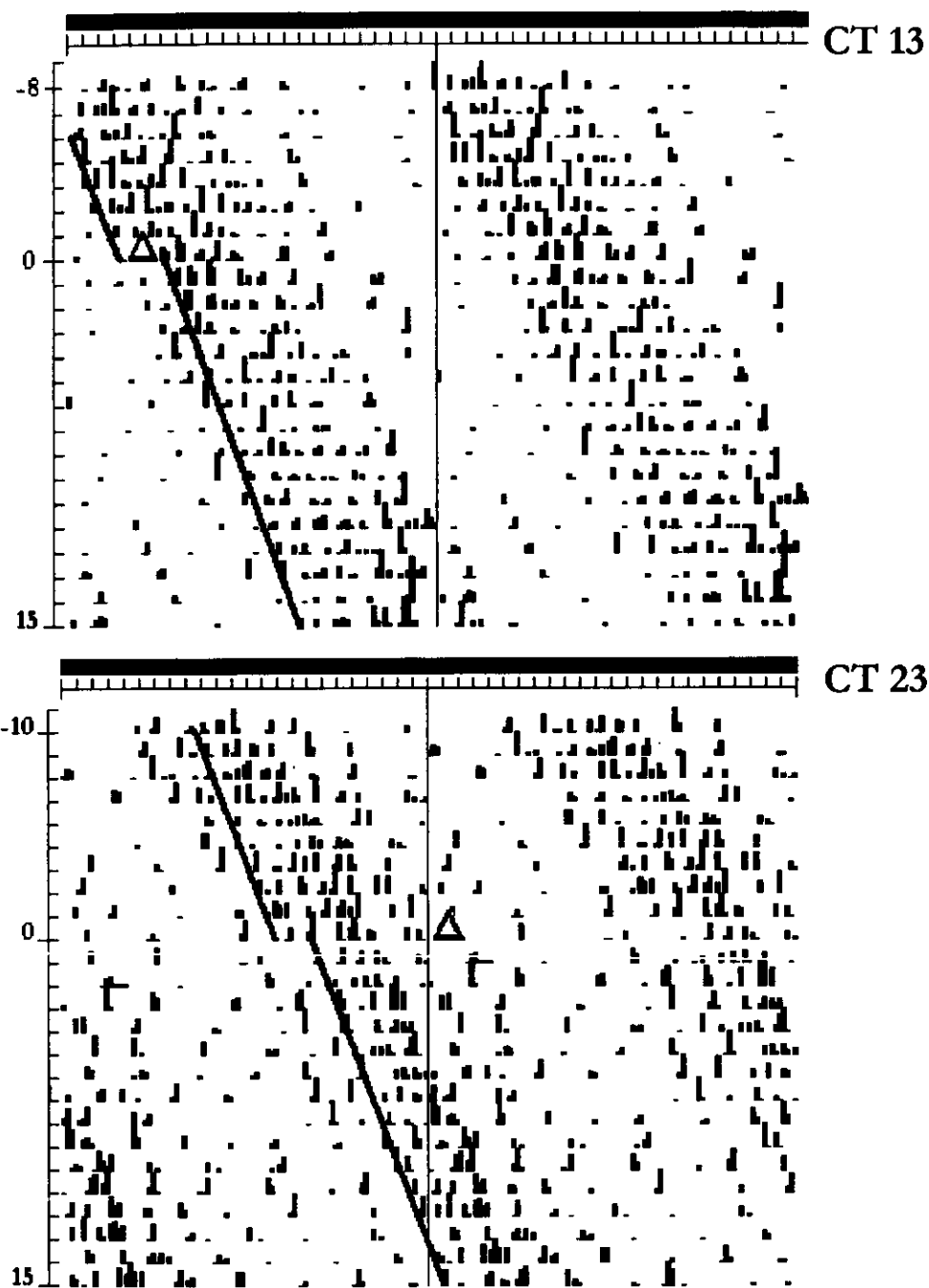


Fig. 44.- Actogramas representativos de los cambios de fase inducidos por pulsos de luz en la zona de retrasos de fase (CT 13) y en la zona de avances de fase (CT 23) de dos animales representativos que recibieron transplante de NSQ en el VL.

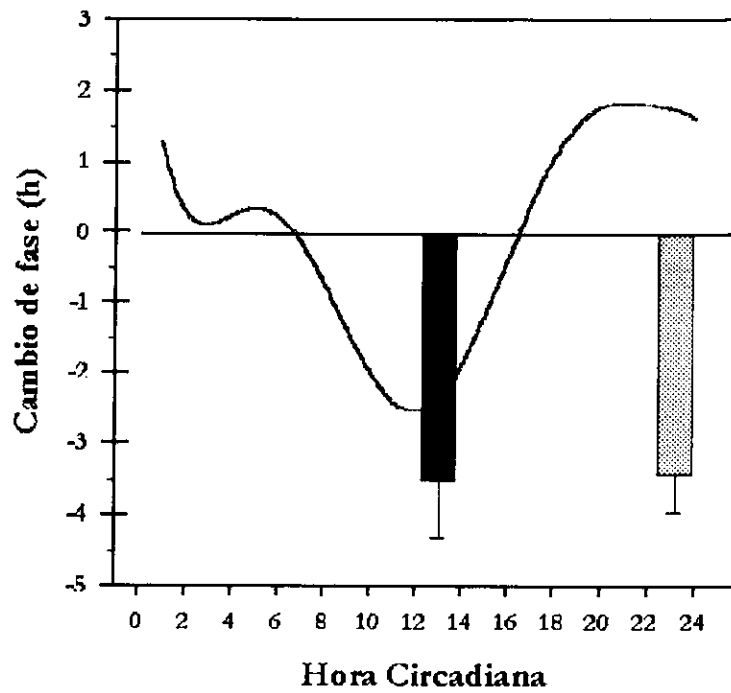


Fig. 45.- Dirección y magnitud de los cambios de fase inducidos por pulsos de luz en ratas con transplantes de NSQ en el VI. (barras) en las dos zonas de respuesta, de la curva de respuestas de fase, CT 13 (barra negra) y en CT 23 (barra gris). Con fines comparativos se muestra la curva de respuestas de fase en ratas intactas (línea)

Tabla 16.- Número de ciclos transitorios (Media \pm Error estándar) requeridos para alcanzar el estado estable, posterior a la aplicación de pulsos de luz en la zona de retrasos (CT 13) y avances (CT 23) de fase de la curva de respuestas de fase en ratas intactas, en ratas que recibieron transplante de núcleo supraquiasmático en el ventrículo lateral (*T-NSQ VI*). * indica $p < .05$ entre estos dos grupos de animales

	<i>CT 13</i>	<i>CT 23</i>
<i>INTACTAS</i>	1.7 \pm 0.39	2.7 \pm 0.61
<i>T-NSQ VI.</i>	5.6 \pm 0.35 *	6.7 \pm 0.46 *

[B] Respuestas de fase a nivel celular

En este grupo transplantados también se realizó el análisis estereológico de la expresión de c-Fos y Jun-b en el *NSQ hospedero* y del *NSQ transplantado* (n= 8).

Para establecer los efectos del trasplante de NSQ en el VL sobre las respuestas de fase por pulsos de luz a nivel celular en el *NSQ hospedero*, fue contrastada la inducción fótica de c-Fos y de Jun-b de este grupo transplantado contra la de animales intactos.

En general observamos que la administración de pulsos de luz durante la noche subjetiva induce la expresión de estas dos proteínas en este núcleo hipotalámico (Fig. 42 y 43).

En la inducción fótica de estas dos proteínas en el NSQ hospedero, observamos que la aplicación de pulsos de luz indujo un número similar de células inmunopositivas estimadas en los animales transplantados y en los animales intactos (Tablas 17 y 18) en las dos fases circadianas bajo estudio. Además, no fueron detectadas diferencias en la distribución espacial de las células positivas a estas dos proteínas entre el NSQ hospedero de los animales transplantados y los animales intactos.

Para determinar los efectos de la localización del trasplante de NSQ sobre las respuestas de fase a nivel celular, se comparó la inducción de c-Fos y de Jun-b en el NSQ hospedero de animales que recibieron el trasplante en el VL, contra el grupo transplantado en el IIIV.

En las dos horas circadianas bajo estudio se encontró que la inducción fótica de c-Fos en el núcleo hospedero de estos grupos transplantados fue similar en cuanto al número total de células positivas a estas proteínas estimadas en el todo el NSQ hospedero (Tablas 5, 6, 17 y 18). Pero, al analizar la distribución espacial de las células inmunopositivas, observamos que los animales con trasplante de NSQ en el VI. presentaban un decremento significativo en el número de células positivas a c-Fos en la región ventral del núcleo, tanto en CT 13 ($F= 2.9$, $p<.05$), como en CT 23 ($F= 8.5$, $p<.05$), en comparación de los animales que recibieron trasplante de NSQ en el IIIV (Fig. 46).

Tabla 17.- Resultados del análisis esterelógico de la inducción fótica de **c-Fos** en el *NSQ hospedero* de ratas intactas y transplantes de NSQ en el ventrículo lateral (*T-NSQ VL*), en los que se obtuvo el Volumen de referencia (V_{ref}), la densidad de células inmunopositivas (**NV**) y también se estimó el total de células positivas en todo el NSQ (**N**). Esto se realizó en animales que recibieron un pulso de luz en la zona de retrasos de fase (CT 13) y en la zona de avances de fase (CT 23) de la curva de respuestas de fase.

CT 13

	V_{ref} (mm ³)	<i>NV</i> (neuronas/mm ³)	N
<i>INTACTAS</i>	0.0263 ± 0.0023	115191.0 ± 19906.3	3050.5 ± 521.5
<i>T-NSQ VL</i>	0.0335 ± 0.0084	128038 ± 30106.6	4630.1 ± 1660.9

CT 23

	V_{ref} (mm ³)	<i>NV</i> (neuronas/mm ³)	N
<i>INTACTAS</i>	0.0313 ± 0.0074	193923.6 ± 36833.0	7766.6 ± 2460.2
<i>T-NSQ VL</i>	0.03353 ± 0.00385	152691 ± 27570.8	5339.8 ± 1281.9

Tabla 18.- Resultados del análisis esterelógico de la inducción fótica de **Jun-b** en el *NSQ hospedero* de ratas intactas y transplantes de NSQ en el ventrículo lateral (*T-NSQ VL*), en los que se obtuvo el Volumen de referencia (V_{ref}), la densidad de células inmunopositivas (**NV**) y también se estimó el total de células positivas en todo el NSQ (**N**). Esto se realizó en animales que recibieron un pulso de luz en la zona de retrasos de fase (CT 13) y en la zona de avances de fase (CT 23) de la curva de respuestas de fase.

CT 13

	V_{ref} (mm ³)	<i>NV</i> (neuronas/mm ³)	N
<i>INTACTAS</i>	0.0263 ± 0.0023	43316.0 ± 6857.8	1117.7 ± 129.6
<i>T-NSQ VL</i>	0.0335 ± 0.0084	20225.7 ± 5635.5	707.3 ± 234.4

CT 23

	V_{ref} (mm ³)	<i>NV</i> (neuronas/mm ³)	N
<i>INTACTAS</i>	0.0313 ± 0.0074	46961.8 ± 11969.4	1839.5 ± 673.0
<i>T-NSQ VL</i>	0.03353 ± 0.00385	24305.6 ± 10215.4	877.7 ± 387.8

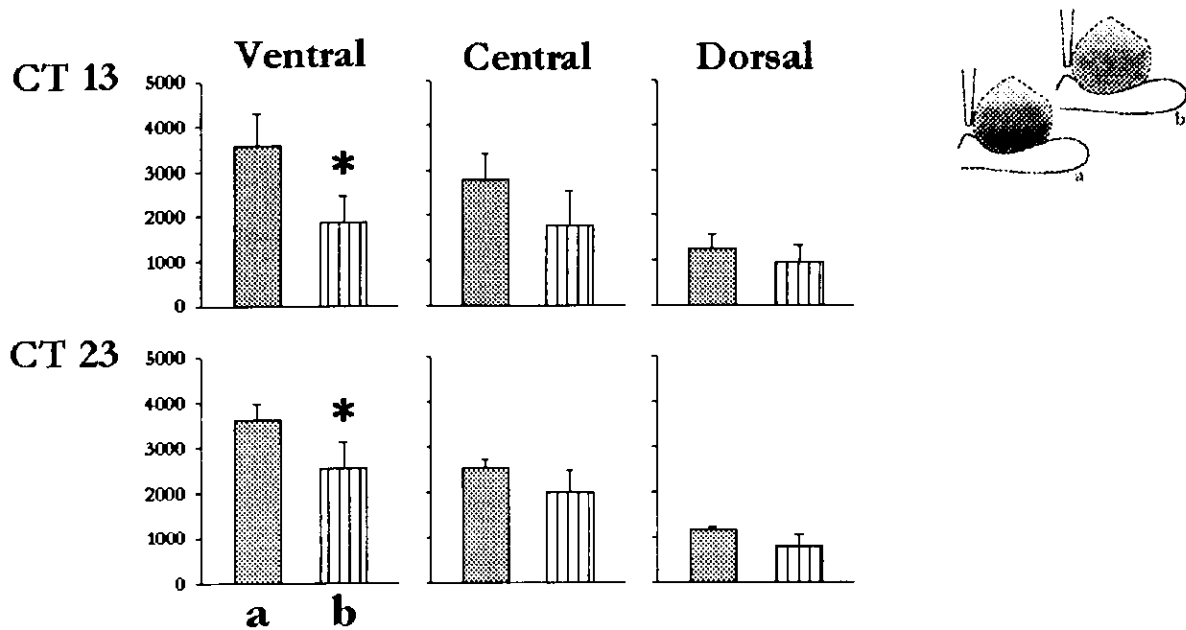


Fig. 46.- Número de células inmunopositivas (Media \pm Error estándar) a *c-Fos* en las diferentes regiones del NSQ hospedero de ratas con transplante de *NSQ en el HIV* (a) y que recibieron transplantes de *NSQ en el VL* (b), a los cuales se les administró un pulso de luz en la zona de retrasos (CT 13) y avances (CT 23) de fase de la curva de respuestas de fase. En los esquemas se representa al NSQ y la expresión observada en cada grupo de animales. * indica $p < .05$ diferencias entre estos dos grupos de animales transplantados.

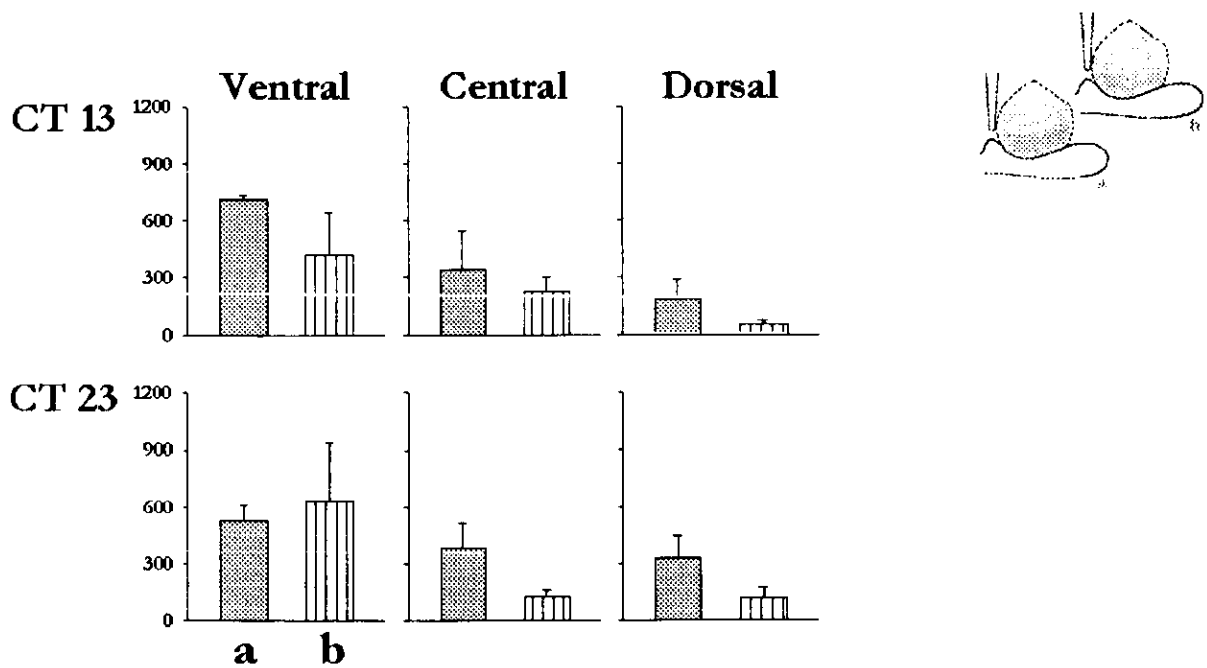


Fig. 47.- Número de células inmunopositivas (Media \pm Error estándar) a *Jun-b* en las diferentes regiones del NSQ hospedero de ratas con transplante de *NSQ en el HIV* (a) y que recibieron transplantes de *NSQ en el VL* (b), a los cuales se les administró un pulso de luz en la zona de retrasos (CT 13) y avances (CT 23) de fase de la curva de respuestas de fase. En los esquemas se representa al NSQ y la expresión observada en cada grupo de animales.

De igual forma, la inducción fótica de Jun-b en el NSQ hospedero de estos dos grupos que recibieron trasplante de NSQ en dos cavidades diferentes, fue similar tanto en el número total de células inmunopositivas estimadas en todo el núcleo hospedero (Tabla 18), como en la distribución espacial de las células positivas dentro del núcleo (Fig. 47). Esta tendencia se observó en las dos horas circadianas bajo estudio.

Con la finalidad de establecer las respuestas de fase en el *NSQ transplantado*, también se realizó el análisis estereológico de la inducción fótica de c-Fos y Jun-b en los animales con trasplante de NSQ en el VL. Los resultados obtenidos en el NSQ transplantado fueron contrastados con los resultados previamente mencionados del NSQ hospedero de estos mismos animales. También fueron contrastados contra animales intactos que recibieron un pulso de luz en la misma hora circadiana y contra animales intactos que no recibieron el estímulo fótico.

En el análisis estereológico del *NSQ transplantado* no encontramos inducción fótica por la aplicación de pulsos de luz en CT 13, de hecho se observó un marcado decremento en el número total de células inmunopositivas a c-Fos ($F=4.9$, $p<.001$) y a Jun-B ($F=11.7$, $p<.005$) en comparación del NSQ hospedero, al de ratas intactas que recibieron el pulso de luz y al de ratas intactas a las que no les fue administrado el pulso de luz en esta hora circadiana (Tablas 19 y 20).

Esta misma tendencia fue observada en el NSQ transplantado en el grupo de animales que recibieron el pulso de luz en CT 23. En donde el número total de células inmunopositivas a c-Fos y a Jun-b en el NSQ transplantado fue significativamente inferior al encontrado en el NSQ hospedero, al de animales intactos que recibieron un pulso de luz en esta hora circadiana y al de animales intactos a las que no les fue administrado el pulso de luz (Tabla 19 y 20).

Tabla 19.- Resultados del análisis esterelógico de la inducción fótica de *c-Fos* en el *NSQ trasnplantado* en el ventrículo lateral (*T-NSQ VL*), en los que se obtuvo el Volumen de referencia (V_{ref}), la densidad de células inmunopositivas (*NV*) y también se estimo el total de células positivas en todo el *NSQ* (*N*). Esto se realizó en animales que recibieron un pulso de luz en la zona de retrasos de fase (**CT 13**) y en la zona de avances de fase (**CT 23**) de la curva de respuestas de fase. * indica las diferencias significativas ($p < .05$) contra el *NSQ* hospedero de estos mismos animales, ratas intactas que recibieron un pulso de luz (Intacto +) y que no les fue administrado el estímulo fótico (Intacto -).

CT 13

	V_{ref} (mm ³)	<i>NV</i> (neuronas/mm ³)	<i>N</i>	<i>NSQ Hosp</i>	Intacto +	Intacto -
T-NSQ VL	0.0183 ± 0.0020	9673.9 ± 4317.4	154.5 ± 35.8	*	*	*

CT 23

	V_{ref} (mm ³)	<i>NV</i> (neuronas/mm ³)	<i>N</i>	<i>NSQ Hosp</i>	Intacto +	Intacto -
T-NSQ VL	0.0303 ± 0.0157	5850.4 ± 2290.1	210.7 ± 115.9	*	*	*

Tabla 20.- Resultados del análisis esterelógico de la inducción fótica de *Jun-b* en el *NSQ trasnplantado* en el ventrículo lateral (*T-NSQ VL*), en los que se obtuvo el volumen de referencia (V_{ref}), la densidad de células inmunopositivas (*NV*) y también se estimo el total de células positivas en todo el *NSQ* (*N*). Esto se realizó en animales que recibieron un pulso de luz en la zona de retrasos de fase (**CT 13+**) y en la zona de avances de fase (**CT 23+**) de la curva de respuestas de fase. * indica las diferencias significativas ($p < .05$) contra el *NSQ* hospedero de estos mismos animales, ratas intactas que recibieron un pulso de luz (Intacto +) y que no les fue administrado el estímulo fótico (Intacto -).

CT 13

	V_{ref} (mm ³)	<i>NV</i> (neuronas/mm ³)	<i>N</i> (x 10 ³)	<i>NSQ Hosp</i>	Intacto +	Intacto -
T-NSQ VL	0.0183 ± 0.0020	1857.7 ± 624.3	154.5 ± 35.8	*	*	*

CT 23

	V_{ref} (mm ³)	<i>NV</i> (neuronas/mm ³)	<i>N</i> (x 10 ³)	<i>NSQ Hosp</i>	Intacto +	Intacto -
T-NSQ VL	0.0303 ± 0.0157	1844.3 ± 1091.1	210.7 ± 115.9	*	*	*

Respuestas de Fase en Ratas Pinealectomizadas y con Transplante de NSQ en el VL

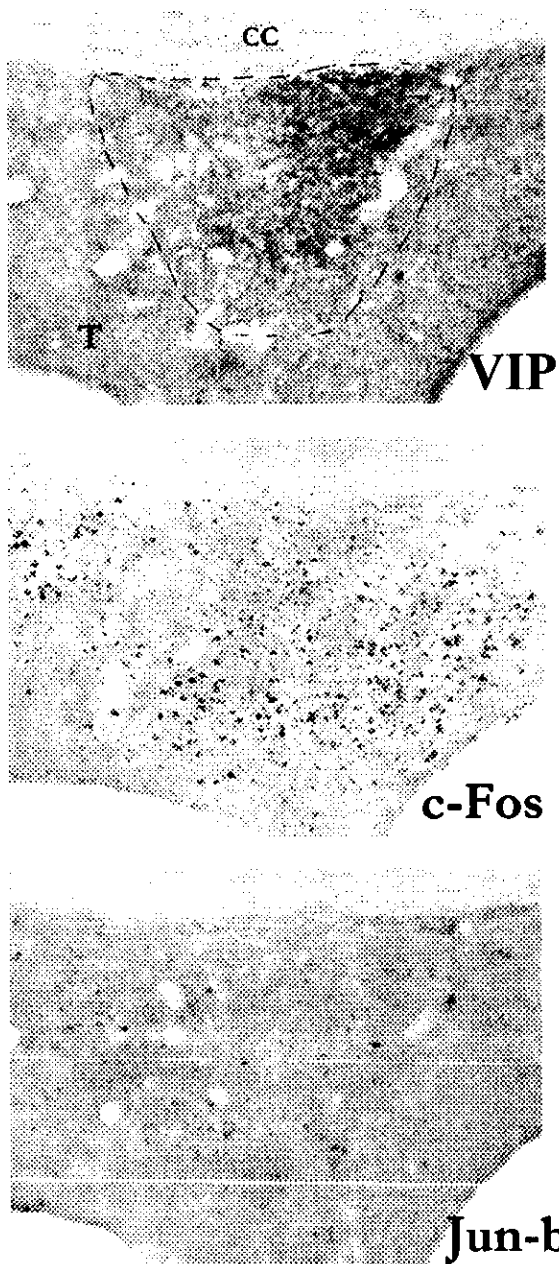
[A] Respuestas de fase a nivel conductual

En este experimento fueron utilizados 4 sujetos, los cuales recibieron transplante de NSQ en el VL y que posteriormente se les realizó la exéresis de la glándula pineal. La presencia del NSQ fue corroborada mediante la detección inmunohistoquímica de cúmulos de neuronas y fibras positivas a VIP dentro del transplante (Fig. 48). La verificación histológica de las pinealectomías se realizó visualmente en el momento en el que fueron obtenidos los cerebros y en todos los sujetos fue extirpada la pineal en su totalidad.

Debido a que los principales efectos producidos por los transplantes de NSQ en las respuestas de fase a pulsos de luz fueron encontrados en la zona de avances de fase, fue estudiada exclusivamente esta zona de la CRF en los sujetos pinealectomizados y con transplante de NSQ en el ventrículo lateral.

Con la finalidad de establecer la participación de la pineal sobre el proceso de acoplamiento, comparamos los cambios de fase exhibidos en este grupo transplantado y pinealectomizado contra los observados en los sujetos que únicamente recibieron el transplante de NSQ en el VL. Un factor común entre estos dos grupos de animales fue la dirección del cambio de fase inducido por el pulso de luz en CT 23 (Fig. 49), en donde ambos grupos mostraron un cambio de fase con dirección opuesta a los encontrados en animales intactos y con transplante de corteza (Fig. 50), es decir, ambos respondieron con un retraso de fase. Pero al comparar la magnitud del cambio de fase (Tabla 21), encontramos que los animales pinealectomizados exhibían retrasos de fase estadísticamente de menor magnitud que los animales que recibieron únicamente el transplante de NSQ ($F=18.1$, $p<.0001$).

