



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD Y DE LA PRODUCCIÓN
ANIMAL**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**“EFECTO DE LAS LESIONES DEL NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO
EN LA EXPRESIÓN DE LOS RITMOS DE TEMPERATURA
CORPORAL Y ACTIVIDAD LOCOMOTORA DE CONEJOS EN
DESARROLLO”**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

OSCAR HERNÁNDEZ CAMPOS

**TUTORA: DRA. IVETTE CALDELAS SÁNCHEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
DRA. SARA CABALLERO CHACÓN
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**DR. MANUEL MIRANDA ANAYA
FACULTAD DE CIENCIAS**

MÉXICO, D.F. ABRIL, 2013



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.

Financiamiento

La realización de esta tesis fue financiada con parte de los recursos de los proyectos:

IN219510-3 del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnología (PAPIIT), Dirección General de Asuntos del Personal Académico (dgapa) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

261/2009 del Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyTDF).

131314 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)

Agradezco al **CONACyT** por la beca con numero de registro 240009 proporcionada durante el periodo del 1 de febrero de 2010 hasta el 31 de julio de 2011.

Agradecimientos académicos

Agradezco infinitamente el apoyo material, académico y humano otorgado por la Dra. Ivette Caldelas, que me dió la oportunidad de superarme profesionalmente y conocer más a detalle lo fascinante de la ciencia, además de estar al tanto en mi formación profesional y académica a lo largo y posterior al proyecto.

A mi comité tutor; la Dra. Sara Caballero y al Dr. Manuel Miranda, por la supervisión, observaciones y comentarios en el desarrollo de este trabajo.

A cada uno de los miembros del Jurado: Dr. Rodulf M. Buijs, Dra. Margarita Martínez, Dr. Salvador Flores y Dr. Miguel A. Martínez, por sus valiosas críticas y comentarios en la revisión final de la presente tesis.

A la Dra. María Elena Flores, por la disposición y presentación de los seminarios del área de biología molecular, los cuales me recordaron y mostraron más a detalle el complejo funcionamiento de la célula a nivel molecular.

Al Dr. Rodrigo Montúfar, por la elaboración y corrección de los algoritmos con los que fueron analizados las series de tiempo para el análisis estadístico del presente trabajo.

Al señor Pedro Medina, por su disponibilidad, tiempo, paciencia y apoyo en la mejora de la prueba de inmuno-histoquímica que se aplicó en el presente trabajo.

A la bióloga Erika Navarrete por su apoyo y comentarios durante la realización y revisión del proyecto.

A mis compañeros del laboratorio: Marisol, Juan, Moy y particularmente a Lucero, por los comentarios y observaciones durante mis ensayos, así como la

información compartida sobre el tema, también a las muchachas que alguna vez estuvieron en el laboratorio, Almita, Nancy, Valeria, Diana, Adriana y Rodrigo gracias por hacer más entretenida la estancia en el laboratorio.

Agradecimientos personales

“Madre: Gracias por la maternidad, el regalo de cualquier mujer y la salvación de cualquier hijo”

“Gudy”: Quiero agradecerte a ti y a la vida por la dicha de ser tu hijo, por todo lo bueno que tu personalidad ha influido en mi, sin duda para mi eres y serás la mejor madre que pude haber tenido, cualquier palabra escrita aquí es incapaz de demostrar el gran cariño y amor que te tengo, madre, gracias por tu confianza y apoyarme en todo momento y en cualquier circunstancia, te ama...tú hijo.

“Cuando dos hermanos trabajan juntos las montañas se convierten en oro”

Hermana, en toda esta vida siempre me has llevado la delantera, pero continuamente me has extendido tu mano para continuar con el siguiente paso, para mí eres una excelente maestra de la vida, gracias por tu apoyo, cariño y comprensión, igual no suelo decírtelo a menudo pero sabes que tu hermano te ama y estará contigo en todo momento que la vida lo permita.

A Regina, por su chispa diaria y su peculiar sonrisa, gracias por hacerme sentir de una manera totalmente fresca, distinta y agradable, te ama tu tío.

“Conocer el amor de los que amamos es el fuego que alimenta la vida”

Pablo Neruda

Tú y yo sabemos que esta tesis tiene horas de trabajo invertidas de tu parte, agradezco muchísimo al destino por haber compartido este proceso juntos, no tengo duda que tu amor y apoyo siempre ha sido incondicional, gracias a ti, he descubierto una parte mía totalmente distinta, también con intención tuya o sin ella me has hecho ser una mejor persona, a grandes rasgos tu personalidad floreciente, compañía, buena vibra e infinito amor influye diariamente, como tu lo me lo dijiste, este es un paso más que juntos hemos logrado para continuar con todos los sueños que nos hemos propuesto, una vez más muchas gracias por existir Marisol Ramos “Avellanosa” para mi y para los memorándums. Te amo bien machin.

“El verdadero amigo es aquel que a pesar de saber como eres te quiere”

Sin orden de importancia, agradezco mucho a cada uno de mis más cercanos amigos: Wendy F., Susana E., Luis B., Dulce A., Lizbeth X., Omar V., Carmen P., Emma R., Carla L., Juan Luis M. (primo) y al de hace mucho tiempo Ariel L. Las pláticas, consejos y convivencia con cada uno de ustedes las aprecio mucho y no las cambiaría por nada, es muy grato saber que cuento con su amistad y apoyo, tengan por hecho que yo corresponderé de manera similar, los quiero harto “cuates”.

Dedicatoria

“Desearía tener alas y volar hasta lo más alto para volverte a ver”

“Benja” a ti es a quién principalmente dedico la realización y todo el esfuerzo plasmado en esta tesis.

En esta etapa de mi vida a menudo suelo recordar algunos consejos que me diste desde niño, sin darme cuenta me creaste un sentido de seguridad que se ha reforzado a lo largo del tiempo, nunca dudaste de mi y hoy más que nunca me alegra mucho todas las ocasiones que me repetiste que querías ver mi título colgado en la pared, pronto serán dos. También, hoy me doy cuenta que tu forma de vivir la vida tuvo un gran impacto sobre la mía, ahora con más razón comprendo que una parte de tu papel fue mostrarme siempre tomar las mejores decisiones y tratar de hacer lo correcto la mayor de veces posible. Papá, donde quiera que te encuentres te aseguro que no te defraudaré y transmitiré todas las cosas buenas que me enseñaste, sé que estás conmigo en los malos y buenos momentos, sólo me queda decirte... de