NSQ Transplantado



NSQ Hospedero

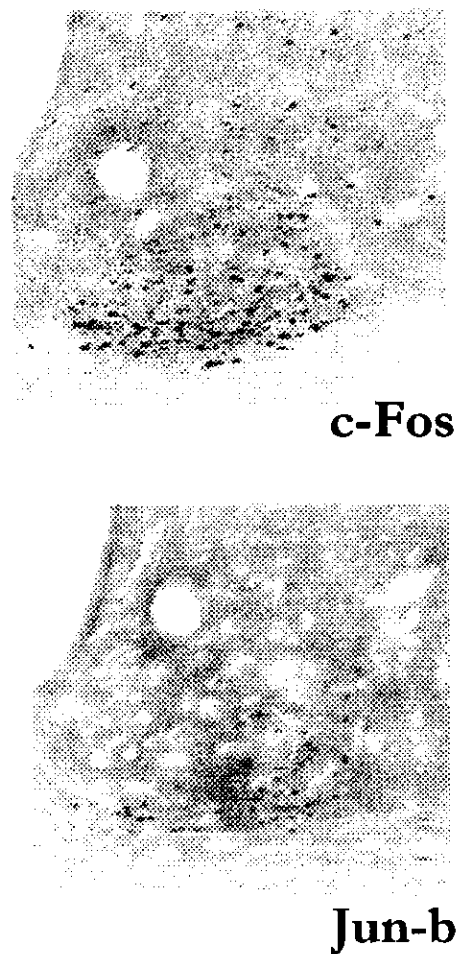
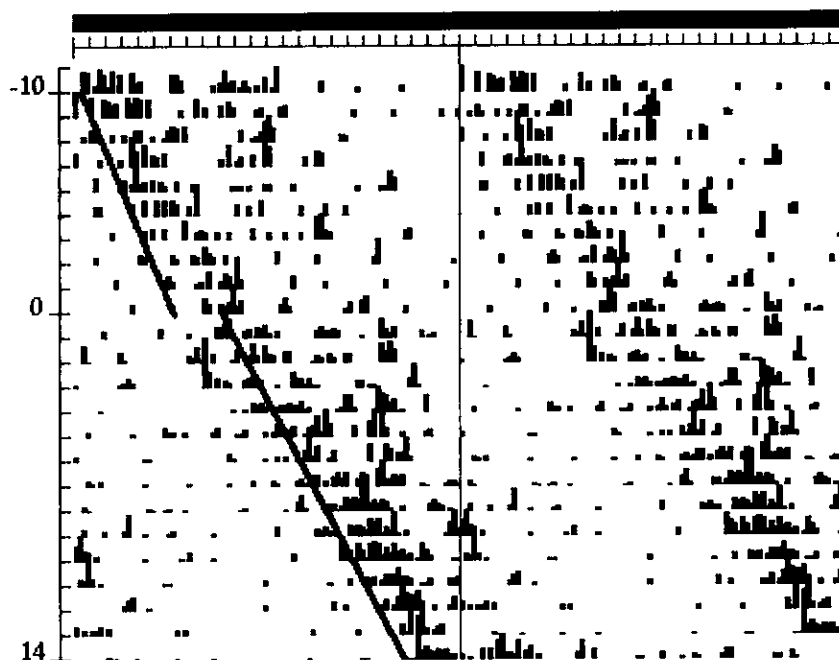


Fig. 48.- Fotografías de un sujeto representativo que pinealectomizado que además recibió transplante de NSQ en el ventrículo lateral. En el cual se muestra el tejido transplantado (**T**) y el NSQ hospedero. En estas también se muestra la expresión de VIP dentro del transplante, así como la expresión de c-Fos y de Jun-b inducida por un pulso de luz en la zona de avances de fase (CT 23) de la curva de respuestas de fase. **CC**= Cuerpo calloso.

Previo a la Pinealectomía



Pinealectomizado

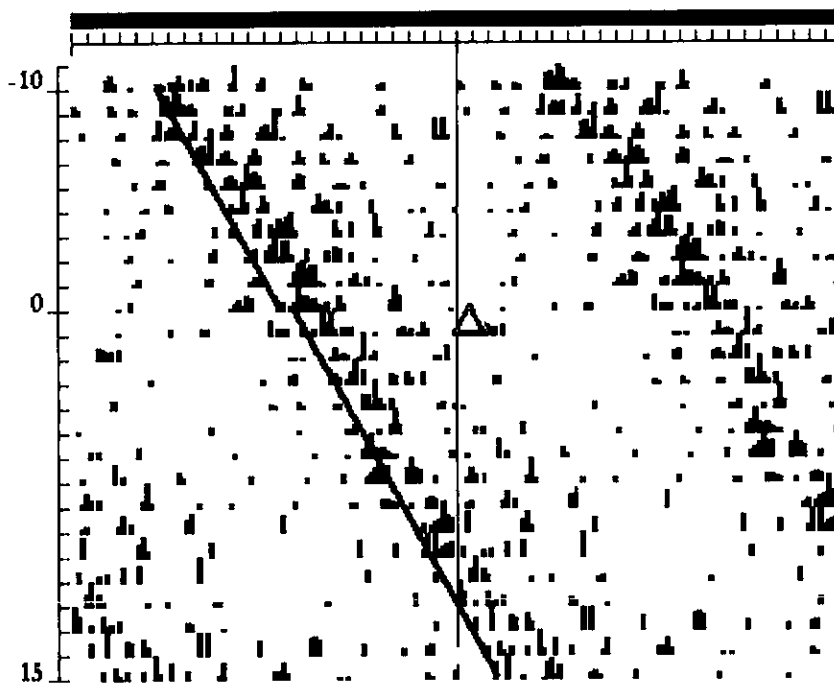


Fig. 49.- Actogramas representativos de los cambios de fase inducidos por pulsos de luz en la zona de avances de fase (CT 23) de un animal representativo, que recibió transplante de NSQ en el VI. (actograma superior) y que posteriormente fue pinealectomizado (actograma inferior).

Tabla 21.- Magnitud de los cambios de fase inducidos (Media \pm Error estándar) por pulsos de luz en la zona de avances (CT 23) de fase de la curva de respuestas de fase en ratas que recibieron transplante de núcleo supraquiasmático en el ventrículo lateral (T-NSQ VL) y en ratas pinealectomizadas con transplante de núcleo supraquiasmático en el ventrículo lateral (T-NSQ VL + Px) * indica $p < .05$ entre las ratas con transplante en el VL contra las ratas pinealectomizadas.

	CT 23
T- NSQ VL	$-03^h30^m \pm 00^h26^m$
T- NSQ VL + Px	$-01^h30^m \pm 00^h31^m$ *

En cuanto al número de ciclos transitorios, también encontramos diferencias entre estos grupos de animales, en donde los animales pinealectomizados mostraron un decremento estadísticamente significativo ($F=16.3$, $p < .0001$) en el número de ciclos transitorios en comparación de los animales que recibieron únicamente el transplante de NSQ en el VL (Tabla 22).

Tabla 22.- Número de ciclos transitorios (Media \pm Error estándar) requeridos para alcanzar el estado estable, posterior a la aplicación de pulsos de luz en la zona de avances de fase (CT 23) de la curva de respuestas de fase en ratas que recibieron transplante de núcleo supraquiasmático en el ventrículo lateral (T-NSQ VL) y pinealectomizadas con transplante de núcleo supraquiasmático en el ventrículo lateral (T-NSQ VL + Px). * indica $p < .05$ entre las ratas con transplante en el VL contra las ratas pinealectomizadas.

	CT 23
T- NSQ VL	6.7 ± 0.46
T- NSQ VL + Px	4.2 ± 0.62 *

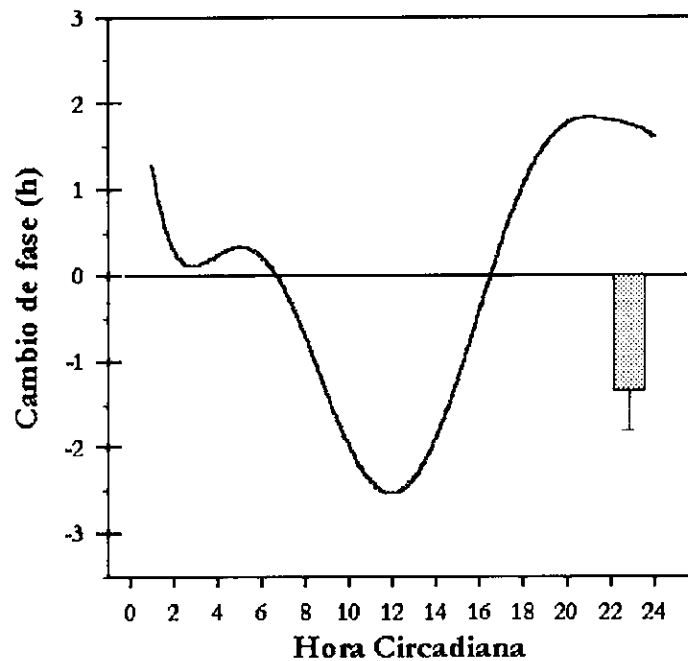


Fig. 50.- Dirección y magnitud de los cambios de fase inducidos por pulsos de luz en ratas Pinealectomizadas y con trasplantes de NSQ en el VL (barras). Con fines comparativos se muestra la curva de respuestas de fase en ratas intactas (línea)

[B] Respuestas de fase a nivel celular

En este grupo pinealectomizados se realizó el análisis estereológico de la inducción fótica de c-Fos y de Jun-b, tanto en el *NSQ hospedero*, como en el *NSQ transplantado*. Con la finalidad de establecer los efectos de la pinealectomía sobre las respuestas de fase a nivel celular, los resultados de este grupo pinealectomizados fueron contrastados contra el grupo de animales que únicamente recibieron trasplante de NSQ en el VL.

Al igual que en las respuestas de fase a nivel conductual, únicamente fueron obtenidas las respuestas de fase exclusivamente en la zona de avances de fase de la CRF.

En general se observó que la administración de pulsos de luz en la zona de avances de fase (CI 23) indujo la expresión de c-Fos y Jun-b en el *NSQ hospedero* de estos animales pinealectomizados (Fig. 48).

El análisis estereológico de este grupo de animales reveló, que la inducción fótica de *c-Fos* en el *NSQ hospedero* fue similar a la encontrada que únicamente recibieron transplante de NSQ en el VL, tanto en el número total de células estimadas en todo el núcleo hospedero (Tabla 23), como en la distribución espacial de las células dentro del núcleo (Fig. 51).

Tabla 23.- Resultados del análisis estereológico de la inducción fótica de *c-Fos* (a) y *Jun-b* (b) en el *NSQ hospedero* de ratas que recibieron un transplante de NSQ en el ventrículo lateral (T-NSQ VL) y animales pinealectomizados con transplantes de NSQ en el ventrículo lateral (T-NSQ VL + Px). En estos se obtuvo el Volumen de referencia (V_{ref}), la densidad de células inmunopositivas (NV) y también se estimó el total de células positivas en todo el NSQ (N). Esto se realizó en animales que recibieron un pulso de luz en la zona de avances de fase (CT 23) de la curva de respuestas de fase.

a

	V_{ref} (mm ³)	NV (neuronas/mm ³)	N
T-NSQ VL	0.03353 ± 0.00385	152691 ± 27570.8	5339.8 ± 1281.9
T-NSQ VL + Px	0.04466 ± 0.00365	155122 ± 14081.8	6919.8 ± 738.4

b

	V_{ref} (mm ³)	NV (neuronas/mm ³)	N
T-NSQ VL	0.03353 ± 0.00385	24305.6 ± 10215.4	877.7 ± 387.8
T-NSQ VL + Px	0.04466 ± 0.00365	32291.7 ± 5717.2	1403.1 ± 144.4

En relación a la inducción fótica de *Jun-b* en CT 23, observamos una tendencia similar en la inducción de *c-Fos*, en donde no fueron encontradas diferencias significativas entre estos dos grupos de animales, tanto en el número total de células inmunopositivas en el NSQ hospedero (Tabla 23), como en la distribución regional de las células (Fig. 52).

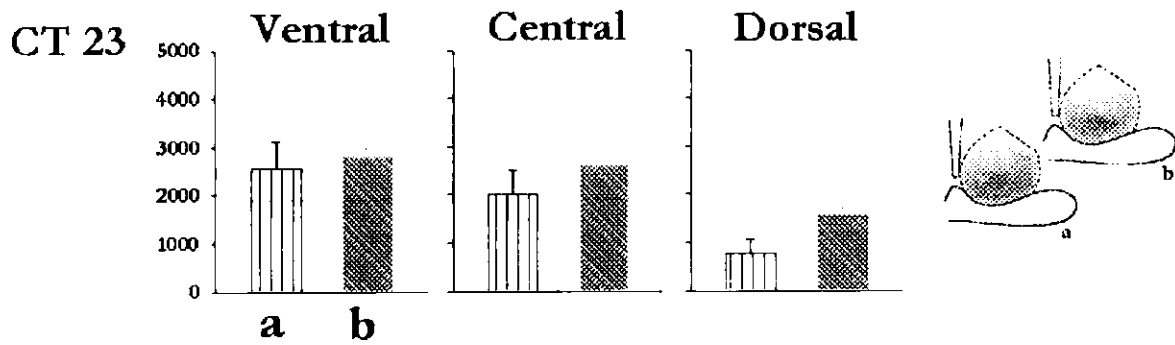


Fig. 51.- Número de células inmunopositivas (Media \pm Error estándar) a *c-Fos* en las diferentes regiones del *NSQ hospedero* de ratas con transplante de *NSQ en el VL* (a) y ratas *pinealectomizadas* con transplantes de *NSQ en el VL* (b), a los cuales se les administró un pulso de luz en la zona de avances (CT 23) de fase de la curva de respuestas de fase. En los esquemas se representa al NSQ y la expresión observada en cada grupo de animales.

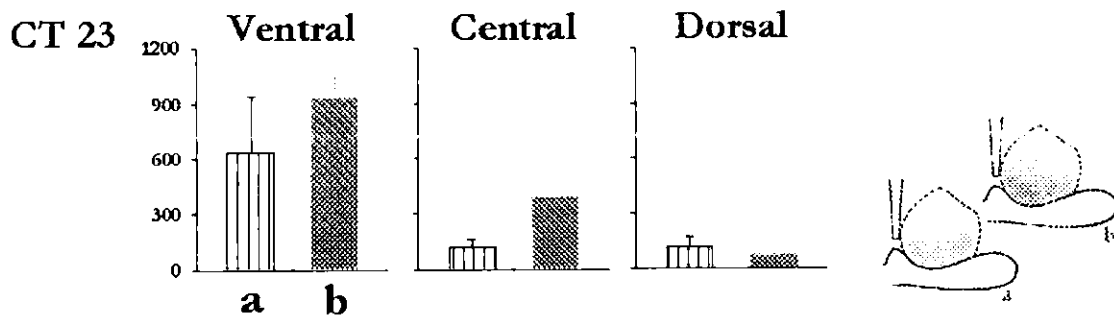


Fig. 52.- Número de células inmunopositivas (Media \pm Error estándar) a *Jun-b* en las diferentes regiones del *NSQ hospedero* de ratas con transplante de *NSQ en el VL* (a) y ratas *pinealectomizadas* con transplantes de *NSQ en el VL* (b), a los cuales se les administró un pulso de luz en la zona de avances (CT 23) de fase de la curva de respuestas de fase. En los esquemas se representa al NSQ y la expresión observada en cada grupo de animales.

Fueron obtenidas las respuestas de fase en el *NSQ transplantado*, mediante el análisis estereológico de la inducción fótica de *c-Fos* y *Jun-b* en los animales pinealectomizados con transplante de *NSQ en el VL* en la zona de avances de fase de la CRF. Los resultados obtenidos en el *NSQ transplantado* fueron contrastados contra los resultados previamente mencionados en el *NSQ hospedero* de estos

mismos animales. También fueron contrastados contra animales intactos que recibieron un pulso de luz en la misma hora circadianas y contra animales intactos que no recibieron el estímulo fótico.

En este análisis observamos que la aplicación de pulsos de luz CT 23 no indujo la expresión de estas proteínas en el NSQ transplantado, de hecho encontramos un marcado decremento en el número total de células inmunopositivas a *c-Fos* ($F=7.9$, $p<.005$) y a *Jun-B* ($F=4.3$, $p<.05$) en comparación su propio NSQ hospedero, al de ratas intactas que recibieron el pulso de luz y al de ratas intactas a las que no les fue administrado el pulso de luz en esta hora circadiana (Tabla 24). Pero no se detectaron diferencias en el número de células positivas a *c-Fos* y a *Jun-b* en el NSQ transplantado de los animales pinealectomizados y los que recibieron únicamente transplante de NSQ en el VL.

Tabla 24.- Resultados del análisis esterelógico de la inducción fótica de *c-Fos* (a) y *Jun-b* (b) en el *NSQ transplantado* en el ventrículo lateral de animales que también fueron pinealectomizados. Se obtuvo el Volumen de referencia (V_{ref}), la densidad de células inmunopositivas (NV) y también se estimó el total de células positivas en todo el NSQ (N). En la zona de avances de fase (CT 23) de la curva de respuestas de fase.

a

	V_{ref} (mm ³)	NV (neuronas/mm ³)	N	NSQ Hosp	Intacto +	Intacto -
T-NSQ VL + Px	0.0214 ± 0.0042	11063.9 ± 6936.5	181.8 ± 66.4	*	*	*

b

T-NSQ VL + Px	0.0214 ± 0.0042	1447.8 ± 978.0	23.3 ± 9.1	*	*	*
---------------	-----------------	----------------	------------	---	---	---

Estudios Preliminares en Ratas Intactas

[B] Determinación de c-Fos como marcador de fase

En los estudios preliminares determinamos que la dilución óptima de anticuerpo fue 1:2,500, debido de que a esta concentración del anticuerpo primario los niveles de la marca se mantienen a niveles elevados (DOR) mientras que el fondo disminuye de forma notable. Además, en los experimentos de inmunoadsorción se encontró que concentraciones bajas de antígeno son suficientes para la bloquear la expresión de c-Fos en el NSQ, con lo que corroboramos que el anticuerpo anti-c-Fos utilizado es específico, ya que no se encontraron evidencias de reacción cruzada con otros miembros de esta misma familia de genes de expresión temprana.

En la inducción fótica de c-Fos en el NSQ, encontramos que la expresión de esta proteína varía en función de la hora circadiana en la que es administrado el pulso de luz, durante el día subjetivo no se observó la inducción fótica de esta proteína, ya el número de células inmunopositivas fue similar a los niveles basales, mientras que la aplicación de pulsos de luz durante la noche subjetiva indujo un notorio incremento en la expresión de Fos en el NSQ, de hecho la inducción en la zona de avances de fase (CT 23) fue mayor a la observada en la zona de retrasos de fase. Los resultados previamente mencionados coinciden observaciones realizadas por otros grupos de investigación (Schwartz et al. 2000). Lo cual nos sugiere que la máxima inducción de c Fos por pulsos de luz es obtenida en la zona de avances de fase de la curva de respuestas de fase.

Además, mediante este mismo protocolo pudimos determinar que de las estructuras del sistema nervioso central que participan en el procesamiento de información fótica, la única que responde diferencialmente a la luz es el núcleo supraquiasmático del hipotálamo, lo cual nos sugiere que esta respuesta depende

exclusivamente de las características funcionales de las neuronas marcapaso que conforman este núcleo hipotalámico.

Con base a las características de la expresión de c-Fos dentro del NSQ concluimos que la inducción fótica de esta proteína es una estrategia eficiente para determinar la fase del marcapaso circadiano en ratas, ya que su inducción varía de acuerdo a la fase en la que es administrado el estímulo fótico.

[B] Inducción Fótica de c-Fos y Jun-b en el NSQ de Ratas Intactas

En la inducción fótica de los productos de los genes c-fos y jun-b durante la noche subjetiva, observamos que hay una mayor expresión de c-Fos, que de Jun-b en el NSQ de ratas (Fig. 29). En estos experimentos se también observamos que la inducción fótica de c-Fos es dependiente de la fase circadiana en la que es administrado el estímulo, ya que la expresión de esta proteína en CT 13 y CT 23 difiere. En tanto que la expresión de Jun-b fue similar en las dos fases circadianas bajo estudio.

En cuanto a la distribución espacial de las células inmunopositivas dentro del NSQ, en CT 13 encontramos que ambas proteínas se expresan en las regiones ventral y central del NSQ; en CT 23 encontramos diferencias en la expresión de estas proteínas, c-Fos se expresó en las regiones ventral y central del núcleo, mientras que Jun-b se expresó predominantemente en la región ventral del NSQ.

En estos experimentos observamos una tendencia similar en la expresión de c-Fos que en el experimento previo, en donde la administración de pulsos durante la noche subjetiva produce cambios en la expresión de esta proteína, que se observaron como incrementos en el número de células inmunopositivas a c-Fos, siendo mayor la expresión de esta proteína en la zona de avances de fase (CT 23), que en la zona de retrasos de fase (CT 13). Estas observaciones concuerdan con las realizadas por otros grupos de investigación (Rusak et al. 1992; Rea et al. 1993; Schwartz et al. 2000), por lo que es posible que la máxima inducción de esta proteína se alcance por

la administración de pulsos de luz en la fase circadiana en donde el reloj es susceptible a avanzar su fase. Además, el análisis estereológico realizado en el presente estudio, nos ofrece la ventaja de permitirnos discernir con mayor precisión las regiones del NSQ en las que está ocurriendo dicho cambio en la expresión, nuestros datos muestran que la inducción fótica de esta proteína durante estas fases circadianas ocurre predominantemente en la región ventral y central del NSQ, observaciones que se semejan con lo descrito en la literatura, ya que en estas regiones del NSQ convergen las terminales del tracto retino hipotalámico (Mikkelsen et al. 1994).

Mediante esta estrategia también pudimos establecer que la proteína Jun-b también es fotoinducible en el NSQ durante la noche subjetiva, pero en este caso su expresión es similar en la zona de retrasos de fase a la zona de avances, resultados similares han sido reportados por otros grupos de investigación (Kornhauser et al. 1992, Guido et al. 1999). Además, en relación a la distribución de las células inmunopositivas a Jun-b dentro del NSQ encontramos que las regiones de máxima expresión difieren en las dos horas circadianas bajo estudio. En donde la inducción de esta proteína se encontró en las regiones ventral y central del NSQ cuando el pulso se administró en la zona de retrasos de fase (CT 13), mientras que en la zona de avances de fase la inducción se observó en la región ventral del NSQ.

Estos experimentos se realizaron con la finalidad de establecer si a través la inducción fótica de estas proteínas podía establecerse con mayor precisión la fase del oscilador hipotalámico. Debido a que el NSQ muestra una expresión similar de Jun-b en las dos fases estudiadas, consideramos que la inducción fótica y detección de las proteínas c-Fos y Jun-b en el NSQ de ratas, no es una estrategia óptima para establecer la fase del marcapasos de forma precisa. De forma alternativa, esto se podría lograr realizando este protocolo pero detectando la expresión de los productos de los genes *mper1* y *mper2*, es bien sabido que estos dos genes reloj son fotoinducibles, pero un aspecto interesante en su inducción por pulsos de luz es que

mPer1 es inducido durante toda la noche subjetiva, mientras que *mPer2* únicamente es inducido durante el inicio de la noche subjetiva (Zilka et al. 1998), debido a que estos muestran una inducción diferencial es posible que a través de estos pueda ser establecido la fase del oscilador con mayor exactitud.

[D] Protocolo de doble pulso de luz en ratas intactas

En todos los experimentos realizados encontramos que los cambios de fase coincidieron con las predicciones elaboradas en la CRF.

De los experimentos elaborados en el punto de transición de la CRF (***primera serie de experimentos***) observamos un incremento significativo en la magnitud de los cambios de fase, por lo que bajo esta condiciones hay efecto aditivo en respuesta a los pulso luz.

La manipulación de los animales para la administración de los pulsos de luz no tuvo ningún efecto en la fase del ritmo, ya que nuestro grupo control exhibió cambios de fase de la misma dirección y magnitud a la observada en animales que únicamente recibieron un pulso de luz en CT 17.

En los experimentos en los que estudiamos el lapso necesario para lograr el reinicio del marcapaso (***segunda serie de experimentos***), observamos que un lapso de 90 minutos entre el inicio de ambos pulsos de luz es suficiente para reiniciar el NSQ.

La aplicación de pulsos de luz que inducen cambios de fase con dirección opuesta (***tercera serie de experimentos***) no tienen un efecto aditivo. Nuestros resultados muestran que si el intervalo entre ambos pulsos de luz es menor a 5 horas, el efecto de ambos pulsos de suma, mientras que si el intervalo es mayor a 8 horas, el efecto del primer pulso de luz es anulado por el efecto del segundo pulso de luz.

Mediante estos experimentos corroboramos que los cambios de fase inducidos por dos pulsos de luz concuerdan con las predicciones elaboradas en la CRF con un pulso de luz, lo cual es evidente en los dos experimentos en el punto de transición,

por lo que esta estrategia es adecuada para monitorear la posición del oscilador cuando este es reiniciado por pulsos de luz. Para mayor detalle ver ANEXO 2.

RESPUESTAS DE FASE DE RATAS TRANSPLANTADAS

[A] Ratas con trasplante de NSQ en el IIIV

En las *respuestas de fase a nivel conductual* encontramos que los trasplantes de NSQ en el tercer ventrículo producen respuestas de fase atípicas, nuestros resultados indican que el trasplante afecta el reinicio por pulsos de luz del NSQ hospedero predominantemente en la región de avances de fase, en donde observamos que la administración de pulsos de luz inducen cambios de fase con dirección opuesta (Fig. 33), lo cual también se vio manifestado en la magnitud de los cambios de fase obtenidos.

Un segundo efecto importante a nivel conductual sobre los parámetros bajo estudio, fue el incremento significativo del número de ciclos transitorios requeridos por los animales que recibieron trasplante de NSQ en el IIIV, este incremento se observó en las dos horas circadianas en las que fue administrado el pulso de luz (Tabla 4).

Debido a que los cambios de fase en el ritmo de ingesta de agua obtenidos en este grupo de animales transplantados fueron atípicos, se decidió no aplicar a estos sujetos el protocolo de doble pulso de luz, ya que no iba a ser posible predecir de forma exacta los efectos de un segundo pulso de luz, ya que estos animales no presentan las mismas características en la CRF cuanto a dirección y magnitud de los cambios de fase inducidos que en los animales intactos en los que implementó y validó este protocolo.

Finalmente nuestros resultados sobre las respuestas de fase a nivel conductual evidencian que existe algún tipo de interacción entre el NSQ hospedero y el NSQ transplantado, de tal forma que esto se ve manifestado en las características dinámicas del hospedero que tiene como consecuencia que este responda de forma atípica ante la administración de pulsos de luz.

En cuanto a los efectos del transplante de NSQ en el IIV sobre las *respuestas de fase a nivel celular*, se encontraron alteraciones en la inducción fónica de c-Fos en el *NSQ hospedero* en la zona de retrasos de fase (CT 13), en donde la presencia del transplante produjo un incremento significativo en el número de células inmunopositivas a esta proteína, dicho incremento ocurrió en las regiones ventral y central del NSQ hospedero. Mientras que en la zona de avances de fase (CT 23) no se encontraron efectos asociados a la presencia del transplante. Mientras que en la expresión de Jun-b en el *NSQ hospedero* de los animales que recibieron el transplante de NSQ en el III V, los análisis realizados no revelaron efectos asociados a la presencia del transplante en ninguno de los parámetros estudiados, ni en las dos horas circadianas bajo estudio.

Los resultados obtenidos en las respuestas de fase a nivel celular en el *NSQ transplantado* en el IIV en donde la administración de pulsos de luz durante la noche subjetiva no induce la expresión de c-Fos, ni de Jun-b en el NSQ transplantado en el IIV, nos sugieren que la ausencia de inducción de estas proteínas posiblemente se debe a que en el lapso de una hora la información luminosa no alcanza a activar al NSQ transplantado.

[B] Ratas con transplante de Corteza en el IIV

En los animales con transplante de corteza en el IIV encontramos que las *respuestas de fase* por pulsos de luz *a nivel conductual* no son afectadas por la presencia de un tejido que carece de la capacidad de generar oscilaciones circadianas autosostenidas. Ya que ninguno de los parámetros bajo estudio encontramos

alteraciones asociadas al trasplante de corteza, de hecho los resultados obtenidos en este grupo de animales fueron similares a los encontrados en ratas intactas (Fig. 39). Resultados que nos indican que las características dinámicas de marcapaso hospedero no se ven alteradas por el trasplante de corteza, por lo que los efectos encontrados en los demás grupos que recibieron trasplantes de NSQ fetal en diferentes cavidades ventriculares, son específicos al tipo de tejido trasplante de NSQ.

En las *respuestas de fase a nivel celular* del *NSQ hospedero* el único efecto asociado a la presencia del trasplante de corteza fue un incremento en el número total de células inmunopositivas a c-Fos en el NSQ hospedero inducidas por pulsos de luz en CT 13, las cuales se ubicaban predominantemente en la región ventral del NSQ. Esta alteración en la inducción fótica de Fos del *NSQ hospedero* en CT 13, es un efecto común entre los dos grupos de animales que recibieron trasplantes en el tercer ventrículo, lo cual nos sugieren que esto puede deberse a la distensión ventricular producida por el trasplante en esta cavidad, así como a factores mecánicos del tejido transplantado sobre el NSQ hospedero.

Como previamente fue mencionado, al parecer la máxima expresión de c-Fos en ratas intactas es obtenida por la aplicación de pulsos de luz en la zona de avances de fase de la CRF, un nivel similar de expresión fue observado en el *NSQ hospedero* de los animales que recibieron algún tipo de trasplante en el IIIV pero en CT 13. Esto nos sugiere que en estos animales transplantados es esta fase circadiana se esta obteniendo la máxima expresión de c-Fos tanto por el estímulo fótico, como por el efecto mecánico producido por el trasplante en el IIIV.

La ausencia de expresión de c-Fos y de Jun-b en el *tejido transplantado* nos sugiere que la administración de pulsos de luz durante la noche subjetiva no induce la expresión de estas proteínas en el tejido cortical transplantado en el IIIV.

[D] Ratas con trasplante de NSQ en el VL

A *nivel conductual* observamos que aún cuando es colocado el trasplante de NSQ en el ventrículo lateral, este tiene también efectos sobre el reinicio por pulsos de luz del marcapaso hospedero. Es de notarse que este grupo de animales con trasplante de NSQ en VL al igual que el grupo que recibió el trasplante de NSQ en el IIIV mostraron cambios de fase atípicos a nivel conductual, predominantemente en la zona de avances de fase; en donde ambos grupos exhibieron retrasos de fase en lugar del avance de fase que normalmente es inducido en esta fase circadiana (Fig. 43).

También observamos que los trasplantes de NSQ en el ventrículo lateral requirieron un elevado número de ciclos transitorios para adquirir el estado estable en relación a los animales intactos, en las dos horas circadianas bajo estudio. Pero en relación a los animales que recibieron el trasplante de NSQ en el IIIV el número de ciclos transitorios requeridos fueron similares entre estos grupos (Tabla 10).

Las respuestas de fase por pulsos de luz sobre el ritmo conductual monitoreado de los animales que recibieron el trasplante de NSQ en el VL así como los que lo recibieron en el IIIV, mostraron tendencias similares los diferentes parámetros bajo estudio. Resultados que sugieren que la localización del trasplante no tiene ningún efecto sobre las interacciones que puedan establecer entre el NSQ hospedero y el transplantado.

Los resultados obtenidos en este grupo transplantado en el VL sugieren que existe algún tipo de interacción entre el NSQ hospedero y el NSQ transplantado a pesar de su localización, lo cual es evidenciado por las respuestas de fase atípicas a la luz que exhiben estos animales a nivel conductual. Teniendo en consideración la distancia existente entre el hospedero y el transplantado nos sugiere que una posible forma de comunicación entre ambos osciladores, sea de tipo humoral.

Debido a que este grupo de animales también mostraron cambios de fase atípicos a la luz, se decidió no aplicar el protocolo de doble pulso de luz en este grupo de animales.

En las *respuestas de fase a nivel celular* de los animales con trasplante de NSQ en el VI. fueron similares a las observadas en animales intactos en la expresión tanto de c-Fos como de Jun-b en el *NSQ hospedero*. Por lo que no fueron detectados efectos asociados a la presencia del NSQ en el VI.

Cuando se compararon las respuestas de fase celulares de las ratas con trasplante de NSQ en el VI. contra las de animales con trasplante de NSQ en el IIIV, encontramos diferencias asociadas a la localización del trasplante ya que en las dos horas circadianas bajo estudio, los animales con trasplante en el ventrículo lateral exhibieron un decremento significativo en el número de células positivas a Fos en la región ventral del *NSQ hospedero*.

En este grupo de animales con trasplante de NSQ en el VI., no se observó en CT 13 el incremento en la expresión de c-Fos en la región ventral del *NSQ hospedero*, como se observó en las animales que recibieron trasplante en el IIIV, esto posiblemente se debe a la localización del trasplante ya que en este sitio el tejido transplantado no produce el efecto mecánico sobre el NSQ hospedero.

En relación a la inducción fótica de Jun-b en el *NSQ hospedero*, no se encontraron efectos asociados a la localización del trasplante en ninguno de los parámetros estudiados en las dos fases circadianas bajo estudio.

Estos datos nos sugieren que la administración de pulsos de luz durante la noche subjetiva no induce la expresión de c-Fos, ni de Jun-b en el *NSQ transplantado* en el VI.. Esta ausencia en la inducción fótica de células inmunopositivas a estas dos proteínas posiblemente se debe a que la información fótica no alcanza al NSQ transplantado. Por lo que posiblemente en el lapso de una hora la información luminosa no alcanza a activar al NSQ transplantado en el ventrículo lateral.

[E] Ratas Pinealectomizadas y con transplante de NSQ en el VL

Los principales efectos asociados a la exéresis de la glándula pineal en animales con transplante de NSQ en el VL *a nivel conductual* fueron, que la administración de pulsos de luz en CT 23 también indujo retrasos de fase en el ritmo conductual monitoreado, en lugar de los avances de fase normalmente inducidos en esta fase circadiana (Fig. 48); pero en este caso encontramos una disminución importante en la magnitud del cambio de fase en comparación de los retrasos de fase observados en los animales que únicamente recibieron transplante de NSQ en el VL (Tabla 15). De igual forma, observamos un decremento significativo en el número de ciclos transitorios requeridos por estos animales pinealectomizados.

Los resultados en las respuestas de fase a nivel conductual, nos sugieren que existe aún alguna interacción entre el NSQ hospedero y el NSQ transplantado, pero esta reducción tanto en la magnitud de los cambios de fase como en el número de ciclos transitorios nos indica que la pineal de alguna forma está involucrada en la expresión de los cambios de fase, ya que la exéresis de esta produce una disminución en los efectos producidos por el transplante de NSQ.

En el análisis estereológico de la inducción fótica de c-Fos y de Jun-b en el *NSQ hospedero* de animales pinealectomizados y con transplante de NSQ en el ventrículo lateral sobre las *respuestas de fase celulares*, encontramos una tendencia similar a la observada en animales que únicamente recibieron transplante de NSQ en el ventrículo lateral en todos los parámetros estudiados, por lo que no fueron detectados efectos asociados a la exéresis de la pineal.

En cuanto a las respuestas de fase celulares del *NSQ transplantado* de animales pinealectomizados, nos indican que la administración de pulsos de luz durante el final de la noche subjetiva no induce la expresión de estas proteínas en el tejido transplantado en el VL. Este fue un factor común entre todos los animales que recibieron transplante y nuestros resultados sugieren que independientemente de la localización del transplante, la información fótica no logra alcanzar al tejido

transplantado en el lapso de una hora. Además estos datos en animales pinealectomizados indican que la glándula pineal no participa por lo menos dentro de la primera hora de iniciada la aplicación del estímulo fótico.

Discusión General

En el proceso de acoplamiento un oscilador con un periodo y una fase propia ajusta estos parámetros al de otro oscilador cuyo periodo es similar al primero. La estabilidad de este proceso va a depender: [1] del periodo y la fase característico de cada uno de los osciladores, los cuales deben ser distinguibles en ausencia de acoplamiento y [2] de la fuerza de acoplamiento que existe entre ambos osciladores (Pittendrigh, 1976).

Con base en la definición de acoplamiento previamente indicada, *¿Podemos considerar que el NSQ hospedero y el NSQ transplantado se encuentran acoplados?* En el presente estudio bajo condiciones constantes los efectos del NSQ transplantado en el IIIV, así como en el VL, sobre el ritmo manifiesto de ingesta de agua fueron prácticamente imperceptibles, ya que se observó un patrón típico en todos los animales, lo cual nos podría sugerir la existencia de un acoplamiento unilateral, en donde la fase y el periodo manifiesto corresponde a uno de los dos osciladores (Daan y Berde, 1978), o bien que el transplante no afecta la conducta o bien no hay otro oscilador acoplado. Sin embargo, la influencia del transplante fue claramente evidenciado en este estudio sobre las respuestas de fase inducidas por pulsos de luz a nivel conductual, predominantemente durante la noche subjetiva tardía en donde los animales con transplante de NSQ mostraron respuestas de fase atípicas a la luz.

Han sido realizados previos estudios con la finalidad de analizar la comunicación entre osciladores en la expresión del ritmo conductual, y se ha encontrado que la implantación de NSQ en el IIIV de hámsters intactos no producía

cambios en la expresión del ritmo de actividad locomotora a pesar de la presencia del trasplante, posteriormente fue lesionado el NSQ de estos mismos animales transplantados y no fueron detectados cambios tanto en la arquitectura del ritmo en oscilación espontánea, como en la fase del ritmo (Philpot et al. 1989), por lo que los autores sugieren que el NSQ hospedero y el transplantado se encontraban mutuamente acoplados. Las observaciones de Philpot et al. (1989) son similares a las nuestras, en el sentido de que bajo condiciones de oscilación espontánea no se ve manifestada la presencia del NSQ transplantado sobre el ritmo conductual. Pero en el presente trabajo, la interacción de los dos osciladores fue evidenciado por los marcados cambios observados en las respuestas de fase inducidos por pulsos de luz.

Otro parámetro en el que se observó cambios asociados a la presencia de trasplantes de NSQ, fue un notorio incremento en el número de ciclos transitorios. De acuerdo con el protocolo de doble pulso de luz previamente mencionado, sabemos que el reinicio gradual del ritmo de ingesta de agua después de la aplicación de un pulso de luz, no refleja con precisión la cinética de reinicio del marcapaso ya que este reinicio ocurre dentro de la primera hora posterior a la aplicación del pulso de luz, sino más bien representan a una segunda entidad oscilatoria que gradualmente esta adquiriendo su fase con el marcapaso que lo dirige (Pittendrigh, 1981). La presencia del trasplante representa esta segunda entidad oscilatoria y por tal motivo observamos un incremento en el número de ciclos transitorios en los animales transplantados.

Con base en los resultados obtenidos en los animales con trasplante de corteza en el IIIV, sabemos que los efectos encontrados en las respuestas de fase a nivel conductual en los animales que recibieron trasplante de NSQ son específicos al tipo de tejido transplantado. Ya que los animales con trasplante de corteza mostraron respuestas de fase similares en todos los parámetros bajo estudio a las inducidas en animales intactos. Además, existen evidencias previas en donde también se demuestra que los trasplantes de corteza no son capaces de inducir la

recuperación de la función rítmica en animales con lesiones del NSQ bajo condiciones de oscuridad continua (García-Hernández et al. 1987).

También se ha demostrado que los trasplantes de corteza no se acoplan con el NSQ hospedero, ya que el tejido de corteza transplantado no exhibe ritmicidad en la actividad metabólica y no se expresan cambios en el ritmo de consumo de glucosa del NSQ hospedero (Serviére et al. 1994). Con base a nuestras observaciones y las evidencias previamente señaladas, sabemos que el proceso de acoplamiento no es una respuesta pasiva de los trasplantes de tejido fetal, sino que son necesarias las células del NSQ dentro del trasplante para que pueda llevarse a cabo el enfasamiento con las células del NSQ hospedero.

Las alteraciones observadas en los diferentes parámetros estudiados en las respuestas de fase a nivel conductual en las ratas que recibieron trasplantes de NSQ en las diferentes cavidades ventriculares, nos sugieren que definitivamente existe algún tipo de interacción entre el NSQ transplantado y el hospedero, a pesar de que esto no se ve reflejado en el periodo del ritmo en condiciones constantes, en las respuestas de fase a la luz fue evidente la influencia del NSQ transplantado sobre la fase. Cabe destacar que este efecto no fue observado en los animales que recibieron trasplante de corteza, ya que como anteriormente se mencionó, el proceso de acoplamiento no es una respuesta pasiva por parte del sistema, sino que en este se requiere de la presencia de otra entidad oscilatoria autosostenida. Todas estas evidencias nos señalan que el NSQ transplantado y el NSQ hospedero se encuentran mutuamente acoplados.

Los cambios de fase en los animales con trasplante de NSQ en el IIIV y en el VI se caracterizaron por presentar retrasos de fase en lugar de los avances de fase esperados en CT 23, *¿A que pueden asociarse estos cambios de fase atípicos?* Se han realizados estudios previos, en donde en hámsters con lesiones del NSQ y en la que es recuperada la función locomotora rítmica mediante trasplantes de NSQ, han encontrado que la aplicación de triazolam (Tz) durante el día subjetivo no tiene

efectos sobre la fase del ritmo, siendo que en animales intactos la administración de este fármaco durante esta fase del ciclo normalmente induce avances de fase (Matsumoto et al. 1996; Canbeyli et al. 1991). Sin embargo, estos animales transplantados continúan exhibiendo los retrasos de fase que normalmente son inducidos por Tz durante la noche subjetiva (Matsumoto et al. 1996). Lo que sugiere que el trasplante de NSQ parece ser más susceptible a estímulos que inducen retrasos de fase, posiblemente por una reducción en las aferencias al trasplante.

Las respuestas de fase atípicas, pueden deberse a que el NSQ transplantado actúe directamente sobre el sistema efector encargado de generar la conducta del sistema hospedero (Fig. 53a), si establecer relaciones funcionales con el NSQ hospedero; o bien que el NSQ transplantado actúe sobre la fase del NSQ hospedero a través de una interacción directa entre el oscilador transplantado y el hospedero (Fig. 53b).

Existen modelos experimentales en los que se sugiere que los trasplantes de NSQ pueden actuar sobre el sistema efector del hospedero (Fig. 53a). Vogelbaum M. y Menaker M. (1992) generaron un modelo conocido como “Quimeras temporales”, en donde roedores de cepa silvestre con lesiones parciales de NSQ recibieron trasplantes de NSQ de ratones mutantes *tau* (mutación que produce un acortamiento en el periodo del ritmo en oscilación espontánea). Estas quimeras temporales se caracterizan por presentar patrones conductuales complejos, ya que en el patrón rítmico monitoreado bajo condiciones constantes eran claramente evidentes dos componentes rítmicos con periodos diferentes uno del oscilador transplantado (cercano a 20h), y el otro del oscilador hospedero (cercano a 24h). Con base a estos patrones conductuales se muestra que es posible que el oscilador circadiano transplantado proporcione señales rítmicas a las vías efectoras del sistema circadiano hospedero, y que la interacción no es a nivel del marcapaso hospedero. Además se sugiere que las conexiones que establece el trasplante, son predominantemente con el núcleo paraventricular talámico, y a este nivel es donde se

arriba la información temporal tanto del NSQ hospedero, como del NSQ transplantado (Menaker y Vogelbaum, 1993).

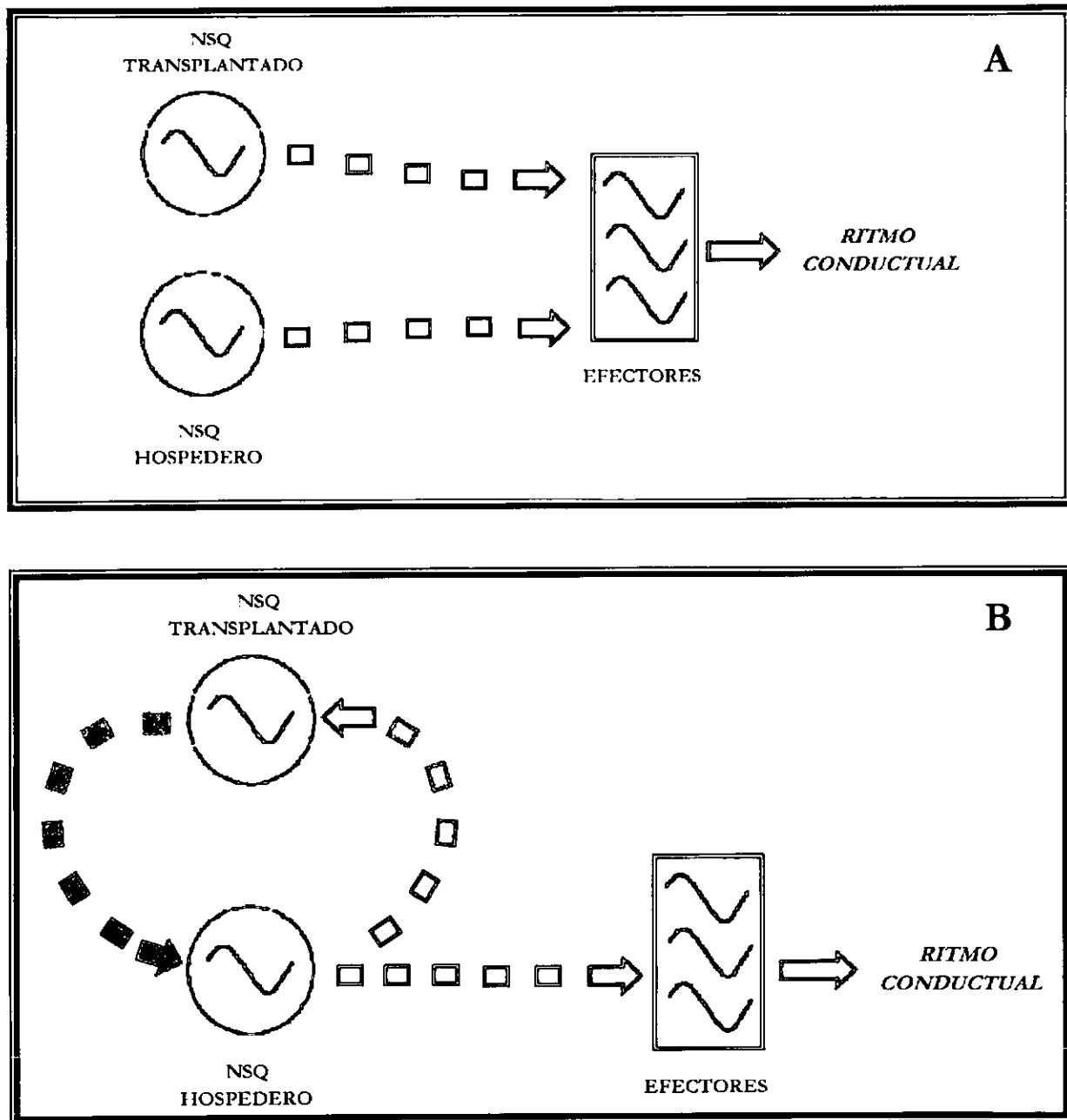


Fig. 53.- Esquema que ilustra los posibles mecanismo de interacción de los osciladores en el modelo experimental. [A] Ilustración de la interacción del NSQ transplantado y el sistema efector del hospedero. [B] Ilustración de la interacción del NSQ transplantado y el NSQ hospedero, el cual tiene interacción a su vez con el sistema efector, las flechas blancas indican comunicación sináptica y las negras indican comunicación humoral. Para mayor detalle ver discusión

De igual forma, es posible que exista una interacción entre el NSQ transplantado y el NSQ hospedero (Fig. 53b). Las peculiaridades en las respuestas de fase por pulsos de luz en los animales que recibieron transplante de NSQ se deban a que el NSQ transplantado es menos sensible a señales externas. Ya que solamente fueron estudiadas dos fases circadianas y es probable que el NSQ transplantado presente cambios de fase en diferentes intensidades de luz o bien en diferentes tiempos de administración del estímulo.

Posiblemente el NSQ transplantado es menos sensible a la luz debido su localización y a que este recibe limitadas aferencias, existen evidencias anatómicas en donde se ha encontrado que las aferencias de la retina son escasas en el NSQ transplantado en relación a las proyecciones retino-hipotalámicas de sujetos intactos (Aguilar-Roblero et al. 1994; Matsumoto et al. 1996). También es posible que exista una comunicación anormal entre el NSQ transplantado y el cerebro hospedero, en donde el transplante también tenga efectos sobre las estructuras efectoras del sistema circadiano y afecten la relación entre las señales de salida del hospedero y la respuesta de los demás elementos efectoras del sistema. Es decir, es posible que las salidas del transplante dependan completamente de señales humorales, mientras que las del NSQ hospedero incluya una conectividad sináptica específica, por lo que es posible que esta comunicación anormal por parte del transplante pueda generar variabilidad en la fase (Aguilar et al. 1998).

Debido a estas escasas proyecciones que recibe el NSQ transplantado, también es probable que este requiera una mayor intensidad luminosa para cambiar su fase, o bien que el pulso sea de una mayor duración. Estos cambios de fase atípicos también podrían deberse a que la curva de respuestas de fase a la luz se encuentre desfasada en comparación de los animales intactos, de tal forma que la relación de la zona de avances y retrasos de fase sea diferente que en animales intactos.

¿La localización del trasplante es determinante para que pueda establecerse el proceso de acoplamiento entre el NSQ transplantado y el NSQ hospedero?. Es de notarse, que estas respuestas de fase atípicas a la luz se observaron también en los animales en los que el trasplante fue colocado en el ventrículo lateral, por lo que la localización del trasplante no es determinante para que pueda establecerse el proceso de acoplamiento. Estos datos son análogos a observaciones previamente realizadas en nuestro laboratorio, en donde trasplantes de NSQ en esta cavidad ventricular produce un desfaseamiento en la actividad metabólica del NSQ hospedero (Aguilar-Roblero et al. 1998). Estos resultados nos sugieren que un posible mecanismo de acoplamiento entre osciladores circadianos ubicados a distancia sea mediante señales difusibles (Aguilar-Roblero et al. 1994). De hecho existen evidencias en donde la recuperación de la función rítmica en animales previamente lesionados, es alcanzada mediante trasplantes en donde el NSQ transplantado se encuentra aislado mediante una capa polimérica semipermeable, la cual previene el crecimiento de proyecciones neurales, pero que permite la difusión de señales humorales (Silver et al. 1996). Por lo que también es posible que el proceso de acoplamiento entre osciladores pueda llevarse a cabo de esta misma forma.

¿La glándula pineal participa en el proceso de acoplamiento?. En el grupo de animales que recibieron trasplante de NSQ en el ventrículo lateral y que posteriormente fueron pinealectomizados, se encontraron cambios en las respuestas de fase por luz que sugieren que la glándula pineal participa en el proceso de acoplamiento. El primer dato que no resulta interesante fue que a pesar de que estos animales mostraron retrasos de fase cuando los pulsos de luz fueron aplicados en la zona de avances de fase, estos animales exhibieron una disminución importante en la magnitud de los cambios de fase. Un segundo efecto asociado a la pinealectomía que también es de llamar la atención, fue el notorio decremento en el número de ciclos transitorios para adquirir el estado estable posterior a la aplicación del pulso de luz. Estos resultados nos sugieren que la exéresis de la glándula pineal tiene como

consecuencia una disminución en la fuerza de acoplamiento entre el NSQ transplantado y el NSQ hospedero, lo cual se ve manifestado en el decremento de la magnitud de los cambios de fase, así como en los ciclos transitorios.

Existen estudios en la literatura en los que se ha explorado la participación de la pineal sobre el proceso de acoplamiento. Servière et al. (1994) analizaron los efectos de la pinealectomía en hámsters que recibieron trasplantes de NSQ en el IIV, en este estudio encontraron que el ritmo de actividad metabólica del NSQ transplantado se encontraba enfocado a la del NSQ hospedero, por lo que los autores sugieren que las secreciones de la pineal no constituyen una señal acopladora necesaria para el sistema.

Cabe hacer mención, que las discrepancias en cuanto a lo reportado por Servière et al. (1994) y los resultados obtenidos en el presente estudio se deben principalmente a las especies en las que fueron elaborados los estudios. Servière et al. (1994) utilizaron hámsters *sirios* y se ha comprobado que esta especie de roedores no son sincronizados mediante inyecciones de *Mel* (Armstrong, 1989), administraciones únicas de *Mel* no inducen cambios de fase en la actividad locomotora (Hastings et al. 1992), y además la pinealectomía no produce alteraciones en la CRF (Cassone et al. 1993). Mientras que las ratas si pueden ser sincronizadas por inyecciones de *Mel* (Thomas y Armstrong, 1988), la ritmicidad en la actividad eléctrica y metabólica del NSQ es afectada por la aplicación de *Mel* (Cassone et al. 1987, 1988), administraciones únicas de *Mel* son capaces de inducir cambios de fase a nivel conductual (Chesworth, 1987) y la pinealectomía modifica las respuestas de fase a la luz, ya que hace que los cambios de fase ocurran más rápidamente ya que se ha sugerido que se incrementa la sensibilidad a la luz (Armstrong, 1989).

Estas evidencias nos indican claramente que a diferencia de las ratas, los hámsters *sirios* son insensibles a los efectos circadianos de la melatonina.

Se ha sugerido que en ratas la *Mel* sintetizada por la pineal incrementa el acoplamiento en el sistema circadiano (Aguilar-Roblero y Vega-González, 1993;

Cassone et al. 1993), esto tiene fundamento con base en diversas evidencias experimentales, entre estas, se sabe que ratas pinealectomizadas bajo condiciones de luz continua brillante pierden totalmente la ritmicidad, lo cual ha sido interpretado como un desacoplamiento del sistema multioscilario de la rata, por lo tanto estos son más susceptibles a los efectos disruptores de la luz (Aguilar-Roblero y Vega-González, 1993; Cassone et al. 1993). También se ha reportado la disociación de las fases de sueño y los ritmos endocrinos por efecto de la pinealectomía (Mouret et al. 1974; Niles et al. 1979) por lo que se sugiere que la pineal actúa como un elemento acoplador que coordina la sincronía interna de diversas funciones fisiológicas.

Nuestros resultados sugieren que la pineal participa en el proceso de acoplamiento, pero que la presencia de esta no es necesaria para que pueda establecerse este proceso.

En relación a la inducción fótica de c-Fos en el NSQ hospedero durante la noche subjetiva temprana, encontramos un efecto inespecífico en los animales que recibieron transplante de NSQ en el IIIV. Este efecto lo observamos predominantemente en la región ventral del NSQ en donde tanto los animales que recibieron transplante de NSQ, como los animales que recibieron transplante de corteza en esta cavidad ventricular, mostraron un incremento significativo en el número de células positivas a Fos. Observamos en estos animales una gran distensión del tercer ventrículo debido a la presencia del transplante, por lo que es posible que a la respuesta inducida por el pulso de luz estemos detectando un efecto mecánico ejercido por la distensión del tercer ventrículo. Este efecto solamente fue encontrado en la hora circadiana 13, sabemos que la máxima expresión de c-Fos en el NSQ por pulsos saturantes de luz es obtenida en CT 23, en esta fase circadiana al parecer están siendo activadas toda la población de células que son capaces de responder a este tipo de información fótica, mientras que en CT 13 solo responde

parte de esta población. Por tal motivo puede deberse que este efecto se encontró exclusivamente en la zona de retrasos de fase de la CRF.

Cabe mencionar que el NSQ hospedero de los animales que recibieron el trasplante en el ventrículo lateral, no se observó dicho efecto en la expresión de c-Fos, de hecho estos animales mostraron una disminución significativa en el número de células positivas a esta proteína en esta región del hospedero.

A nivel celular no se observaron cambios en la expresión de Jun-b del NSQ hospedero en ninguno de los grupos experimentales.

Un efecto importante a nivel celular, fue la ausencia de inducción fótica de c-Fos y de Jun-b en el NSQ transplantado tanto en el IIIV, como en el VI. en las dos fases circadianas bajo estudio. De hecho en el NSQ transplantado observamos que el número de células inmunopositivas fue inferior al nivel de expresión basal de estas proteínas en el NSQ de ratas intactas. Esta ausencia en la inducción de estas dos proteínas por pulsos de luz nos sugieren que posiblemente la información fótica no alcanza al NSQ transplantado en el lapso de 1 hora, por lo tanto los efectos que estamos observando a nivel conductual son posteriores a esta ventana de tiempo, lo cual nos sugiere que la comunicación entre el NSQ hospedero y el trasplante es lenta, lo cual nos inclina a pensar que el mecanismo que posiblemente participe en el proceso de acoplamiento sea de tipo humoral.

[1] Las alteraciones en las respuestas de fase a nivel conductual nos indican que el NSQ transplantado y el NSQ hospedero se encuentran acoplados.

[2] La localización del trasplante no es determinante para que se lleva a cabo el proceso de acoplamiento, lo cual a su vez nos sugiere que estén participando mecanismos de tipo humoral en dicho proceso.

[3] La pineal participa en este proceso, aun que no es indispensable para el establecimiento de este proceso. La ausencia de esta glándula produce una disminución en la fuerza de acoplamiento.

[4] Los cambios observados en las respuestas de fase son específicos al tipo de tejido transplantado.

[5] Los estudios a nivel celular revelaron que en el lapso de 1 hora la información fótica no alcanza al NSQ transplantado, por lo que en este no ocurre la activación de las proteínas c-Fos y Jun-b.

Aguilar-Roblero, R.; García-Hernández, F.; Aguilar, R.; Arankowsky, G. y Drucker-Colín, R. (1986): Suprachiasmatic nucleus transplants functions as endogenous oscillator only in constant darkness. *Neuroscience Letters* 69: 47-62.

Aguilar-Roblero, R. y Drucker-Colín, R. (1987): The role of suprachiasmatic nuclei in the regulation of circadian rhythm in mammals. *Bol. Est. Med. y Biol.* 35: 35-51.

Aguilar-Roblero, R.; Drucker-Colín, R. y Moore, R.Y. (1992): Behavioral and morphological studies of fetal neural transplants into SCN-lesioned rats. *Chronobiology International* 9: 278-296.

Aguilar-Roblero R. (1993 a) Teorías básicas de los ritmos biológicos. *Psiquis* 2: 121-132.

Aguilar-Roblero, R. y Vega-González, A. (1993 b): Splitting of locomotor circadian rhythm in hamsters facilitated by pinealectomy. *Brain Research* 605:229-236.

Aguilar-Roblero, R., Verduzco, L.; Rodriguez, C.; Méndez, J.; Morán, J. y Perez de la Mora (1993 c): Circadian rhythmicity in GABAergic system in the suprachiasmatic nuclei of rat. *Neuroscience Letters* 157: 199-202.

Aguilar-Roblero, R.; Morin, L. y Moore, R. (1994): Morphological correlates of circadian rhythm restoration induced by transplantation of the suprachiasmatic nucleus in hamsters. *Experimental Neurology* 130: 250-260.

Albrecht U., Sun Z., Eichele G. y Lee C. (1997) A differential response of two putative mammalian circadian regulators, *mper1* and *mper2*, to light. *Cell* 91: 1055-1064.

Aronson B., Johnson K., Loros J. y Dunlap J. (1994). Negative feedback defines a circadian clock: autoregulation of the clock gene frequency. *Science* 263: 1578-1584.

Aschoff J. (1951) Die 24-stunden periodik der maus unter konstanten umgebungsbedingungen. *Naturwissenschaften* 38: 506-507.

Aschoff J. (1954) Zeitgeber die tierreschen tagesperiodik. *Naturwissenschaften* 41: 49-56.

Aschoff J. (1960) Exogenous and endogenous component in circadian rhythms. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 25: 11-26.

Aschoff J. (1979) Influences of internal and external factors on the period measured in constant conditions. *Z. Tierpsychol.* 49: 225-249.

Aschoff J. (1981) A survey on biological rhythms. En: *Handbook of behavioral neurobiology*. Vol. 4 Biological Rhythms. Plenum Press, New York, USA pp 3-10.

Best J., Maywood E., Smith K. y Hastings M (1999) Rapid resetting of the mammalian circadian clock. *J Neurosci* 19: 828-835.

Björklund A. y Stenevi U. (1979): Reconstruccion of the nigrostriatal dopamine pathway by intracerebral nigral transplants. *Brain. Res.* 177: 555-560.

Björklund A. y Stenevi U. (1985): Intracerebral neural grafting: a historical perspective. En: *Neural grafting in the mammalian CNS*. Björklund A. y Stenevi U. (Ed.), *Amsterdam: Elsevier*. Pp 3-11.

Binkley S. y Mosher K. (1987) Circadian rhythm resetting in sparrows: early response to double light pulses. *J. Biol. Rhythms* 2: 1-11.

Brendt D. y Snyder S. (1992) Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *J. Comp. Neurol.* 8: 3-11.

Bruce V. y Pittendrigh C.S. (1956) Temperature independence in a cellular clock. *Proc Natl Acad Sci USA* 42: 676-682.

Caldelas I., Salazar-Juarez A., Granados-Fuentes D., Escobar C., y Aguilar-Roblero R. (1998): Circadian modulation of c-Fos expression occurs in the SCN but not in other visual projection areas in the rat. *Biological Rhythms Research* 29: 494-500.

Cassone V., Chesworth J.M. y Armstrong S. (1986a): Dose-dependent entrainment of rat circadian rhythms by daily injections of melatonin. *J. Biol. Rhythms* 1: 219-229.

Cassone V., Chesworth J.M. y Armstrong S. (1986b): Entrainment of rat circadian rhythms by daily injections of melatonin depends upon the hypothalamic suprachiasmatic nuclei. *Physiol. Behav.* 36: 1111-1121.

Cassone V., Roberts H. y Moore R.. (1988): Effects of melatonin on 2-deoxy[1-14c]glucose within the rat suprachiasmatic nucleus. *Am. J. Physiol.* 255: R332-R337.

Cassone, V. (1992) The pineal gland influences rat circadian activity rhythms in constant light. *J. of Biological Rhythms* 7: 27-40.

Cattanach B., Idden C., Charlton H., Ciappa S., y Fink G. (1977): Gonadotropin-releasing hormone deficiency in a mutant mice with hypogonadism. *Nature Lond.* 269: 338-240.

Charlton H., Halpin D., Idden C., Rosie R., Levy G., McDowell I., Megson A., Morris J., Bramwell A., Speight A., Ward B., Broadhead J., Davy-Smith G. y Fink G. (1983): The effect of daily administration of single and multiple injections of gonadotropin-releasing hormone on pituitary and gonadal function in the hypogonadal (hpg) mouse. *Endocrinology* 113: 535-544.

Colwell, C.; Ralph, M.; Menaker, M. (1990): Do NMDA receptors mediate the effect of light on circadian Behavior?. *Brain Res.* 523: 117-120.

Coyle J. y Schwarcz R. (1976): Lesion of striatal neurons with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. *Nature Lon.* 263: 244-246.

Crosthwaite S., Loros, J. y Dunlap J. (1995) Light induced resetting of a circadian clock is mediated by a rapid increase in *frequency* transcript. *Cell* 81:1003-1012.

Crutcher K. (1990): Age-related decrease in sympathetic sprouting is primarily due to decreased target receptivity: Implications for understanding brain aging. *Neurobiol. Aging* 11: 175-183.

Daan S. y Pittendrigh C.S. (1976) A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. II The variability of phase response curves. *J Comp Physiol* 106: 253-266.

Davis F. y Mannion J. (1988): Entrainment of hamster pup circadian rhythms by prenatal melatonin injection to the mother. *Am. J. Physiol.* 255: R439-R448.

Deckel A., Moran T. y Robinson R. (1983): Behavioral recovery following Kainic acid lesions and fetal implants of the striatum occurs independent of dopaminergic mechanisms. *Brain Res.* 363: 383 385.

Deckel A., Robinson R., Coyle J. y Sanberg P. (1986): Reversal of long-term locomotor abnormalities in the kainic acid model of Huntington's disease by day 18 fetal striatal implants. *Eur. J. Pharmacol.* 93: 287-288.

DeCoursey P. (1960): Daily light sensitivity rhythm in a rodent. *Science* 131: 33-35.

Díaz-Muñoz M., Dent M., Granados-Fuentes D., Hall A., Henández-Cruz A., Harrington M. y Aguilar-Roblero R. (1999) Circadian modulation of the ryanodine receptor type2 in the SCN of rodents. *NeuroReport* 10: 481-486.

Ding J., Chen D., Weber E., Faiman L., Rea M. y Gillette M. (1994) Resetting the biological clock: mediator of nocturnal circadian shift by glutamate and NO. *Science* 266: 1713-1717.

Ding J., Hurst W., Faiman L., Kuriashkina L. y Gillette M. (1995) Circadian regulation of CREB phosphorylation in the suprachiasmatic nucleus by light, glutamate and nitric oxide. *Soc. Neurosci. Abstr.* 21: 1677.

Ding J., Buchanan G., Tischkau S., Chen D., Kuriashkina L., Faiman L., Alster J., McPherson P., Campbell K. y Gillette M. (1998) A neural ryanodine receptor mediates light-induced phase delays of the circadian clock. *Nature* 394: 381-384.

Dowse H. y Palmer J. (1969) Entrainment of circadian activity rhythms in mice electrostatic fields. *Nature* 222: 564-566.

Duffield G. y Ebling F. (1998) Maternal entrainment of the developing circadian system in the siberian hamster. *J. Biol. Rhythms* 13: 315-329.

Drucker-Colín, R.; Aguilar-Roblero, R.; García-Fernández, F.; Fernández-Cancino, F. y Bermudez-Rattoni, F. (1984): Fetal suprachiasmatic nucleus transplants: diurnal rhythm recovery of lesioned rats. *Brain Research*, 311:353-357.

Drucker-Colín R., Madrazo F., F. Ostrosky-Solís, Snkurovich M., Franco R. y Torres C. (1988): Adrenal medullary tissue transplants in the caudate nucleus of Parkinson's patients. *Prog. Brain Res.* 78: 567-574.

Dunn E. (1917): Primary and secondary findings in a series of attempts to transplant cerebral cortex in albino rat. *J. Comp. Neurol.* 27: 565-582.

Dunnett S., Björklund A., Schmidt H., Stenevi U. e Iversen S. (1983): Behavioral recovery in rats with unilateral 6-OHDA lesions following implantation of nigral cells suspensions in different brain sites. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 522: 29-38.

Dunnett S., Björklund A., Schmidt H., Stenevi U. e Iversen S. (1981): Behavioral recovery following transplantation of substantia nigra in rats subjected to 6-OHDA lesions of the nigro-striatal pathway. II Bilateral lesions. *Brain Res.* 229: 457-470.

Dunnett S., Isacson O., Sirinathsingji D., Clarke D. y Björklund A. (1988): Striatal grafts in rats with unilateral neostriatal lesions. III. Recovery from dopamine-dependent motor asymmetry and deficits in skilled paw reaching. *Neuroscience* 24: 813-820.

Ebling F., Maywood E., Staley K., Humby T. Hancock D, Waters C., Evan G. y Hastings M. (1991) The role of N-metil-D-spartate-type glutamatergic neurotransmission in the photic induction of immediate early genes expression in the suprachiasmatic nuclei of the siberian hamster. *J. Neuroendocrinol.* 3: 641-652.

Finger S. y Dunnet S. (1989): Nimodipine enhances growth and vascularization of neural grafts. *Exp. Neurol.* 104: 1-9.

Finkelstein J., Baum F. y Cambell C. (1978): Entrainment of female hamster to reversed photoperiod. Roll of the pineal. *Physiol. Behav.* 21: 105-111.

Gage F., Björklund A., Stenevi U. y Dunnett S. (1981): Intracerebral grafting of neuronal cell suspensions. VIII. Survival and growth of implants of nigral and septal cell suspension in intact brains of aged rats. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 522: 67-75.

Ganon, R. y Rea, M. (1993): Glutamate receptor immunoreactivity in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Research* 622: 337-342.

Gash D., Sladek C. y Sladek A. (1980): A model system for analyzing functional development of transplanted peptidergic neurons. *Peptides* 1: 125-134.

Gaston S. y Menaker M. (1968): Pineal function: the biological clock in the sparrow?. *Science* 160: 1125-1127.

Gibson M., Krieger D., Charlton H., Zimmerman A., Silverman A. y Perlow M. (1984): Mating and pregnancy can occur in genetically hypogonadal mice with preoptic area brain grafts. *Science Wash. D.C.* 225: 949-951.

Gillette M., Medanic M., McArthur A., Liu C., Ding J., Faiman L., Weber E., Tchong T. y Gallman E. (1995) Electrophysiology of the SCN clock: intrinsic neuronal rhythms and their adjustment. En: Watherhause (Ed.) Ciba Foundation Symposium: Circadian Clocks and their adjustment. Wiley, Chichester. Pp. 134-153.

Gillette M. y McArthur A. (1996) Circadian actions of melatonin at the suprachiasmatic nucleus. *Behav. Brain. Res.* 73: 135-139.

Gillette M. (1996) Regulation of entrainment pathways by the suprachiasmatic circadian clock: Sensitivities to second messengers. *Progress in Brain Research* 111: 121-132.

Goldman B. D. (1983): The physiology of melatonin in mammals. En: R.J. Reiter (Ed.) *Pineal Research Reviews*, Vol. 1: 145-182.

Goldman B. D. y Darrow J. (1983): The pineal gland and mammalian photoperiodism. *Neuroendocrinology* 37:386-396.

Golombek D. y Ralph M. (1994): KN-62, an inhibitory of Ca^{2+} /calmodulin kinase II, attenuates circadian response to light. *NeuroReport* 5:1638-1640.

Ginty D., Kornhauser J., Thomposon M., Bading H., Mayo K., Takahashi J. y Greenberg M. (1993). Regulation of CREB phosphorylation in the suprachiasmatic nucleus by light and a circadian clock. *Science* 260: 238-241.

Gwinner E., Subbaray R. y Bluhm C. (1987): Differential effects of pinealectomy on circadian rhythms of feeding and perch hopping in the european starling. *J. Biol. Rhythms* 2: 109-120.

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

Hallas B., Das G. y Das K. (1980): Transplantation of brain tissue in the brain of rat. II. Growth characteristics of neocortical transplants in hosts of different ages. *Am. J. Anat.* 158: 147-159.

Hastings M., Best J., Ebling F., Maywood, E., McNulty S., Schurov I., Selvage D., Sloper P. y Smith K. (1996) Entrainment of the circadian clock. *Progress in Brain Research* 111: 147-174.

Hickey T. y Spear P. (1976). Retinogeniculate projections in hooded and albino rats. *Exp. Brain Res.* 24: 523-529.

Hoffmann K. (1969) Zum einfluss der Zeitgeberstärke auf die phaselänge die synchronisierten aracaciradianen peridik. *Z. Vergl. Physiol.* 62: 93-110.

Hoffman K. (1971) Splitting of the circadian rhythm as a function of light intensity. En: *Biochronometry*. M Menaker. Ed. Washington D.C., National Academy of Science, pp. 134-150.

Hunter T. (1995). Protein kinases y phosphatases: The yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 80:225-236.

Hsu, S.; Raine, L. y Fanger, H. (1981): The use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. of histochemistry and histochemistry* 29:577.

Ibuka, N. y Kawamura, H. (1975): Loss of the circadian rhythm in sleep-wakefulness cycle in the rat by suprachiasmatic nucleus lesion. *Brain Research* 96: 76-81.

Illnerová H., Vanecek J. y Hoffman K. (1983): Regulation of the pineal melatonin concentration in the rat (*Rattus norvegicus*) and in the djungarian hamster (*Phodopus djungarus*). *J. Comp. Biochem. Physiol.* 74: 155-159.

Isacson O., Brundin B., Kelly P., Gage F. y Björklund A. (1984): Functional neural replacement by grafted striatal neurons in the ibotenic acid lesioned rat striatum. *Nature Lond.* 311: 458-460.

Isacson O., Dunnett S. y Björklund A. (1986): Graft induced behavioral recovery in an animal model of Huntington' disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 2728-2732.

Jiang, Z.; Yang, Y. y Allen, C. (1997): Tracer and electrical coupling of rat suprachiasmatic nucleus neurons. *Neuroscience* 77: 1059-1066.

Johnson R., Moore R. y Morin L (1988). Retinohypothalamic projections in the rat and hamster demonstrated using cholera toxin. *Brain Res* 462: 301-312.

Kim, Y. y Dudek, F. (1991): Intracellular electrophysiological study of suprachiasmatic nucleus neurons in rodents: Excitatory synaptic mechanisms. *Journal of Physiology* 444:269-287.

Kincl F., Chang C. y Zluzkoua V. (1970): Observation on the influence of changing photoperiod on spontaneous wheel-running activity of neonatally pinealectomized rats. *Endocrinology* 87: 38-42.

- Klein D. y Weller J. (1972): Rapid light-induced decrease in pineal serotonin n-acetyl transferase activity. *Science* 177: 532-533.
- Konopka R. y Benzer S. (1971) Clock mutants of *Drosophila Melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68: 2112-2116.
- Kornhauser, J.; Nelson, D.; Mayo, K. y Takahashi, J. (1992): Regulation of *jun*-B messenger RNA and AP-1 activity by light and circadian clock. *Science* 255: 1581-1584.
- Kornhauser J., Ginty D., Greenberg M., Mayo K. y Takahashi J. (1996) Light entrainment and activation signal transduction pathways in the SCN. *Progress in Brain Research* 111: 134-146.
- Krieger D. (1974) Food and water restriction shifts corticosterone, activity and brain amine periodicity. *Endocrinology* 95: 1195-1201.
- Krieger D., Perlow M., Gibson M., Davies T., Zimmerman A., Ferin M. y Charlton H. (1982): Brain grafts reverse hypogonadism of gonadotropin releasing hormone deficiency. *Nature Lond.* 298: 468-471.
- Kromer L., Björklund A. y Stenevi U. (1979): Intracerebral implants: a technique for studying neuronal interactions. *Science Wash. D.C.* 204: 1117-1119.
- Krum J., y Rosenstein J. (1988): Patterns of angiogenesis in neural transplant models. II. Fetal neocortical transplants. *J. Comp. Neurol.* 271: 331-345.
- Le Gros Clark W. (1942): The problem of neuronal regeneration in the central nervous system. I. The influence of spinal ganglia and nerve fragments grafted in the brain. *J. Anat.* 77: 20-48.
- Long J., Kalehua A., Muth N., Hengemihle J., Jucker M., Calhoun M., Ingram D. y Mouton P. (1998): Stereological estimation of total microglia number in mouse hippocampus. *J. Neurosci. Methods* 84: 101-108.
- Marimothu G., Subbaraj R. y Chandras H. (1978) Social synchronization of the activity rhythm in a cave dwelling insectivorous bat. *Naturwissenschaften* 65: 600.
- McArthur A., Gillette M. and Prosser R. (1991): Melatonin directly resets the rat suprachiasmatic circadian clock in vitro. *Brain. Res.* 656: 158-161.

McGeer P. y McGeer E. (1976): Duplication of biochemical changes of Huntington's chorea by intrastriatal injections of glutamic and kainic acids. *Nature Lond.* 263: 517-519.

Medawar P. (1948): Immunity to homologous grafted skin. III. Fate of skin homografts transplanted in to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Br. J. Exp. Pathol.* 29: 58-69.

Meijer J., Van de Zee E. y Dietz M. (1988). Glutamate phase shifts circadian activity rhythms in hamsters. *Neurosci. Letters* 86: 177-183.

Miller, J.; Morin, L.; Schwartz, W.; Moore, R. (1996): New insights in to the mammalian circadian clock. *Sleep* 19: 641-667.

Moore, R.; Speh, J. y Card, J. (1996): The retinohypothalamic tract originates from a distinct subset of retinal ganglion cells. reprint.

Moore R., Karapas F. y Lenn N. (1971). A retinohypothalamic projection in the rat. *Anat. Res.* 169: 382-383.

Moore R. y Lenn N. (1972). A retinohypothalamic projection in the rat. *J. Comp. Neurol.* 146: 1-14.

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

Moore R. (1978): The innervation of the mammalian pineal gland. *Prog. Reprod. Biol.* 4: 1-29.

Moore R., Gustafson E. y Card J. (1984). Identical immunoreactivity of afferents to the rat suprachiasmatic nucleus with antisera against avian pancreatic polypeptide, molluscan cardioexcitatory peptide and neuropeptide Y. *Cell Tis. Res.* 236: 41-46.

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

Moore R. y Card J. (1994). The intergeniculate leaflet: An anatomically and functionally distinct subdivision of the lateral geniculate complex. *J. Comp. Neurol.* 344: 403-430.

Moore R. (1996) Entrainment pathways and the functional organization of the circadian system. *Progress in Brain Research* 111: 103-119.

Morin L.P. (1988): Age related changes in the hamster circadian period, entrainment and rhythm splitting. *J. Biol. Rhythms* 3: 237-248.

Nishiitsutsuji-Uwo J. y Pittendrigh C. S. (1968) Central nervous system control of circadian rhythmicity in the cockroach. III. The optic lobes, locus of the driving oscillator?. *Z. Vergl. Physiol.* 58: 14-46.

Ottesen E. (1965) Analytical studies on a model for the entrainment of circadian systems. Tesis de licenciatura. Princeton University, USA.

Pittendrigh C.S. (1954) On the temperature independence in the clock system controlling emergence time in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 40:1018-1029.

Pittendrigh C.S. y Bruce V. (1957) An oscillator model for biological clocks. En: Rhythmic and synthetic processes in growth. D. Rudnick, Ed. Princeton, New Jersey, Princeton University Press. pp. 75-109.

Pittendrigh C.S. (1958a) Adaptation, natural selection and behavior. En: Behavior and Evolution. A Roe y G. Simpson eds. Yale University Press pp. 390-416.

Pittendrigh C.S., Bruce V. y Kaus P. (1958b) On the significance of transients in daily rhythms. *Proc Natl Acad Sci USA* 44: 965-973.

Pittendrigh C.S. y Bruce V. (1959) Dayli rhythms as coupled oscillator systems and their relation to thermoperiodism and photoperiodism. En: Photoperiodism and related phenomena in plants and animals. american association for the advancement of science, Washington D.C. pp475-505.

Pittendrigh C.S. (1960) Circadian Rhythms and the Circadian Organization of Living Systems. XXV Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol. 159-184.

Pittendrigh C.S. y Minis D. (1964) The entrainment of circadian oscillations by light and their role as photoperiodic clocks. *The American Naturalist* XCVIII: 261-294.

Pittendrigh C.S. (1965a) On the Mechanism of the Entrainment of a Circadian Rhythm by Light Cycles. Circadian Clocks, J. Aschoff, ed. Pp. 277-297.

Pittendrigh C.S. (1965b) Biological Clocks, the Functions, Ancient and Modern, of Circadian Oscillations. Science in the Sixties, Proceedings of the 1965 Cloudcroft Symposium, Air Force Office of Scientific Research, pp. 96-111.

Pittendrigh C.S. (1966) The circadian oscillation in *Drosophila Pseudoobscura* pupae: A model for the periodik clock. *Z Pflanzenphysiol* 54: 275-307.

Pittendrigh C.S. (1967) Circadian systems I. The driving oscillation and its assay in *drosophila pseudoobscura*. *Proc Natl Acad Sci USA* 58: 1762-1767

Pittendrigh C.S. (1972) Circadian surfaces and the diversity of possible roles of circadian organization in photoperiodic induction. *Pr. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 2734-2737.

Pittendrigh C.S. (1973) Circadian oscillations in cells and the circadian organization of the circadian organization of multicellular systems. En: *Circadian Oscillations and Neurophysiology: An Introduction*. Third Study Program, Ed. F.O. Schmitt (MIT Press, Cambridge, Mass.). pp. 437-458.

Pittendrigh C.S. y Daan S. (1974) Circadian oscillations in rodents; A systematic increase of their frequency with age. *Science* 186: 548-551.

Pittendrigh C.S. y Daan S. (1976a) A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. I The stability and lability of spontaneous frequency. *J Comp Physiol* 106: 223-252.

Pittendrigh C.S. y Daan S. (1976b) A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. IV Entrainment: Pacemaker as clock. *J Comp Physiol* 106: 291-331.

Pittendrigh C.S. (1979) Some functional aspects of circadian pacemakers. En: *Biological rhythms and their central mechanism*. The Naito Foundation. Masami Suda, Osamu Hayaishi y Hachiro Nakagawa Eeds. Elsevier/North Holland Biomedicael Press. pp.3-15.

Pittendrigh C.S. (1981c) Circadian Systems: Entrainment. In: *Handbook of Behavioral Neurobiology*, Vol.4, Biological Rhythms, Plenum Press, New York., ed., J. Aschoff, pp. 95-124.

Pittendrigh C.S. (1981a) Circadian Systems: General Perspective. In: *Handbook of Behavioral Neurobiology*, Vol. 4 Biological Rhythms. Plenum Press, New York. Ed. J. Aschoff. Pp. 57-77.

Pittendrigh C.S. (1981b) Circadian Organization and the Photoperiodic Phenomena. In: Biological Clocks in Seasonal Reproductive Cycles. ed. B.K. Follett, John Wright, Bristol. Pp. 1-35.

Pittendrigh C.S. (1993) Temporal Organization: Reflections of a Darwinian Clockwatcher. *Ann. Rev. Physiol.* 55: 17-54.

Prosser R. y Gillette M. (1989). The mammalian circadian clock in the suprachiasmatic nuclei is reset in vitro by CAMP. *J. Neurosci.* 9: 1073-1081.

Puchalski W. y Lynch G. (1991): Expresión of circadian rhythmicity in djungarian hamsters under constant light: Effects of light intensity and the circadian system state. *J. Comp. Physiol.* 169: 185-189.

Quay W.B. (1968): Individuation and lack of pineal effect in the rats circadian locomotor rhythm. *Physiol. Behav.* 3: 109-118.

Quay W.B. (1970): Precocious entrainment and associated characteristics of activity patterns following pinealectomy and reversal of photoperiod. *Physiol. Behav.* 5: 1281-1290.

Ramon y Cajal S. (1928): Degeneration and regeneration of the nervous system. *Londou: Oxford Univ. Press.* Pp.

Ranson S. (1909): Transplantation of the spinal ganglion into the brain. *Q. Bull. Northwest. Univ. Med. Sch.* 11: 176-178.

Redman J., Armstrong S. y Nag K. (1982): Free-running activity rhythm in the rat: entrainment by melatonin. *Science* 219: 1089-1091.

Reinberg A y Smolensky M (1993) Investigative methodology for chronobiology. En: Biological rhythms and medicine. A. Reinberg y M. Smolensky (Eds.) Springer Verlag New York, USA. Pp 23-46.

Reiter R. (1980a): The pineal and it's hormones on the control of reproduction in mammals. *Endocrinology* 1: 109-131.

Reiter R. (1980b): The pineal gland: a regulator of regulators. *Prog. Psychobiol. Psychol.* 2:323-335.

Reppert S., Duncan M. y Weaver D. (1987) Maternal influences on the developing circadian system. En: Prenatal development: A psychobiological perspective. Academic Press. Pp. 343-356.

Reppert S., Weaver D., Rivkees S. y Stopa E. (1988): Putative melatonin receptor in a human biological clock. *Science* 242:78-81.

Reppert S. y Weaver D. (1989): Maternal transduction of light-dark information for the fetus. En: W.P. Smotherman and S.R. Robinson (Eds.), *Behavior of the fetus*, Telford, Caldwell, NJ. Pp. 78-81.

Rea, M.; Buckley, B. y Lutton, L.M. (1993): Local administration of EAA antagonists blocks light-induced phase shifts and c-fos expression in hamsters SCN. *Am. J. Physiol.* 265: R1191-R1198.

Reuss S. (1997): Electrical activity of the mammalian pineal gland. *Pineal Res. Rev.* 5: 153-189.

Romero T. y Silver R. (1989): Control phase and latency to recover circadian locomotor rhythmicity following transplantation of fetal SCN into lesioned adult hamsters. *Soc. Neurosci. Abstr.* Pp.175.

Rusak, B.; Robertson, H.; Wisden, W. y Hunt, S. (1990): Light pulses that shift rhythms induce gene expression in the suprachiasmatic nucleus. *Science* 248:1237-1239.

Satinoff, E. y Prosser, r. (1988): Suprachiasmatic nuclear lesions eliminate circadian rhythms of drinking and activity, but not of the body temperature, in male rats. *Journal of Biological Rhythms* 3: 1-22.

Schwarz, W.J.; Gainer, H. (1977): Suprachiasmatic nucleus: Use of 14-C labeled deoxyglucose as functional marker. *Science* 197: 1089-1091.

Servière, J. Gendrot, G. LeSauter, J. y Silver, R. (1994): Host resets phase of grafted suprachiasmatic nucleus: a 2-DG study of time course of entrainment. *Brain Research* 655: 168-176.

Sharma V. y Chandrashekar (2000): Probing the circadian oscillator of mammal by two-pulse perturbations. *Chronobiol. Int.* 17:129-136.

- Sharma V., Chidambaram R. y Chandrashekaran (2000): Probing the circadian pacemaker of a mouse using two light pulses. *J. Biol. Rhythms* 15: 67-73.
- Sherman L.P. and Weaver D.R. (1999): Photic induction of period gene expression is reduced in clock mutant mice. *NeuroReport* 10: 613-618.
- Shinohara, K.; Honma, S.; Katsuno, Y.; Abe, H. y Honma, K. (1995): Two distinct oscillators in the rat suprachiasmatic nucleus in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 92: 7396-7400.
- Shigeyoshi Y., Taguchi K., Yamamoto S., Takekida S., Yan L., Tei H., Moriya T., Shibata S., Loros J., Dunlap J. and Okamura H. (1997): Light induced resetting of a mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the *mper1* transcript. *Cell* 91: 1043-1053.
- Stenevi U., Björklund A. y Svendgaard N. (1976): Transplantation of central and peripheral monoamine neurons to the adult rat brain: techniques and conditions for survival. *Brain Res.* 114:1-20.
- Stephan, F.K. Y Zucker, I. (1972): Circadian rhythms in drinking behaviour and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesion. *Proceeding National Academy Sciences* 69: 1583-1586.
- Stephan, F.K. (1992): Resetting of a feeding-entrainable circadian clock in the rat. *Physiology and Behavior* 52: 985-995.
- Sterio D. (1984): The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J. Microsc.* 134: 127-136.
- Stetson M., Elliot J. y Goldman B. (1986): Maternal transfer of photoperiodic information influences the photoperiodic information influences the photoperiodic response of prepubertal djungarian hamster. *Biol. Reprod.* 39: 664-669.
- Sugar O. y Gerard R. (1940): Spinal cord regeneration on the rat. *J. Neurophysiol.* 3: 1-19.
- Sun S., Albrecht U., Zhuchenko O., Bailey J., Eichele G. And Lee C. (1997): RIGUI, a putative mammalian ortholog of the *Drosophila* period gene. *Cell* 90: 1003-1011.

Takahashi J. y Menaker M. (1979) Physiology of avian circadian pacemaker. *Fed. Proc.* **38**: 2538-2588.

Tei, H.; Okamura H.; Shigeyoshi Y.; Fukahara C. Ozawa R.; Hirose M. and Sakaki Y. (1997): Circadian oscillation of a mammalian homologue of the *Drosophila* period gene. *Nature* **389**: 186-188.

Tello F. (1911): La influencia del neurotropismo en la regeneración de los centros nerviosos. *Trab. Lab. Invest. Biol. Univ. Madrid* **2**: 123-159.

Thune J. y Pakkenberg B. (2000): Stereological studies of the schizophrenic brain. *Brain Res. Rev.* **31**: 200-204.

Underwood H. (1977): Circadian organization in lizard *sclerorhynchus occidentalis*: the effect of pinealectomy, blinding and melatonin. *J. Comp. Physiol.* **191**: 537-597.

Underwood H. y Goldman B. (1987): Vertebrate circadian and photoperiodic system: role of pineal gland and melatonin. *J. Biol. Rhythms* **2**: 279-315.

Vanecek J., Pavlik A. E Illnerová II. (1987): Hypothalamic melatonin receptor sites revealed by autoradiography. *Brain Res.* **435**: 359-362.

Weaver D., Rivkees S. y Reppert S. (1989): Localization and characterization of melatonin receptors in rodent brain in vitro autoradiography. *J. Neurosci.* **2**: 2581-2590.

Welsh , D.K.; Logothetis, D.E.; Meister, M. y Reppert, S.M. (1995): Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* **14**: 685-709.

Winder H. y Brundin P. (1988): Immunological aspects of grafting in the mammalian central nervous system. A review and speculative thesis. *Brain Res. Rev.* **13**: 287-324.

Winfree A.T. (1970) The temporal morphology of a biological clock. En: Lectures on mathematics in the life science. Gerstenhaber Ed. Vol 2 Providence R. J. American Mathematical Society.

Winfree A.T. (1971) Corkscrews and singularities in fruitflies: resetting of the circadian eclosion rhythm. En: Biochronometry. Menaker Ed. Washington D.C. National Academy of Sciences. Pp. 81-106.

Witkin J. y Silverman A. (1985): Synaptology of luterizing hormone releasing hormone (LHRH) neurons in rat preoptic area. *Peptides* 6: 263-271.

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

Zatz M. (1979): Photoentrainment pharmacology and phase shifts of the circadian rhythm in the rat pineal. *Fed. Proc.* 38: 2596-2601.

Zhang, L. y Aguilar-Roblero, R. (1995): Asymmetrical electrical activity between the suprachiasmatic nuclei in vitro. *Neuroreport* 6: 537-540.

**CIRCADIAN MODULATION OF C-FOS EXPRESSION
OCCURS IN THE SCN BUT NOT IN OTHER VISUAL
PROJECTION AREAS IN THE RAT**

Caldelas I., Salazar-Juárez A., Granados-Fuentes D., Escobar C. and Aguilar-
Roblero R.

Circadian Modulation of c-Fos Expression Occurs only in the SCN and not in Other Visual Projection Areas in the Rat

Ivette Caldeas, Alberto Salazar-Juárez, Daniel Granados-Fuentes, Carolina Escobar and Raúl Aguilar-Roblero

Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Cerebral, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. México

ABSTRACT

Brief photic stimuli at different circadian times induce differential expression of c-Fos in the suprachiasmatic nuclei (SCN). Whether circadian modulation of light-induced c-Fos expression occurs in other visual projection areas is not known. We addressed this question by estimating the immunohistochemical expression of c-Fos induced by 60 min light pulses at three different circadian times. The areas studied were the SCN, the ventral lateral geniculate nucleus, the intergeniculate leaflet, the ventral tegmental area, the superior colliculus and a non-visual control, the paraventricular thalamic nucleus (PVT). Light pulses induced an increase in the number of c-Fos immunoreactive cells in the SCN as a function of the circadian time. Remaining visual structures showed a light-induced increase in c-Fos expression but this was not dependent on the circadian time. The non-visual control area (PVT) did not respond to light pulses. Since no circadian modulation was found in the intergeniculate leaflet, which receives collaterals from the same retinal ganglion cells that project to the SCN, nor in other primary visual projection areas, the present findings suggest that the circadian modulation of light-induced c-Fos expression in the SCN depends mainly on the functional properties of its intrinsic neurons.

KEYWORDS: Circadian rhythms, phase response curve, c-Fos, suprachiasmatic nucleus, visual projection areas, paraventricular thalamic nucleus.

INTRODUCTION

In mammals, the suprachiasmatic nuclei (SCN) comprise the pacemaker responsible for the generation and maintenance of a variety of physiological and behavioral circadian rhythms (Klein et al., 1991). This pacemaker adjusts its period and phase to the environmental light-dark (LD) cycle, which provides the organism

with the adaptive advantage of anticipating and predicting recurrent ambient conditions (Pittendrigh, 1993).

The photic information is conveyed to the SCN through the retino-hypothalamic tract (RHT), a monosynaptic pathway originating in the retinal W ganglion cells that project mainly to the ventrolateral area of the SCN (Moore et al., 1995). Light stimuli induce the release of glutamate or related excitatory amino acids from the RHT (Ebling, 1996), which in turn induce a cascade of intracellular events leading to the expression of the c-Fos gene in the SCN (Aronin et al., 1990). Light enhances c-Fos expression in the SCN only during subjective night, at circadian times when light delays or advances free-running rhythms (Rusak et al., 1990; Kornhauser et al., 1990; Daan & Pittendrigh, 1976). Furthermore, non-competitive blockers of NMDA receptors decrease the number of light-induced c-Fos immunopositive cells in the ventrolateral SCN (Rea et al., 1993) and prevent behavioral phase shifts (Colwell et al., 1990). This suggests that c-Fos expression in mammals could be an important event related to synchronization by light.

It has been proposed that the retina contains circadian oscillators that regulate melatonin synthesis essential for the function of the photoreceptors (Tosini & Menaker, 1996). It is thus possible that the retina could function as a gating mechanism for the input of photic information to the SCN. At present it is not known whether other structures that receive direct information from retinal ganglion cells also respond to light in a circadian manner. The present study was conducted to address this issue by assessing the expression of c-Fos in different primary retinal projections at different time points of the phase response curve.

MATERIALS AND METHODS

Adult male Wistar rats (180-200 g) were housed for synchronization in groups of 5 animals under a 12:12 LD cycle (lights on: 07:00 h) for at least two weeks with food and water *ad libitum*. Animals were randomly assigned either to the control or the experimental groups. After the synchronization period, animals were transferred to constant dim red light (DD) at exactly 19:00 h. On the fourth day in DD, CT 06, 13 and 23 were estimated to occur at 14:30, 21:30 and 07:30 h (geographical time) respectively, since in such conditions (DD) the free running rhythm in our colony delays by an average of 30 min per day. Animals from the control group ($n = 9$) were deeply anesthetized at the estimated times and processed for histology. Animals from the experimental group ($n = 9$) received a white light pulse (60 lux, 400 min) at either 7:00, 14:00 or 21:00 h, and were anesthetized at the end of the pulse and processed for histology. At each circadian time, three animals from each group were used.

Address correspondence to: Dr. Raúl Aguilar-Roblero, Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Cerebral, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-253, México D.F., C.P. 04510, México. Fax: +52-516-22-5607; e-mail: ragular@ifisio.unam.mx

Expression of c-Fos protein was detected by immunohistochemistry as follows. Animals were perfused transcardially with normal saline solution followed by 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2). Brains were removed and immersed in increasing concentrations of sucrose (10, 20 and 30%) until they sank. Frozen sections of 40 μ m were cut in the coronal plane in a cryostat and

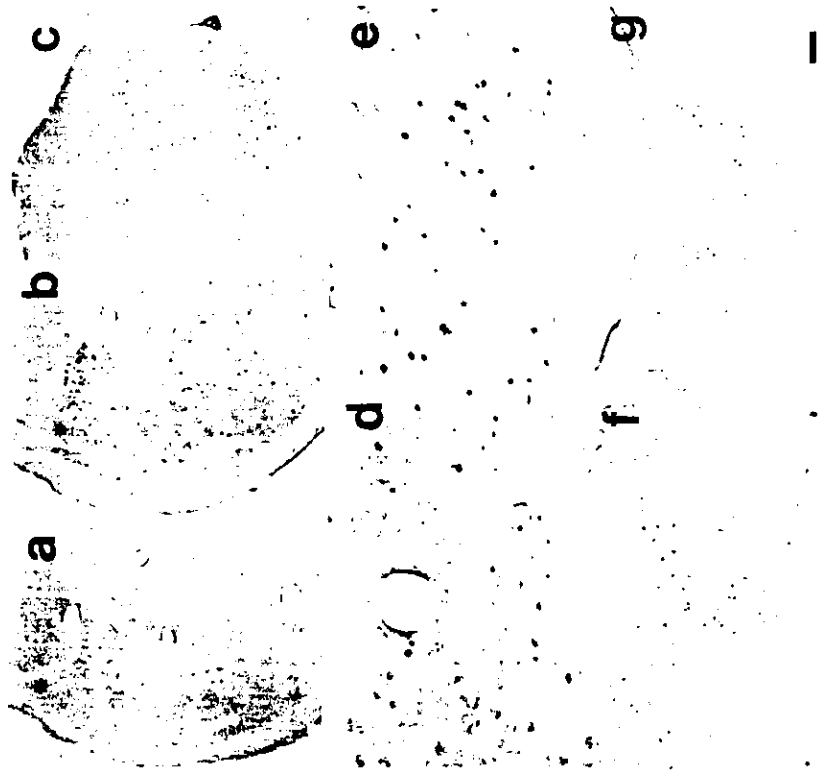


Fig. 1. c-Fos expression in control and photic stimulated rats. Light pulses induced an increase in c-Fos expression in all primary visual projection structures as can be observed for IGL and VLGN (b), and VTA (e) with respect to their controls (a and d, respectively). In contrast, the non primary visual area (PVT) showed similar c-Fos expression in both control (f) and photic stimulated (g) animals. The c-Fos expression induced by a photic stimulus in the SC is shown in (c). * indicates the location of the IGL. Calibration bar 100 μ m (50 μ m in d and e).

serially collected in four sets. One set of tissue was incubated during 72 h at 4°C in c-Fos antiserum (Santa Cruz Biotechnology, USA) diluted 1:2500. C-Fos immunoreactivity was detected by the avidin-biotin peroxidase method (Hsu et al. 1981). In order to control for the influence of the variability inherent to immunohistochemistry on the measurements, pairs of control and experimental animals were processed simultaneously. Another set of sections was stained with cresyl violet. All tissue was serially mounted, dehydrated with alcohol, cleared with xylene and coverslipped with permount.

The number of c-Fos immunoreactive cells (IRc) was manually counted with the aid of the MCID system (Imaging Research Inc., Ontario, Canada) as follows. For each pair of control and experimental tissue equivalent sections of each one of the following primary retinal projection areas was selected at the approximate anteroposterior plane (Paxinos & Watson, 1986) indicated in parentheses: SCN (-1.30 mm from bregma), ventral lateral geniculate nucleus (VLGN, -4.52 mm from bregma), intergeniculate leaflet (IGL, -4.52 mm from bregma), superior colliculus (SC, 2.28 mm from interaural) and ventral tegmental area (VTA, 2.20 mm from interaural). Additionally, the paraventricular thalamic nucleus (PVT, -1.3 mm from bregma) was studied as a control structure that does not receive primary visual information. A representative section from each subject was selected for analysis. The criterion to manually select the targets to be counted was a minimum ratio for background to immunoreactivity of 1:3 in relative optic density. Whenever overlapping of targets in the z axis was apparent, this was verified by adjusting the focus plane in the microscope, and in such cases the targets were counted individually. The effects of the light pulse and the circadian time on the number of c-Fos IRc were determined with a two way ANOVA followed by the Duncan post-hoc test. The statistical analyses were performed with the SPSS-Pc (SPSS Inc.).

RESULTS

In all structures that receive direct projections from the ganglion cells of the retina such as SCN, VLGN, IGL, SC, VTA, the application of the light pulse produced an increment in the number of c-Fos IRc with respect to the controls (Fig. 1a-e). No difference between control and experimental groups was found in the PVT, which is not innervated by the retina (Fig. 1f-g).

In the control group under DD conditions, the SCN did not show differences in the number of IRc to c-Fos as a function of circadian time. The light pulses applied at CT 06 did not result in an increment in the number of c-Fos IRc, but when applied on CT 13 and 23 a significant increase in the number of c-Fos IRc (Figs. 2 and 3a) was induced. In relation to circadian time, none of the remaining

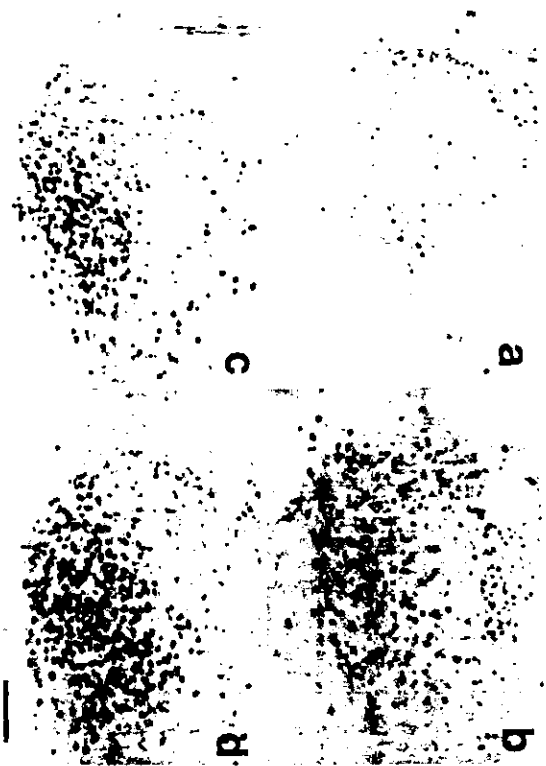


Fig. 2. c-Fos expression in the suprachiasmatic nucleus: (a) control rat, (b, c, and d) rats stimulated photically at three different circadian times. Light pulse applied at CT 06 (b) did not induce changes in c-Fos expression, but at CT 13 (c) and CT 23 (d) SCN exhibited an increment in c-Fos expression with regard to the controls. Calibration bar 100 μ m.

retino-recipient structures (VLGN, IGL, VTA and SC) exhibited fluctuations in the number of IrC in the control group, nor in their response to the light pulse (Fig. 3b–e). The non-retino-recipient structure, the PVT, did not exhibit circadian expression of c-Fos nor responded to the light pulses at any time (Fig. 3f).

DISCUSSION

The present results indicate that structures that receive direct information from the retina respond to photic stimulation with an increment in the expression of c-Fos, but only the SCN shows a circadian response.

The data are in agreement with previous studies, indicating photic-induced expression of c-Fos in the SCN, occurring mainly in the ventrolateral portion of the nucleus, to depend on the circadian phase (Schwartz et al., 1994; Rusak et al., 1990). This response seems to depend mainly on the functional characteristics of

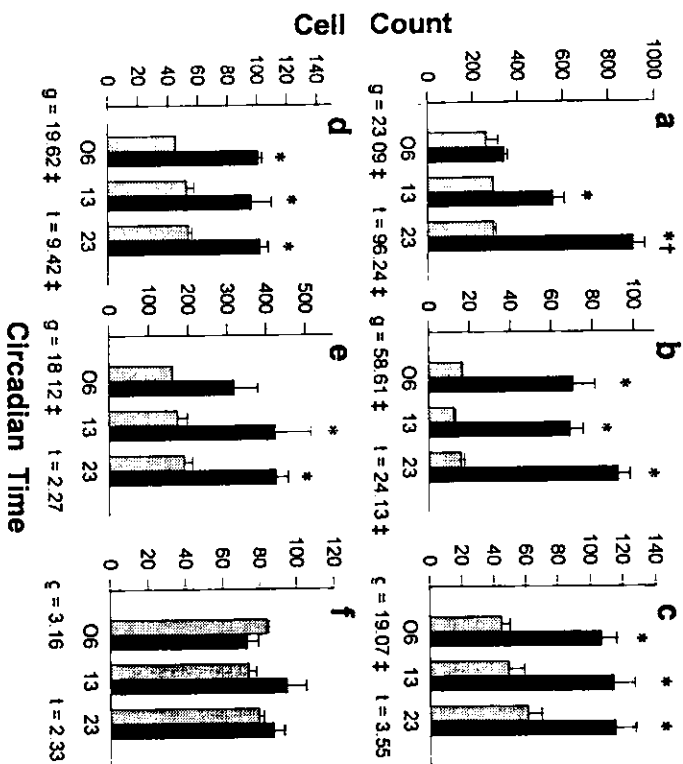


Fig. 3. Number of c-Fos positive cells (mean \pm SEM) in the SCN (a), the IGL (b), the VLGN (c), the VTA (d), the SC (e) and the PVT (f) of control (dotted bars) and photic stimulated animals (dark bars), at three different circadian times. A light pulse produced a significant increase in the number of c-Fos immunoreactive cells as a function of the circadian time only in the SCN. F values for group and time factors with (1, 16) and (2, 15) degrees of freedom, respectively, are indicated by g and f, $\dagger = p < 0.01$. Duncan post-hoc test: * significant difference ($p < 0.05$) between stimulated and control animals, \ddagger significant difference ($p < 0.05$) between the three time points in the stimulated group.

the SCN rather than on those of the retinal cells. This hypothesis is supported by the fact that c-Fos expression in the SCN persists *in vitro*, and increases after electrical stimulation of the optic nerves only during subjective night (Eames & Oschowska, 1993). The present data also confirm previous reports of the lack of circadian modulation of light-induced c-Fos expression in the IGL (Park et al., 1993). Furthermore, IGL does not present circadian variations to light pulses presented at different circadian times, in spite of the fact that collateral fibers from the retinal ganglion cells innervate both the SCN and the IGL. It remains to

be established whether circadian variations in retinal sensitivity function as a gate for photic signaling to the SCN as suggested by Terman et al. (1993).

In conclusion, the SCN is the only retino-recipient brain structure that exhibited differential c-Fos expression in relation to circadian time. This response did not depend on a gating mechanism from the retina, but rather on the functional properties of the pacemaker cells located in the SCN.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank José Luis Chávez for skilful technical assistance. This work was supported by Grants IN206697 from DGAPA and LNM024-N9607 from CONACYT.

REFERENCES

- Aronin N, Sagar SM, Sharp FR, Schwartz WJ (1990): Light regulates expression of Fos-related protein in rat suprachiasmatic nuclei. *Proc Natl Acad Sci* 87: 5959-5962.
- Colwell C, Ralph M, Menaker M (1990): Do NMDA receptors mediate the effect of light on circadian behavior? *Brain Res* 523: 117-120.
- Daan S, Pittendrigh CS (1976): A functional analysis of the circadian pacemaker in nocturnal rodents. II: The variability of the phase response curves. *J Comp Physiol* 106: 253-266.
- Eames DJ, Olschowska JA (1993): Circadian regulation of c-Fos expression in the suprachiasmatic pacemaker by light. *J Biol Rhythms* 8: S65-S71.
- Ebling F (1996): The role of glutamate in the photic regulation of the suprachiasmatic nucleus. *Prog Neurobiol* 55: 109-132.
- Hsu SM, Raine L, Fanger H (1981): Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histo Cyto* 29: 577-580.
- Klein DC, Moore RY, Reppert SM (1991): *Suprachiasmatic nucleus: The Mind's Clock*. New York, Oxford University Press, 467 pp.
- Kornhuber J, Nelson D, Takahashi J (1990): Photic and circadian regulation of c-Fos gene expression in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Neuron* 5: 127-134.
- Moore RY, Spoh JC, Card JP (1995): The retinohypothalamic tract originates from a distinct subset of retinal ganglion cells. *J Comp Neurol* 352: 351-366.
- Park HT, Baek SY, Kim BS, Kim JB, Kim JJ (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: 314-319.
- Paxinos G, Watson C (1986) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. New York: Academic Press.
- Pittendrigh CS (1993): Temporal organization: Reflections of a Darwinian clock-watcher. *Ann Rev Physiol* 55: 17-54.
- Rea M, Buckley B, Lutton LM (1993): Local administration of EAA antagonists blocks light-induced phase shifts and c-Fos expression in hamsters SCN. *Am J Physiol* 265: R1191-R1198.
- Rusak B, Robertson H, Wisden W, Hunt S (1990): Light pulses that shift rhythms induce gene expression in the suprachiasmatic nucleus. *Science* 248: 1237-1248.
- Schwartz W, Takeuchi J, Shannon W, Davis E, Aronin N (1994): Temporal regulation of light induced fos and fos-like protein expression in the ventrolateral subdivision of the rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* 58: 573-583.
- Terman JS, Reimic C, Terman M (1993): Rod outer segment disk shedding in rats with lesions of the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 605: 256-264.
- Tosini G, Menaker M (1996): Circadian rhythms in cultured mammalian retina. *Science* 272: 419-421.

INSTRUCTIONS TO CONTRIBUTORS

- 1a. Two copies of the complete text with illustrations should be submitted to the Editor-in-Chief.
- 1b. Papers should be written in English and should start with a short abstract, giving a synopsis of the paper with sufficient detailed information concerning the methods used and the results obtained.
- 1c. Papers should be typed in double spacing, on one side of the paper, quarto size, leaving top and left hand margin at least 2.5 cm (one inch) wide.
- 1d. Papers should be headed by a title, the initial(s) and name(s) of author(s) and an exact description of the post held and business address of the author(s). The author should provide Abstracting keywords which he would like to appear in print. Dates should be in the form "5. February 1994"
- 2a. *Bibliographical references* should be listed in alphabetical order at the end of the paper.
- 2b. *References to periodicals* should include the following elements: name(s) and initial(s) of author(s) in capital letters; year of publication (in parentheses); title of the paper; title of the periodical; volume number (in Arabic numerals) and part number (omit the words vol and part number; use only Arabic numerals); first and last page number. Example: Halberg F (1963): Periodicity analysis: A potential tool for biometeorology. *Int J Biometeor* 7: 167-191.
- 2c. *References to books* should include: name(s) and initial(s) of author(s) in capital letters; year of publication (in parentheses); exact title; name(s) of publisher; town of publication; page number (where pages are specifically cited); otherwise total number of pages. Example: Sollberger A (1965): *Biological Rhythm Research*. Amsterdam: Elsevier, 461 pp.
- 2d. *References in the text* should be cited in parenthesis by the name(s) of author(s) followed by the year of publication, e.g. "(Jones 1961)" except when the author's name is part of the sentence, e.g. "Jones (1961) has shown that.....". If there are more than two authors: it is in order to put "et al." after the first name (e.g. Smith et al., 1961).
3. *Tables* should be typed on a separate sheet of paper and should be numbered consecutively in Arabic numerals, e.g.: (Table 1, Table 2, etc.) and attached to the end of the text. Should a table not be an original, the exact reference should be quoted. Tables should be supplied with headings and kept as simple as possible and should be referred to in the text as "Table 2", etc.
4. *Figures* (including photographic prints, line drawings in black Indian ink on strong white or transparent paper, and maps) should be numbered consecutively in Arabic numerals (e.g. Fig. 1, etc.) and attached to the text after the tables. Graphs and diagrams should be large enough to permit reduction to a size of 10 x 10 cm (4 x 4 inches). Legends for figures should be listed consecutively on a separate sheet of paper. Photographs can be easily reproduced in offset print but should be unmounted, glossy prints, permitting reduction to a size of 10 x 10 cm without affecting legibility.
5. *Copyright* will be established in the name of Swets & Zeitlinger.
6. Submission of a paper to *Biological Rhythm Research* implies that it has not been published before and that it is not being considered for publication elsewhere.
7. Authors of accepted manuscripts are expected to submit the final version on 1) diskette. We can accept a wide variety of IBM and Macintosh compatible software packages including WordPerfect, WordStar, MS Word, PageMaker, ASCII files are also acceptable.

**PHASE RESETTING OF CIRCADIAN RHYTHMICITY TO
DOUBLE LIGHT PULSES IN THE RAT**

Ivette Caldelas , Alberto Salazar-Juárez and Raúl Aguilar-Roblero

Phase resetting of circadian rhythmicity to double light pulses in the rat

Ivette Caldelas, Alberto Salazar-Juárez and Raúl Aguilar-Roblero.
Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular.
Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 04510, MÉXICO.

Running title: Phase resetting to double light pulses in the rat

Autor for correspondence:
Raúl Aguilar-Roblero
Neurociencias, IFC/UNAM.
Apdo. Postal 70-253,
México D.F. 04510, México.

Tel.: (5 25) 622 5650
Fax: (52 5) 622 5607
Email: raguilar@ifisiol.unam.mx

Summary

In the rat there is no information regarding the time involved in resetting the circadian pacemaker. The present study was aimed to characterize in Wistar rats the direction and the magnitude of phase shifts induced by two light pulses applied in the same cycle. The direction of the shifts induced by the second pulse indicates that resetting of the circadian pacemaker in rats occur within 90 min after a first saturating light pulse. In contrast, the magnitude of the shifts depends on the interval between the two pulses. An interval shorter than 5 h allows addition of the effects, while the magnitude is mainly determined by the second pulse with intervals longer than 8 h. These indicate that dissociation between direction and magnitude of the phase shifts occurs under certain conditions. One hypothesis to these finding is that within the clock cells the mechanism involved in the resetting of the pacemaker may be dissociated from that involved in the coding of the phase to the neuronal output.

Keywords: Phase response curve, entrainment, synchronization, rhythms, phase shifts.

Introduction

Entrainment of circadian pacemakers provides organisms with a mechanism to establish and maintain adequate phase relations between circadian rhythms and environmental daily cycles (21). The light-dark cycle is the main entraining signal in species that live above ground. It is generally accepted that, under complete photoperiod, light has continuous effects on the angular velocity of the circadian clock, while brief light pulses to individuals held in constant darkness may also shift the phase of the pacemaker (23). The phase response curve (PRC) describes the relation between different circadian times and the magnitude and direction of phase shifts elicited by brief light pulses (22). In all species studied, the PRC to light is characterized by three critical regions: phase delays during early subjective night, phase advances during late subjective night, and no phase changes during subjective day (23).

In mammals, a circadian pacemaker has been located in the suprachiasmatic nuclei (SCN), which receive direct retinal inputs originated from a subset of ganglion neurons encoding environmental luminance (18). This knowledge has fostered recent advances in understanding cellular and molecular mechanisms involved in the generation of circadian rhythmicity (30). The

use of the PRC to light has specially contributed to elucidate some aspects of the latter process (11). In order to fully understand the cellular and molecular details of entrainment, it has become a relevant issue to establish how long it takes to reset the pacemaker-phase after a light pulse and how does the switch between delays and advances occur.

In order to approach the first issue, the double light-pulse PRC developed by Pittendrigh (22) has proven to be a useful paradigm. Previous studies in hamsters and mice have shown that brief light pulses shift the phase of the circadian rhythm within the next two hours (28, 5), and the second pulse is able to induce expression of *c-fos* and phospho-CREB in the SCN within the

same interval (5). As for the mechanism involved in phase delays and advances, the only available approach has been to study the circadian pacemaker, both *in vivo* and *in vitro*, at different regions of the PRC (8, 11, 13).

In contrast to other rodent species, little is known regarding the characteristics of the rat's PRC or the time involved in resetting the phase of the pacemaker. Although rats' onset of activity is not as clear cut as hamster and mouse, it is important to have information from rats since they are widely used as an animal model in neuroscience. Furthermore, previous studies in rodents with a double pulse protocol have only studied the effect of pulses inducing phase shifts with the same direction, and they have used only the magnitude but not the direction of the phase shifts in order to assess the efficacy of the priming pulse. We suggest that using the direction of the shift induced by a test pulse presented in the same cycle after a previous priming pulse, might provide a convenient procedure, both easy and unambiguous, to study the mechanisms involved in entrainment to light pulses. Therefore the present study was aimed to 1) construct a detailed PRC to saturating light pulses, 2) determine the effect of two light pulses on the direction of phase shifts, 3) estimate the lapse necessary to shift the pacemaker, and 4) determine the effect of two light pulses on the magnitude of the phase shifts, in albino rats.

Materials and Methods

General Procedures.

Male Wistar rats weighing between 200 to 300 g were used. Animals were individually housed in translucent acrylic cages (40 x 25 x 20 cm) placed in a room with regulated temperature (19-21°C) and continuous red light (50 lux). Food and water were available *ad libitum*. Drinking behavior was continuously recorded with an automated system as previously described (1). The

display of the actograms and data analysis were made with the Digital Analysis System Applied to Chronobiology (DISPAC) developed and validated in our laboratory. Linear statistical analyses (ANOVA, Tukey's and Bonferroni's multiple comparison test) were made with the StatView (Abacus Concepts Inc.).

The rhythm baseline was obtained from at least 15 days and the circadian time (CT) 12 was estimated by means of a line fitted to the onset of activity of the last 10 days of recording. The lines were eye-fitted to the data by three independent observers (two of them blind to the time the light was applied) according to operational criteria previously established (see next section). In most cases the three observers showed only minor differences on scoring CT12. On the remaining cases, only two of the observers coincide. In the latter case the differences were discussed and the actogram reanalyzed until reaching a consensus. At the initial stage of this study it became clear that when the activity onset was too variable the animal should be discarded, because the three observers would systematically disagree. The animals were scheduled to receive the next day one light pulse at different circadian times. Animals were exposed to light by placing their cages in a light-tight chamber provided with a fluorescent light tube on the top providing 400 lux at the bottom of the animal's cage. After exposure to light, the animals were returned to recording for at least 20 days. To determine the phase shift, the new CT12 was established as previously described, with the exception that we estimate the activity onset from the last day of recording towards the day of light stimulation. Only the first 10 days with a stable activity onset after the shifts induced by the light pulse were used for further analysis. The direction and magnitude of the shift (if any) was estimated by comparison of the original and the new CT12 projected to the day of the light stimulation. The number of transitory cycles was also estimated from the day the light stimulus to the first day of steady state shift. All

experiments reported in this study used the general procedure just described, the only difference among them was the specific duration, timing or number of pulses.

Criteria to detect activity onset for drinking circadian rhythm in rats.

The architecture of behavioral circadian rhythms in rats presents some characteristics that deserve some attention before proceeding any further. In contrast with mice and hamsters, other rodent species widely used in studies on circadian rhythms, in rats the activity onset is not as clear cut, mainly because the presence of sparse bouts of activity during the resting part of the cycle (ρ). This activity may be found either as apparently random bouts of variable amplitude and short duration throughout ρ , and/or as a well-defined periodic component of activity immediately preceding the onset of the main active part of the cycle (α). This preceding component lasts up to one hour and is followed by an interval of inactivity of at least the same duration as the activity bout. The period of this component is usually shorter, but in some cases may be equal or slightly longer, than the period of α . Alpha onset is considered to occur when bouts of high amplitude comprise at least 80% of the next 4 h, and show a clear phase relation with the previous and following cycles. When the animal shows a bimodal pattern, the first burst of activity is followed by a lapse of up to 3 hours of decreasing intensity, which may even lead to inactivity, then followed by a further increase in activity which lasts for at least 2 hours and then disappears. In other animals, activity remains constant for up to 8 h and then gradually decreases until the bout of activity is followed by a longer bout of inactivity and then occurs sparse and random as previously described. In order to use the onset of activity as a reliable phase marker of the rat's drinking circadian rhythm, we used the previous description as operational criteria to identify and disregard the random and the periodic components of activity preceding α .

Experiment I: Phase response curve to light.

In order to establish the optimal duration of the light pulses one group of eight animals was exposed to light pulses of 15 and 60 min at CT 6, 13 and 18. The animals were exposed to different pulse durations and CTs in a counterbalanced design. An additional group of 48 animals were used to construct the detailed phase response curve. Each animal contributed with 4 points at different CTs randomly assigned. Since the response to 15-min pulses was more variable, each animal received 60-min light pulses in a counter balanced design. At the end of the experiment each circadian time has eight data points from different animals (Fig. 1 top).

INSERT FIGURE 1 ABOUT HERE

Experiment II: Effects of two light pulses on the direction of the phase shifts.

In this experiment, the PRC previously obtained was used to predict direction of the shift induced by "test" pulse after a previous "priming" light pulse was presented. We tested the hypothesis that if the priming pulse was able to reset the pacemaker in a few hours, then the direction of the phase shift induced by the test pulse would be reversed with respect to that of animals receiving only the test pulse.

In a first group (II-a), eight animals received a phase delaying pulse at CT12 and the test pulse was applied at CT17, the latter being a transition point where the shift would reverse from advances to delays if the priming pulse has already delayed the pacemaker. In a second group (II-b), eight animals were transferred to the light pulse chamber at CT12 and remained there for one hour without turning the light on, and then received a light pulse only at CT17. In this group we tested whether the sole manipulation of the animals, at the time the priming pulse was applied, was able to reverse the direction of the shift induced by the test pulse. In a third group (II-c), eight animals received a phase advancing pulse at CT23 and the test pulse at CT16. In this

group, if the priming pulse has already advanced the pacemaker then the test pulse would induce a phase advance instead of a phase delay (Fig. 1 center top).

Experiment III: Determination of the minimal lapse to shift the pacemaker

The time involved in resetting of the pacemaker by a light pulse was estimated by testing the effect of different intervals between the priming and the test pulse in the direction of the shift induced by the test pulse. In a counter balanced design, 8 animals received a priming 60 min light pulse (400 lux intensity) at either CT15 (III-a; two hours interval between the onset of both light pulses) or CT15.5 (III-b; one and a half hours between the onset of the two pulses). The test pulse was always administered at CT17 (Fig. 1 center bottom).

Experiment IV. Effect of two light pulses on the magnitude of the phase shifts.

Changes in the direction of the shifts observed in the previous experiment supported the hypothesis that the rat circadian pacemaker has a rapid resetting. In this experiment, the magnitude of the shift in the overt rhythmicity was used to further characterize the responses to two light pulses, when each of them induces shifts with similar or different direction.

Experimental design was as follows (see Fig. 1 bottom): In the first group (IV-a), eight animals received two light pulses to produce phase shifts with the same direction, both within the delay region of the PRC. The priming pulse was applied CT12 and the test pulse at CT16. In the second group (IV-b), eight animals received two light pulses to produce phase shifts with opposite directions, the priming pulse was applied at CT12 to induce a delay and the test pulse at CT22 to induce an advance. In the third group (IV-c), eight animals received two light pulses to produce phase shifts with opposite direction, but unlike the previous group (IV-b) the priming pulse was applied at CT23 to produce an advance while the test pulse was applied at CT8 to produce a delay.

INSERT FIGURE 2 ABOUT HERE

Results

Experiment I: Phase response curve to light.

The phase shifts induced by 15 min light pulses were 1.1 ± 6.7 min (mean \pm s.e.m.) at CT6, -39.5 ± 15 min at CT13 and 32.5 ± 18 min at CT18, while those induced by 60 min pulses were 12.9 ± 7.5 min, -96 ± 8.9 min and 84.2 ± 6.3 min at the respective circadian times. Since pulses of 15 min induced phase shifts of smaller amplitude and higher variability than those of 60 min, the rest of the experiments were conducted with light pulses of this latter duration.

INSERT FIGURE 3 ABOUT HERE

Figure 2 shows three examples from animals that received light pulses at CT6, CT12 and CT23. The detailed phase response curve for Wistar rats is shown in Figure 3. This curve presents a region with very small advances (< 30 min) from CT1 to CT7, which apparently correspond to the dead zone. The transition point to the delays region is found at CT8 with a shift of approximately -60 min, followed by a region of larger delays of -90 to -120 min from CT9 to CT16. At CT17 there is an abrupt transition from delays to advances; the region of advances extends from CT18 until CT0, the magnitude of the advances ranges from 90 to 120 min. The mean number \pm s.e.m. of transient cycles found at CT6, CT12 and CT23 and the post-hoc contrast among them are shown in Table 1.

INSERT FIGURE 4 AND TABLE 1 ABOUT HERE

Experiment II: Effects of two light pulses on the direction of the phase shift.

Animals from the group II-a, which received the priming pulse in the phase delaying zone (CT12) and the test pulse at CT17 just after the transition point, showed phase delays (-206 ± 18 min) instead of the advances normally found with a single pulse at CT17 (88 ± 9 min). Some examples of the recordings from this experiment are shown in figure 4. The magnitude of the shifts from animals of group II-a were significantly larger ($F_{(6, 49)} = 141.233$, $p < 0.0001$, Bonferroni, $p < 0.01$) than those induced by single light pulses at either CT12 (-156 ± 7 min) or CT15 (-95 ± 9 min), this later phase is the one expected if the priming pulse has already shift the phase of the pacemaker (Fig. 5A) Animals from the group II-b, which were manipulated at CT12 and only received light pulses at CT17 showed phase advances of similar magnitude (71 ± 7 min) to those obtained only with light pulses applied at CT17.

INSERT FIGURE 5 ABOUT HERE

Animals from group II-c, which received the priming pulse at CT23 and the test pulse at CT16, just before the transition point, presented phase advances (94 ± 12 min) instead of the expected delays which normally occur at this time (CT16, -91 ± 8 min). In contrast to group II-a, in this group the magnitude of the shifts were similar to those obtained with single light pulses at CT17 (see above), which is the phase expected if the priming pulse had already shifted the pacemaker by the time the test pulse was applied (Fig. 5B).

The mean number \pm s.e.m. of transient cycles for the three groups of this experiment and the post-hoc comparison among them are shown in Table 1. It is worth noticing that when analyzed in a completely random design involving all four experiments, the number of transient cycles found after two light pulses were significantly larger ($F_{(10,80)} = 20.74$, tukey test $p < 0.05$) than those found after the corresponding shift (either delay or advance) induced by a single light

pulse. In contrast, no significant differences were found between group IIb -which received only one light pulse at CT17- and the one from experiment I corresponding to the advances induced by a single light pulse.

INSERT FIGURE 6 ABOUT HERE.

Experiment III: Determination of the minimal lapse to shift the pacemaker

Changes in the direction of the phase shift induced by a "test" light pulse applied at CT17 were observed after the priming pulse was applied either at CT15 or CT 15.5 (Fig. 6). In the first case the delays were of 210 ± 40 min (Fig. 7A) while in the second case they were of 219 ± 17 min (Fig. 7B). The amplitude of these phase delays was significantly different to that induced by a single pulse applied between CT14 and CT16, but not different from the amplitude obtained in the group II-a from the previous experiment.

The mean number \pm s.e.m. of transients from the groups in this experiment are shown in Table 1. No significant differences were found between these groups with respect to the group corresponding to phase delays induced by a single light pulse (CT12, experiment I). In contrast, this parameter was significantly shorter in animals from these groups in comparison to that found in animals from group IIa, which also received a priming pulse in the delay zone and the test pulse at CT17.

INSERT FIGURE 7 ABOUT HERE

Experiment IV: Effect of two light pulses on the magnitude of the phase shifts.

All animals that received two light pulses at the phase delaying zone of the PRC (CT12 and 16; group IVa) exhibited phase delays of larger magnitude (-246 ± 17 min) than those

induced with single light pulses at CT12 or CT16 ($F_{(8,61)} = 35.31, p < 0.0001$; Bonferroni, $p < 0.01$; Fig. 9A). Typical recordings from this experiment are shown in figure 8. Six of the eight animals from group IV-b, which received the priming pulse in the phase delaying zone (CT12) and the test pulse in the phase advancing zone (CT22), exhibited phase advances with a slightly smaller magnitude than those induced by single light pulses at CT22 (110 ± 8 min). The other two animals exhibited phase delays of 30 and 60 min respectively. The mean value from the complete sample was of 64 ± 30 min, which is not significantly different from the phase advances induced by single pulses applied only at CT22 (Fig. 9A). Animals from group IV-c, which received the priming (advancing) pulse at CT23 and the test (delaying) pulse at CT08, displayed phase delays slightly larger (-88 ± 44 min) than those obtained with single light pulses at CT08 (-56 ± 5 min). Only one subject from this group showed an unusually large phase advance of 180 min (Fig. 9B).

The mean number \pm s.e.m. of transients from the groups in this experiment and the post-hoc comparison among them are shown in Table 1. All three groups showed significant differences when compared to the groups from experiment I exhibiting shifts of similar direction after a single light pulse.

INSERT FIGURES 8 and 9 ABOUT HERE.

Discussion.

In contrast to the PRC of hooded rats (4) in albino rats the dispersion in the magnitude of the shifts induced with 15 min pulses is higher than that found with 60-min pulses. This may be due to a higher light-induced damage of the retina in albino rats with respect to pigmented ones (20). Wistar rats show a PRC characterized by a dead zone from CT2 to CT7 (subjective day), a

delay zone from CT8 to CT16 (late subjective day and early subjective night) and an advance zone from CT17 to CT1 (mostly during the last two thirds of the subjective night). Dann and Pittendrigh (7) have previously analyzed the theoretical and biological implications of the shape of the PRC in rodents. In Wistar rats, it is worth noticing that the magnitude of the advances is larger, the duration of the delay and advance zones are symmetric, and the transition from delays to advances occurred abruptly, with respect to the PRC from other rodent species (4, 6, 7, 10, 27). These differences may be at least partly due to the use of saturating light pulses of 400 lux for 60 minutes. The number of transient cycles is consistent with that previously reported in rodents (4, 6, 7).

In order to use the direction of the phase shift as parameter to test the time involved in pacemaker resetting, the light pulse parameters and the CTs at which the priming and the test pulse were to be administered were carefully selected. To avoid variation in the magnitude of the phase shift, due to individual differences in the sensitivity of the entrainment pathway we used saturating light pulses to produce maximal shifts (19). Furthermore, we selected CT 12 and CT 22 as the optimal phases to present the first (priming) pulse. since the maximal phase delays and advances were respectively induced at these CTs. The abrupt transition from delays to advances occurring between CT16 and CT17, allowed us to use these time points as the optimal phases to apply the test pulse, to determine by the direction of the shift whether resetting of the pacemaker by the priming pulse had occurred before the time of the test pulse. Additionally, in one group the test pulse was presented also at CT8, which corresponds to the earliest phase on which, delays occur.

After a priming pulse at CT12, the test pulse at CT17 (group II-a) induced phase delays instead of the advances usually found at this latter phase. Moreover, the magnitude of the phase delays induced by the two pulses was larger than those induced with single light pulses applied

at any time in the delay zone. These findings clearly indicate that the priming light pulse had already shifted the phase of the pacemaker before the test pulse was applied, so that this latter impinged upon the pacemaker at the new predicted phase (CT15 instead of CT17), adding its shifting effect to that of the first pulse. The effect on the magnitude of the shifts found in this group is similar to those previously reported for mice and hamsters receiving two delaying light pulses (5, 28). The sole manipulation of the animals involved in the procedure had no effect on the phase of the rhythm, since all animals from group II-b showed phase advances similar to those found after single light pulses applied at CT17. After a priming pulse at CT23, in animals from group II-c, the test pulse at CT16 induced phase advances instead of the expected delays. This finding confirms the hypothesis that the priming light pulse shifted the phase of the pacemaker before the test pulse was applied. The effect of the pulses on the magnitude of the shifts and the number of transients were more difficult to interpret than its direction, and will be discussed later.

Since the direction of the shift induced by a test pulse indicates unambiguously whether a priming pulse has affected the phase of the circadian pacemaker, we used this paradigm in the experiment III to establish the lapse involved in resetting the phase of the pacemaker. In this experiment an interval as short as 90 minutes between the onset of two light pulses was enough to reverse (from advances to delays) the shift induced by a test pulse applied at original CT17 (actually CT15). Furthermore, the magnitude of such delay corresponded to that induced by two delaying pulses applied in the same cycle. This indicates that, with the parameters used (60 min, 400 lux) no more than 90 minutes between the onset of two light pulses are necessary to delay the phase of the pacemaker. The duration of the light pulses used in this study prevented us to test shorter intervals between the two stimuli. These results are consistent with previous studies

indicating that the circadian pacemaker in hamsters and mice is shifted after 2 hours of an adequate light stimulus (5, 28).

The direction of the shifts found in animals from group II-c showed that they received both light pulses in the advance zone of the PRC. In contrast, the magnitude of the phase shifts found were not different from the advances induced by single light pulses at CT17, which suggest that after shifting the pacemaker the first pulse altered (at least temporarily) the shape of the PRC to light, thus the response to the test pulse is atypical for a pulse at that predicted phase. We decided to further address this issue in the experiment IV. The magnitude of the delays shown by animals from group IV-a, which received delaying pulses at CT12 and CT16, confirmed the hypothesis that the shift induced by the test pulse added to the shift induced by the priming pulse, as in the case of animals from group II-a. In contrast, the magnitude of the shifts shown by animals from groups IVb and IVc were consistent with the hypothesis that the priming pulse has altered the shape of the PRC. similar to the findings in animals from the group II-c. Best et al (5) have previously shown in hamsters that the effects of two light pulses (2 hours apart) in the advance zone of the PRC are additive. Altogether, these observations suggest that the absence of additive effects in animals from groups IIc, IVb and IVc may depend on the interval between the priming and the test pulse. Moreover, in all groups where the shift of the two pulses added to each other, the interval between pulses was smaller than 5 hours. While in those groups where the shift of the test pulse was atypical after the shift induced by the priming pulse, the interval between both pulses ranged from 9 to 17 hours. These findings suggest independent time constants for the resetting of the pacemaker and transmission of the new phase to the efferent pathway within the pacemaker itself. One possible hypothesis to explain the previous finding is that within the clock cells, the molecular mechanism involved in the

pacemaker resetting may be dissociated up to some point from that involved in the coding of the phase to the neuronal output.

Finally, the difference in the number of transient cycles between animals receiving two light pulses with long and short intervals, is consistent with the hypothesis that the events related to the phase resetting of the pacemaker might have independent time constant from those involved in the transmission of the phase to the effectors. With the exception of animals from experiment III, with an interval of less than 2 h between the first and the second light pulse, all the rest of the animals receiving two light pulses showed a significant increase in the number of transient cycles. Furthermore, animals from group IIb showed only a slight but non significant increase in the number of transients with respect to those animals from experiment I. Since this animals were handled as those receiving two light pulses but were stimulated by light only once, we may rule out that the differences in the number of transients may be due to the handling involved in the double pulse procedure.

In conclusion, the present study indicates that: 1) resetting of the circadian pacemaker in rats occurs within 90 min after a saturating light pulse has been presented; 2) the magnitude of the shifts induced by two light pulses depends on the interval between the pulses, so that an interval shorter than 5 h allows addition of the effects, while when intervals are larger than 8 h the shifts induced by test pulses are atypical for such particular phases; 3) dissociation between the direction and the magnitude of the phase shifts occurs in the double light pulse protocol when the test pulse is applied at the transition phase of the PRC and at certain intervals with respect to the priming pulse; and 4) the study of the direction and magnitude of the shifts in this protocol is an useful tool to study different aspects of the molecular mechanisms underlying entrainment of circadian rhythms to light.

Perspectives

Entrainment of circadian rhythms to light pulses involves glutamate release from the terminals of the retinohypothalamic tract (25, 32). Activation of NMDA-receptors in SCN neurons induces Ca^{++} influx into the cytoplasm, and in turn induces apparently independent signaling processes. One process involves phosphorylation of CREB (12, 26), which induces expression of immediate-early genes (IEG) such as *c-fos* and *jun-b* (3, 9, 15, 16) and its polymerized product DNA-binding protein AP-1 (31). The functional relevance of this signaling pathway in the shifting of the pacemaker remains unclear (14, 34). A second process involves Ca^{++} influx into the cytoplasm, which during late subjective night increase nitric oxide synthesis, inducing cGMP and activation of PKG and eventually behavioral phase advances (17, 24, 33). During early subjective night phase delays involve mobilization of Ca^{++} from intracellular storage through Ryanodine sensitive intracellular Ca^{++} channels (RyR, 8). Finally, light pulses also induce transcription of *mper₁* throughout all subjective night (2, 29, 35) and of *mper₂* only during early subjective night (2, 35), although the functional relevance of these later molecular events has not been addressed so far.

Our current knowledge on the cellular and molecular events related to the resetting of the SCN indicates that after a series of common events after a light pulse, dissociation into parallel intracellular signalling processes actually occurs. It remains to be established whether these different signaling pathways triggered after a light pulse could be differentially related to the processing of pacemaker resetting and encoding of the pacemaker phase into a neural output.

Acknowledgements:

We thank Dra. Carolina Escobar for her valuable comments on the manuscript, and Jose Luis Chavez for skillful technical assistance. This work was supported by grant IN206697 from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (UNAM) and L0024-N9607 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

References

1. Aguilar-Roblero, R. and A. Vega-González. Splitting of locomotor circadian rhythmicity in hamsters is facilitated by pinealectomy. *Brain Res.* 605: 229-236, 1993.
2. Albrecht, U., Z. Sun, G. Eichele, and C. Lee. A differential response of two putative mammalian circadian regulators, *mper1* and *mper2*, to light. *Cell* 91: 1055-1064, 1997.
3. Aronin, N., S.M. Sagar, F.R. Sharp, and W.J. Schwartz. Light regulates expression of a Fos-related protein in rat suprachiasmatic nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 87: 5959-62, 1990.
4. Bauer, M.S. Irradiance responsivity and unequivocal type-1 phase responsivity of rat circadian activity rhythms. *Am. J. Physiol.* 263: R1110-4, 1992.
5. Best, J.D., E.S. Maywood, K.L. Smith, and M.H. Hastings. Rapid resetting of the mammalian circadian clock. *J. Neurosci.* 19: 828-35, 1999.
6. DeCoursey, P. Function of a light response rhythm in hamsters. *J. Cell Comp. Physiol.* 63: 189-196, 1964.
7. Daan, S. and C.S. Pittendrigh. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. II The variability of phase response curves. *J. Comp. Physiol.* 106: 253-266, 1976.
8. Ding, J., G. Buchanan, S. Tischkau, D. Chen, L. Kuriashkina, L. Faiman, J. Alster, P. McPherson, K. Campbell, and M. Gillette. A neural ryanodine receptor mediates light-induced phase delays of the circadian clock. *Nature* 394: 381-384, 1998.
9. Ebling, F., E. Maywood, K. Staley, T. Humby, D. Hancock, C. Waters, G. Evan and M.H. Hastings. The role of N-methyl-D-aspartate-type glutamatergic neurotransmission in the photic induction of immediate early genes expression in the suprachiasmatic nuclei of the Siberian hamster. *J. Neuroendocrinol.* 3: 641-652, 1991.

10. Elliot, J. Circadian rhythms, entrainment and photoperiodism in the Syrian hamsters. In :
Biological clocks in reproductive seasonal cycles. Bristol, UK:Wright Follet, B.K. and D.E.
Follet (Eds), 1981. Pp 203-217,.
11. Gillette, M.U. Cellular and biochemical mechanisms underlying circadian rhythms in
vertebrates. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7: 797-804, 1997.
12. Ginty, D., J. Kornhauser, M. Thompson , H. Bading, K. Mayo, J. Takahashi, and M.
Greenberg. Regulation of CREB phosphorylation in the suprachiasmatic nucleus by light and
a circadian clock. *Science* 260: 238-241, 1993.
13. Golombek, D.A., and M.R. Ralph. Let there be light: signal transduction in a mammalian
circadian system. *Braz. J. Biol. Res.* 29:131-140, 1995.
14. Honrado, G. I., R.S. Johnson, D.A. Golombek, M. Spiegelman, V.E. Papaioannou, and M.
Ralph. The circadian system of c-fos deficient mice. *J. Comp. Physiol. A.* 178: 563-570,
1996.
15. Kornhauser, J.M., D.E. Nelson, K.E. Mayo, and J.S. Takahashi. Photic and circadian
regulation of c-fos gene expression in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Neuron* 5: 127-
34. 1990.
16. Kornhauser, J.M., D.E. Nelson, K.E. Mayo, J.S. Takahashi. Regulation of jun-B messenger
RNA and AP-1 activity by light and a circadian clock. *Science* 255: 1581-4, 1992.
17. Mathur, A., D.A. Golombek, and M.R. Ralph. cGMP-dependent protein kinase inhibitors
block light-induced phase advances of circadian rhythms in vivo. *Am. J. Physiol.* 270:
R1031-6, 1996.
18. Moore, R., J.C. Speh and J.P. Card. The retinohypothalamic tract originates from a distinct
subset of retinal ganglion cells. *J. Comp. Neurol.* 352: 351-66, 1995.

19. Nelson D.E., and J.S. Takahashi. Sensitivity and integration in a visual pathway for circadian entrainment in the hamster (*Mesocricetus auratus*). *J. Physiol. (Lond)*; 439:115-45, 1991.
20. O'Steen, W.K., and J.E. Donnelly. Chronology analysis of variations in retinal damage in two strains of rats after short-term illumination. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 22: 252-255, 1982.
21. Pittendrigh, C.S. Circadian Rhythms and the Circadian Organization of Living Systems. XXV Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol. 159-184, 1960.
22. Pittendrigh, C.S. Circadian systems I: The driving oscillation and its assay in *Drosophila pseudoobscura*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 58: 1762-1767, 1967.
23. Pittendrigh, C.S. Circadian systems: General perspective. In: Handbook of behavioral neurobiology, Vol. 4. New York, Aschoff, J. (Ed) Plenum Press, 1981. pp 57-80.
24. Prosser, R., and M. Gillette. The mammalian circadian clock in the suprachiasmatic nuclei is reset in vitro by cAMP. *J. Neurosci.* 9: 1073-1081, 1989.
25. Rea, M., B. Buckely, and L. Lutton. Local administration of EA antagonists block light-induced phase shifts and c-fos expression in hamster SCN. *Am. J. Physiol.* 265: R1191-R1198, 1993.
26. Schurov, I.L., S. McNulty, J.D. Best, P.J. Sloper, M.H. Hastings. Glutamate-induced induction of CREB phosphorylation and Fos expression in primary cultures of the suprachiasmatic hypothalamus in vitro is mediated by co-ordinate activity of NMDA and non-NMDA receptors. *J. Neuroendocrinol.* 11: 43-51, 1999.
27. Schwartz, W.J., and P. Zimmerman. Circadian timekeeping in BALB/c and C57BL/6 inbred mouse strains. *J. Neurosci.* 10: 3685-94, 1990.
28. Sharma, V.K., and M.K. Chandrashekaran. Rapid phase resetting of a mammalian circadian rhythm by brief light pulses. *Chronobiol. Int.* 14: 537-48, 1997.

29. Shigeyoshi, Y., K. Taguchi, S. Yamamoto, S. Takekida, L. Yan, H. Tei, T. Moriya, S. Shibata, J. Loros, J. Dunlap, and H. Okamura. Light induced resetting of a mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the *mper1* transcript. *Cell* 91: 1043-1053, 1997.
30. Takahashi, J.S. Biological rhythms: from gene expression to behavior. In: *Light and biological rhythms in man*. Oxford, Wetterberg, B. (Ed.) Pergamon Press, 1993. Pp:3-20.
31. Takeuchi, J., W. Shanon, N. Aronin, and W.J. Schwartz. Compositional changes of AP-1 DNA binding proteins are regulated by light in a mammalian circadian clock. *Neuron* 11: 825-836, 1993.
32. Vindlacheruvu, R.R., F.J.P. Ebling, E.S. Maywood, M.H. Hastings. Blockade of glutamatergic neurotransmission in the suprachiasmatic nucleus prevents cellular and behavioural responses of the circadian system to light. *Eu. J. Neurosci.* 4: 673-679, 1992.
33. Weber, E.T., R.L. Gannon, and M.A. Rea. cGMP-dependent protein kinase inhibitor blocks light-induced phase advances of circadian rhythms in vivo. *Neurosci. Lett.* 197: 227-30, 1995.
34. Wollnik, F., W. Brysch, E. Uhlman, F. Gillardon, R. Bravo, M. Zimmermann, K. H. Schingensiepen, and Herdegen. Block of c-Fos and Jun-B expression by antisense oligonucleotides inhibits light induced phase shifts of the mammalian circadian clock. *Eur. J. Neurosci.* 7: 388-393, 1995.
35. Zylka, M.J., L.P. Shearman, D.R. Weaver, and S.M. Reppert. Three period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron* 20: 1103-10, 1998.

Figure Legends.

Figure 1. Summary of the design for the experiments conducted in this work. Horizontal bar indicates a circadian cycle, the subjective day and night are indicated. Open arrows in experiment one represent the time at which light pulses (1h, 400 lux) were applied. CT12 correspond to the time of activity onset. In the remaining experiments, the circadian cycle is divided according to the zones found in the PRC. The triangles indicate the time at which light pulses were applied: open triangle = first (priming) pulse; filled triangle = second (test) pulse; the dashed triangle = sham pulse in experiment IIb.

Figure 2. Representative examples of actograms of drinking behavior from animals which received light pulses at three different CT's. CT12 before and after the pulse are indicated by eye fitted lines. Day 0 correspond to the day the light pulse was applied. Open triangles indicate the time at which the light was applied in each case.

Figure 3. Phase response curve for Wistar rats. Light pulses were of 60 min and 400 lux. 48 animals were used to construct the detailed phase response curve. Each circadian time has eight data points from different animals. Each animal contributed with 4 points at different CTs randomly assigned.

Figure 4. Representative examples of actograms of drinking behavior from animals of experiment II. CT12 before and after the pulses are indicated. Day 0 correspond to the day the pulses were applied. In each case, upward triangles indicate the time at which the priming pulse was applied, downward triangles indicate the time of exposure to the test pulses. The gray triangle indicates the time of the sham pulse (when the light was not turned on in the exposure chamber).

Figure 5. Individual phase responses (filled circles) from animals of experiment II. A, group IIa which received the priming pulse at CT12 and the test pulse at CT17. B, group IIc which received the priming pulse at CT23 and the test pulse at CT16. The PRC predicted for the priming pulse (open triangle) s indicated by the solid line. The PRC predicted for the test pulse (filled triangle) if the priming pulse has already shifted the pacemaker, is indicated by the dashed line.

Figure 6. Representative examples of actograms of drinking behavior from animals of experiment III. CT12 before and after the pulses are indicated. Day 0 correspond to the day the pulses were applied. In each case, upward triangles indicate the time at which the priming pulse was applied, downward triangles indicate the time of exposure to the test pulses.

Figure 7. Individual phase responses (filled circles) from animals of experiment III. A, group IIIa which received the priming pulse at CT15 and the test pulse at CT17. B, group IIIb which received the priming pulse at CT15.5 and the test pulse at CT17. See figure 5 for other details.

Figure 8. Representative examples of actograms of drinking behavior from animals of experiment IV. CT12 before and after the pulses are indicated. Day 0 correspond to the day the pulses were applied. In each case, upward triangles indicate the time at which the priming pulse was applied, downward triangles indicate the time of exposure to the test pulses.

Figure 9. Individual phase responses (filled circles) from animals of experiment IV. A, groups IVa and IVb which received the priming pulse at CT12 and the test pulse at CT16 and CT 22, respectively. B, group IVc (B) which received the priming pulse at CT23 and the test pulse at CT8. See figure 5 for other details.

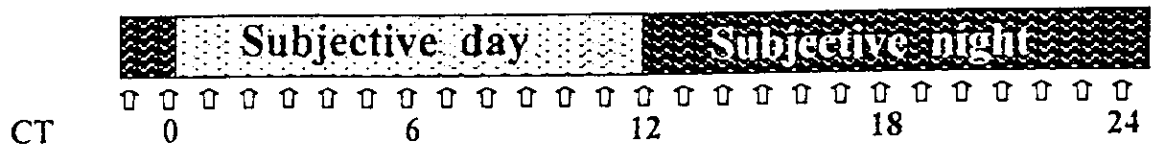
Table 1. Number of transitory days (mean \pm SEM) to achieve steady state phase shifts after one or two light pulses applied at the indicated circadian times (CT).

Experiment I			Experiment II			Experiment III			Experiment IV		
CT	mean	SEM	CT	mean	SEM	CT	mean	SEM	CT	mean	SEM
6	0.37	± 0.2	12+17	6.86	± 0.63	15+17	3.63	± 0.45	12+16	6.86	± 1.03
12	1.38	± 0.2	-+17	4.57	± 1.04	15.5+17	2.63	± 0.53	12+23	†10.14	± 0.67
23	‡3.00	± 0.8	23+16	†9.00	± 1.05	-	-	-	23+8	7.43	± 1.52
$F_{(2,21)}=$	8.73			5.69			2.38			5.01	
p=	0.001			0.012			ns			0.018	

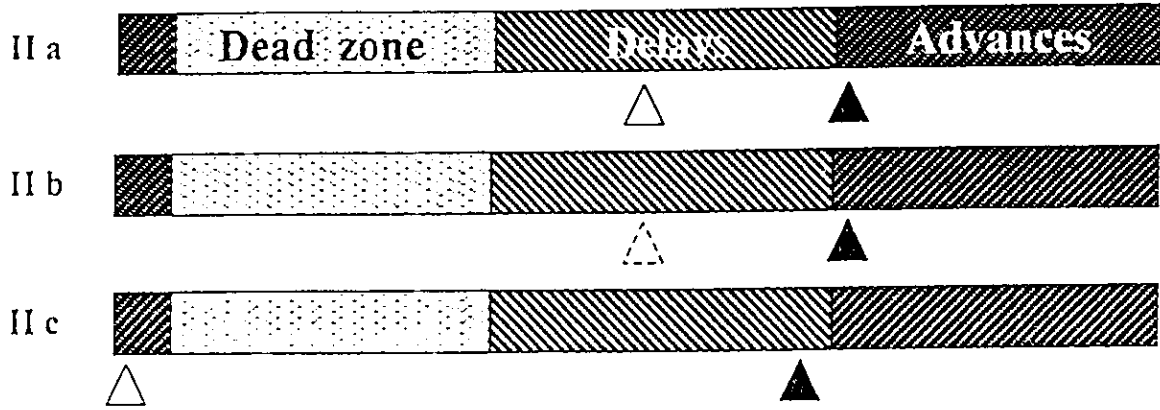
† Different with respect to the group of lowest value, $p < 0.05$, Tukey test.

‡ Different with respect to the other two groups. $p < 0.05$, Tukey test.

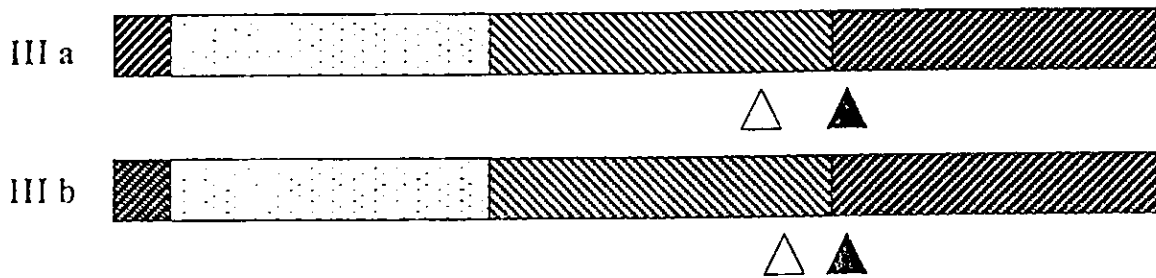
Experiment I



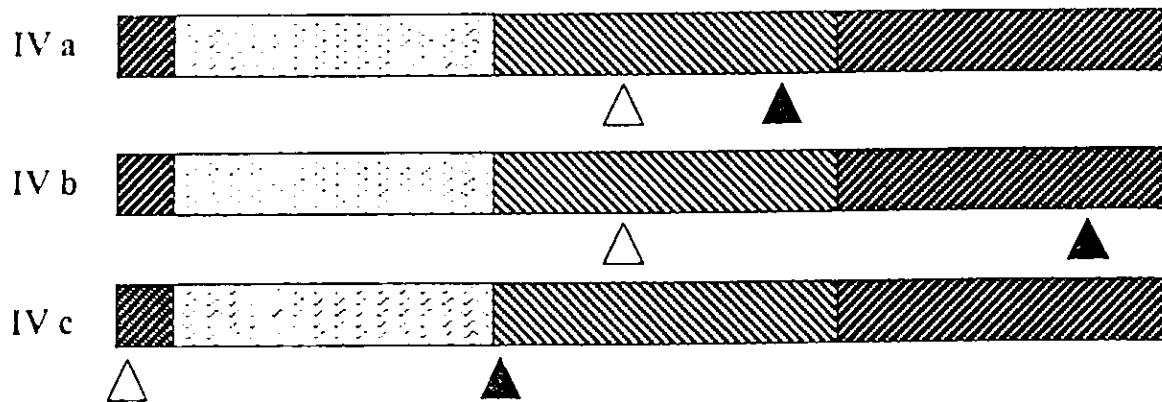
Experiment II



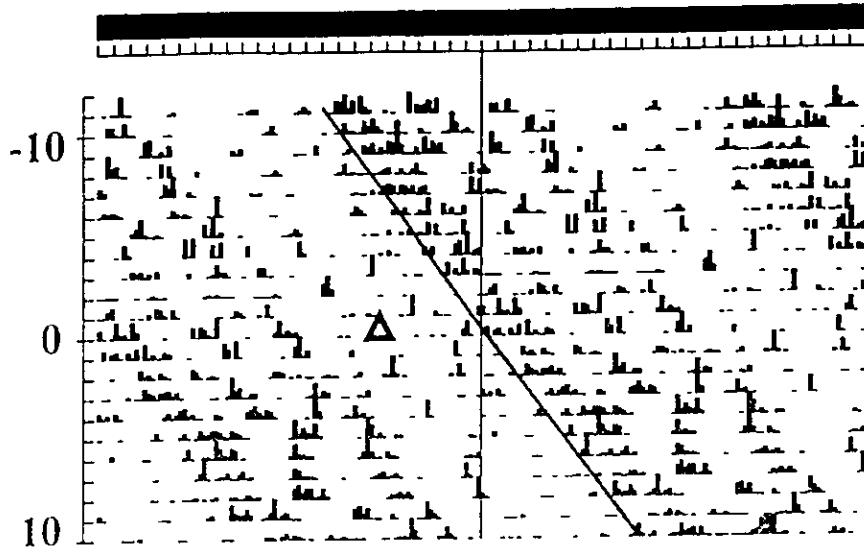
Experiment III



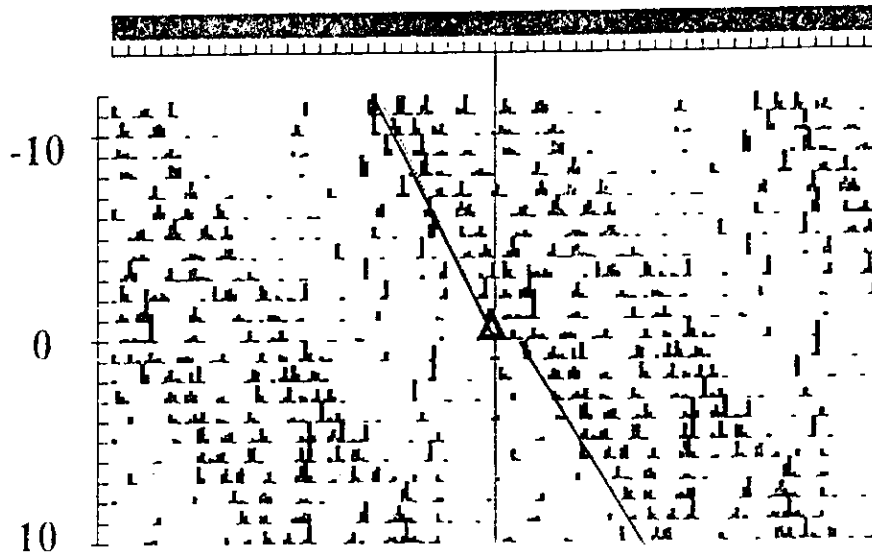
Experiment IV



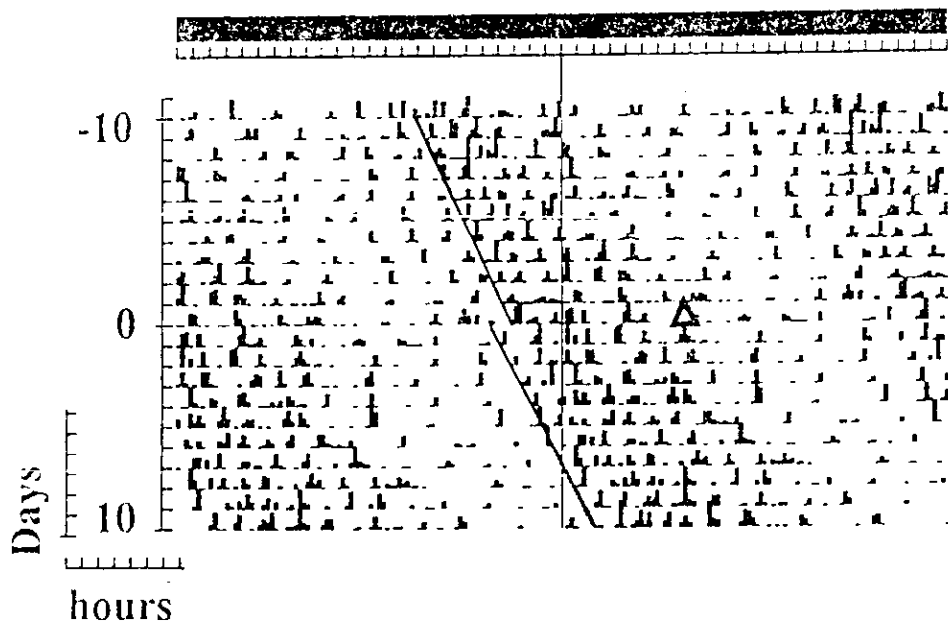
CT 6

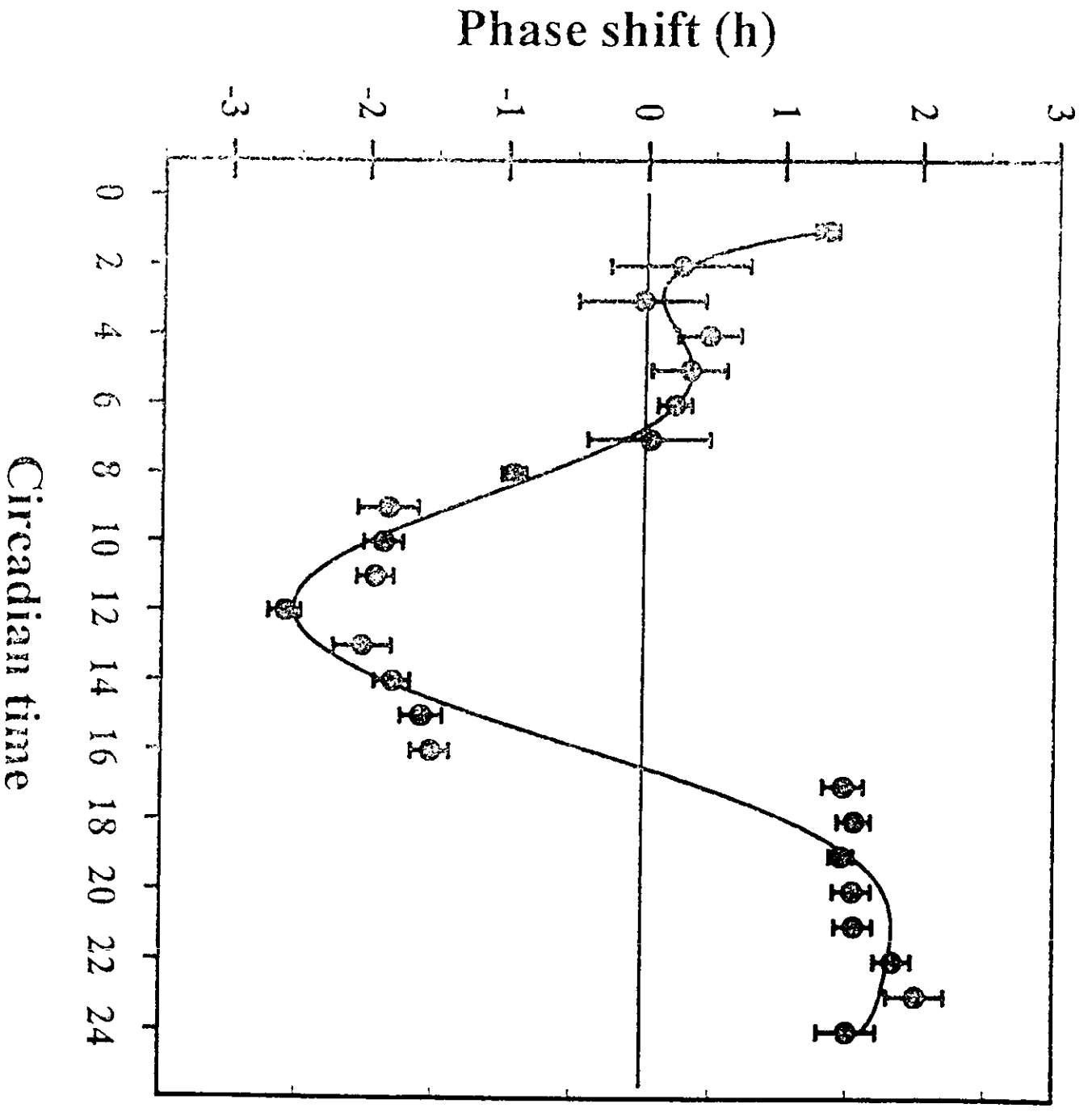


CT 12

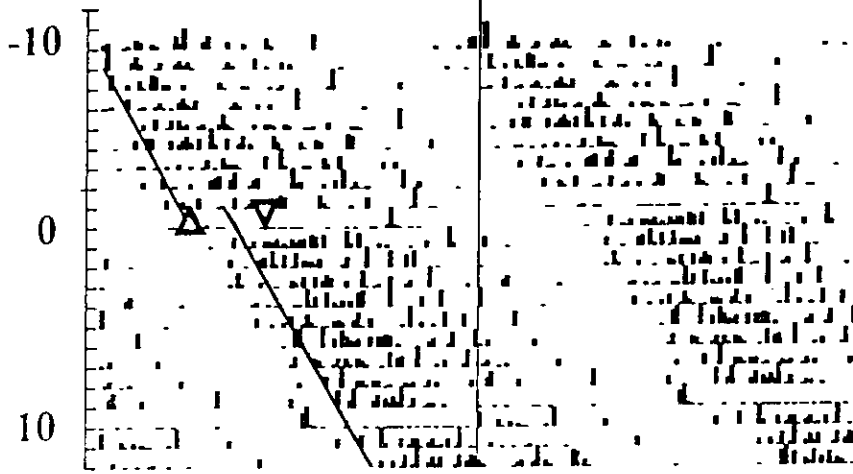


CT 23

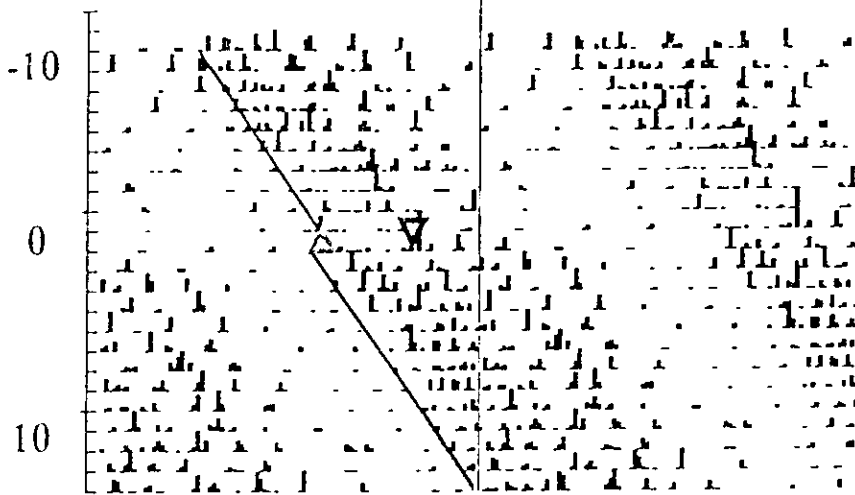




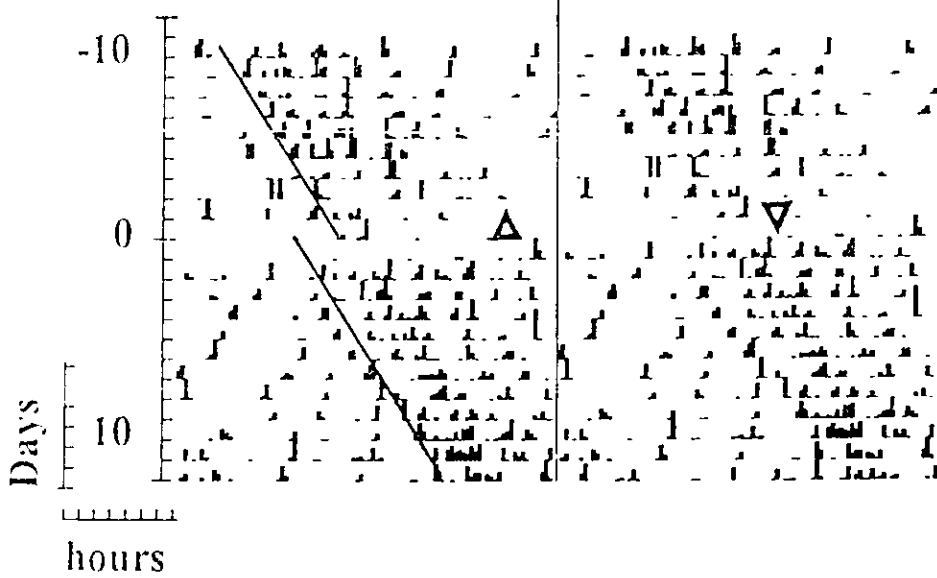
CT 12 + 17



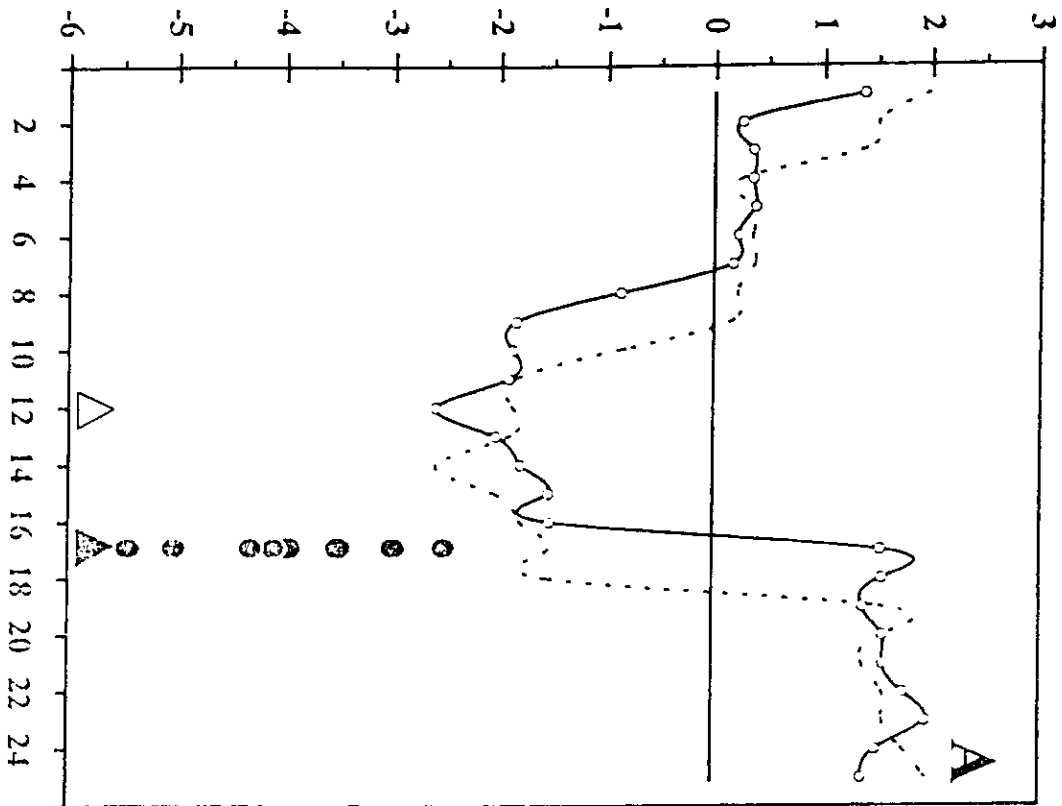
CT - + 17



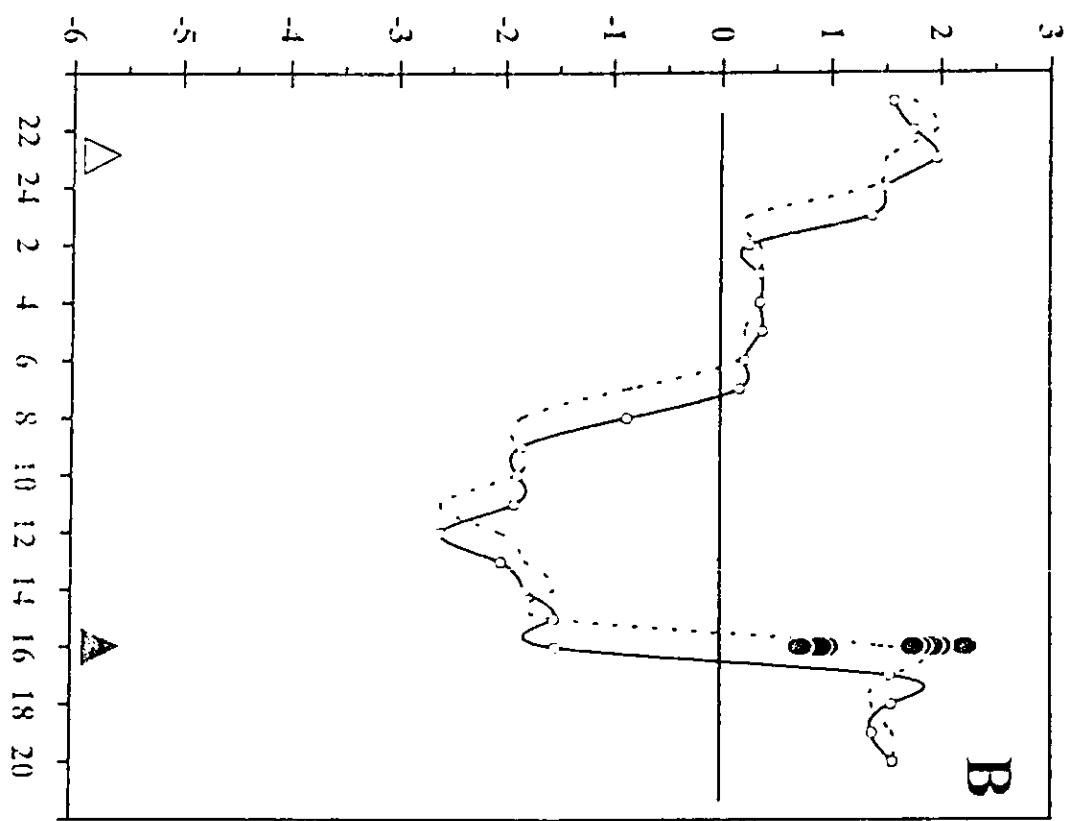
CT 23 + 16



Phase Shift (h)

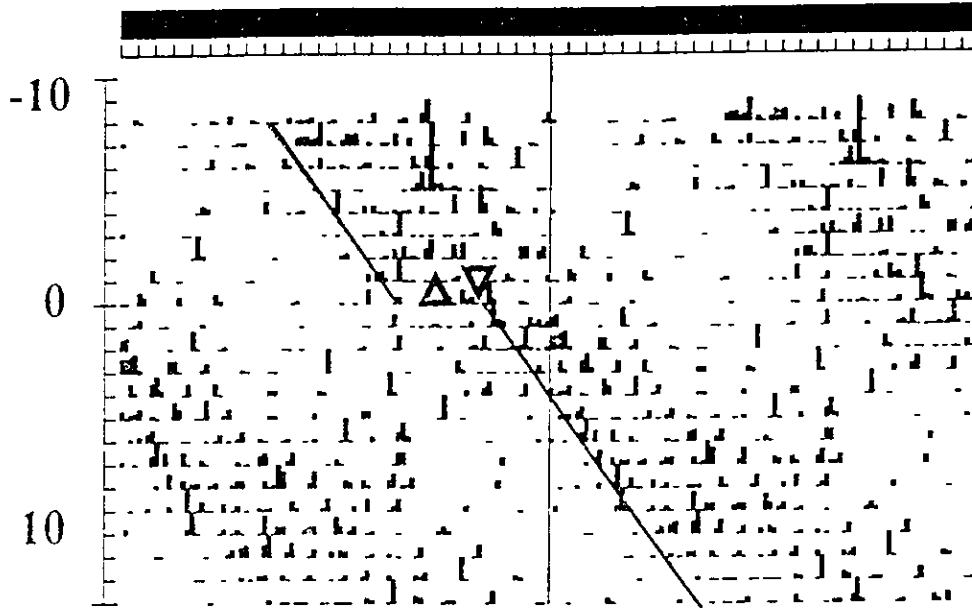


Circadian Time

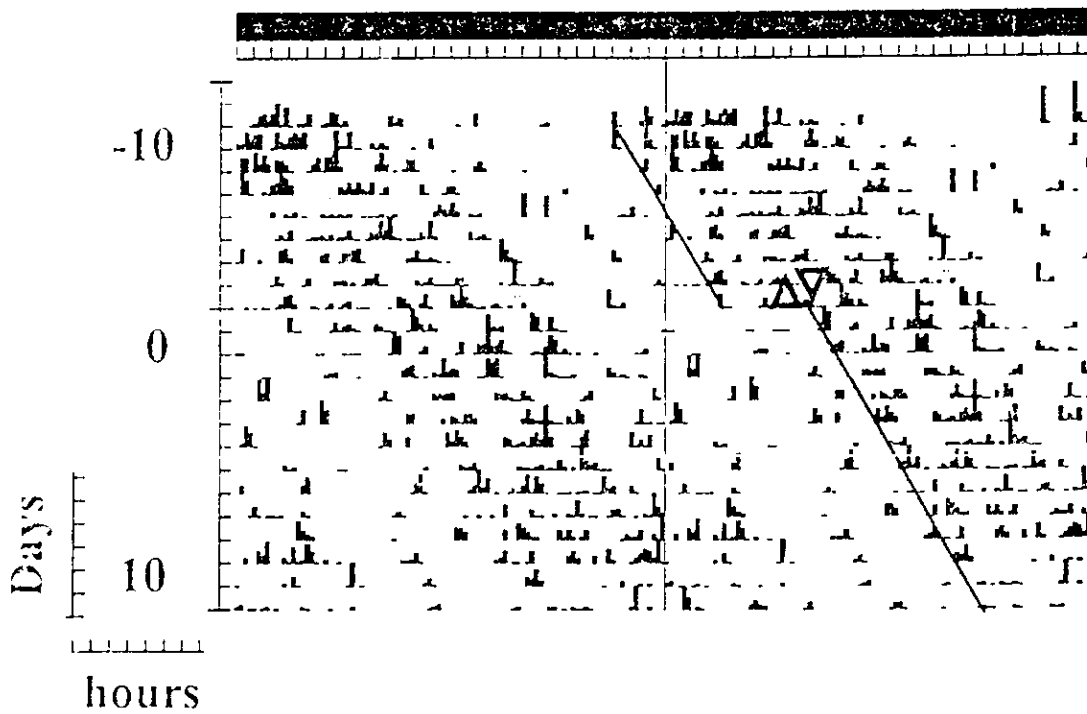


B

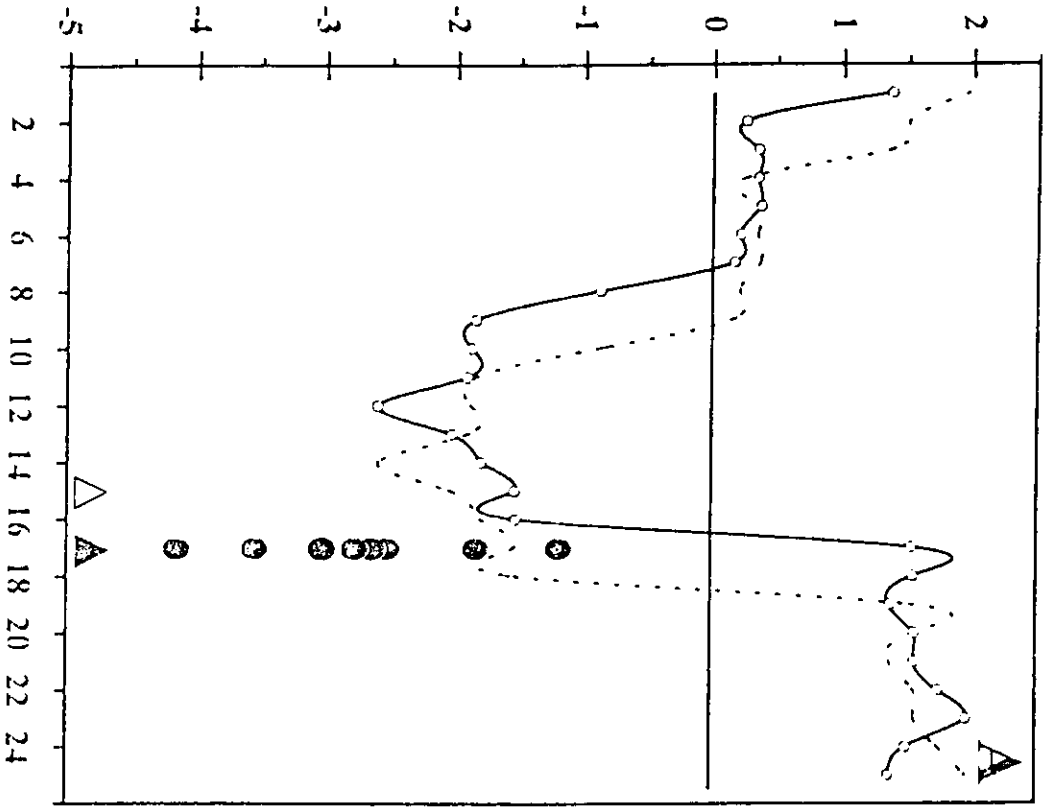
CT 15 + 17



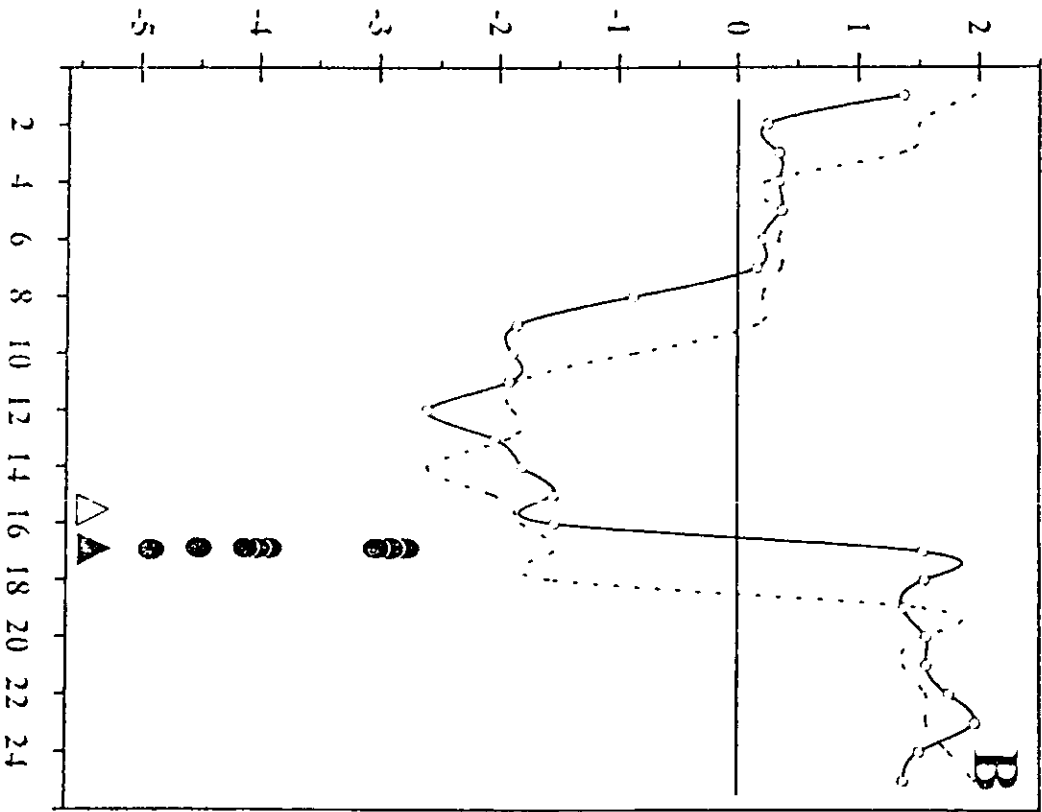
CT 15.5 + 17



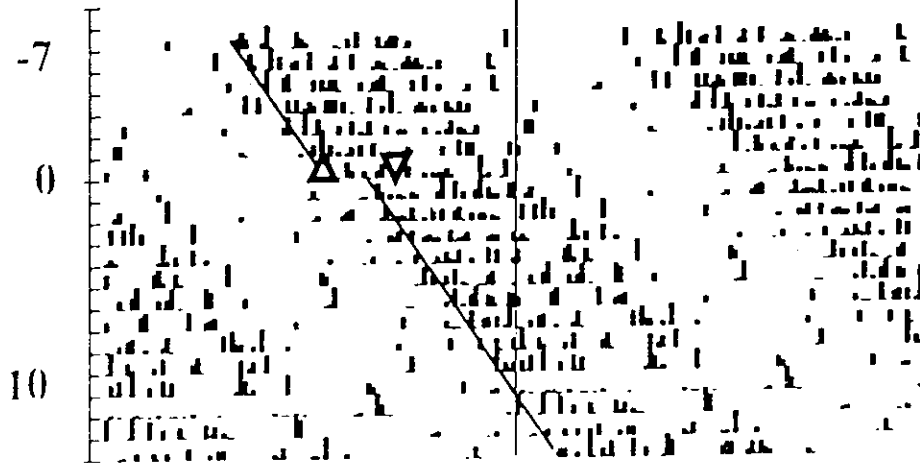
Phase Shift (h)



Circadian Time



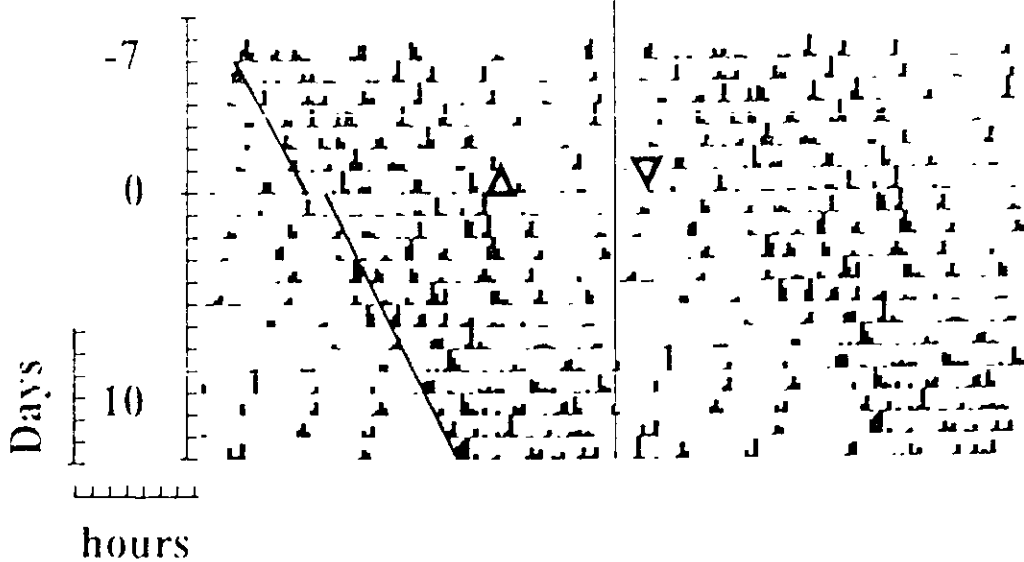
CT 12 + 16



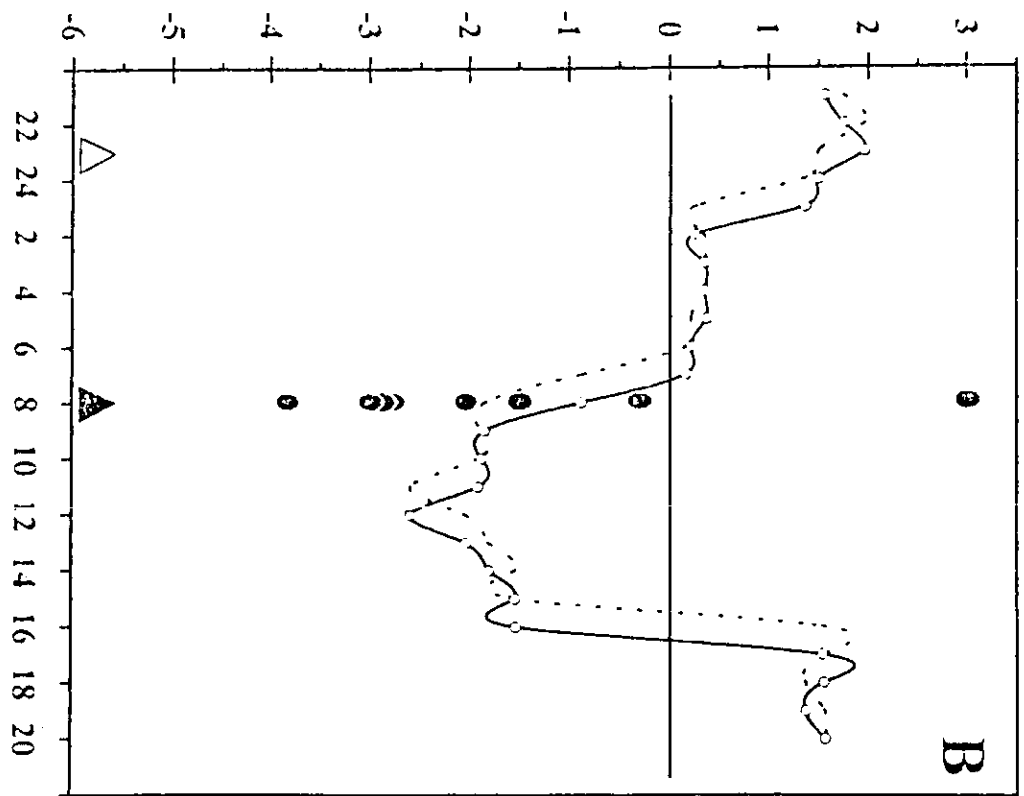
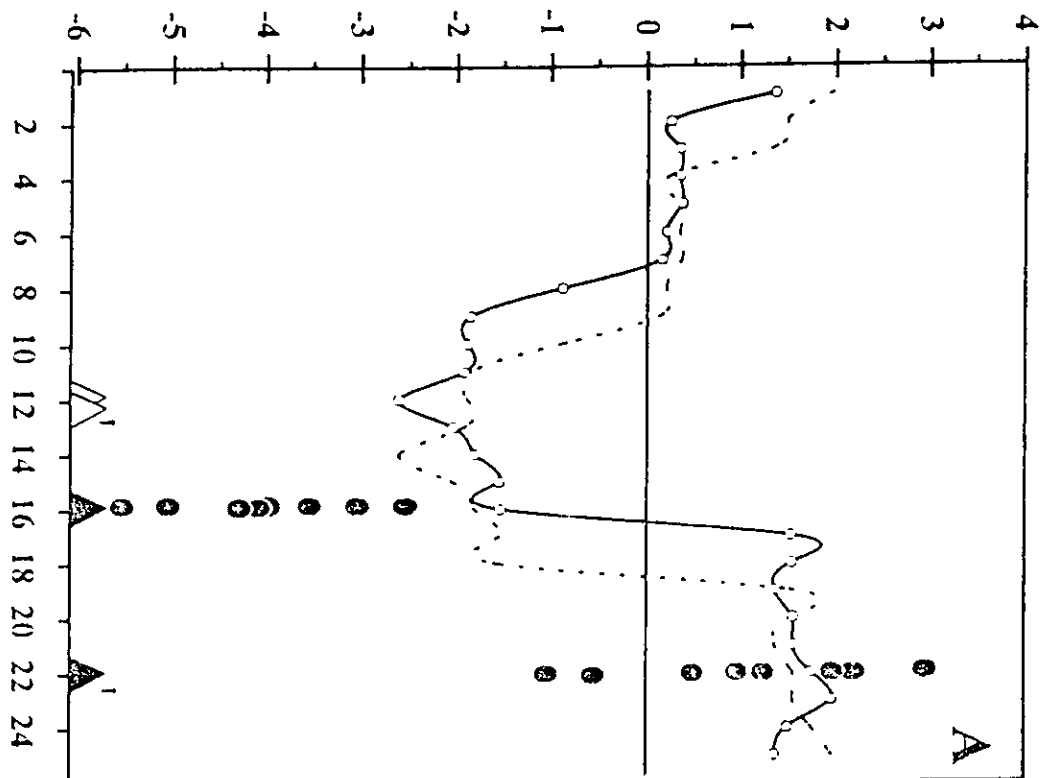
CT 12 + 22



CT 23 + 08



Phase Shift (h)



Circadian Time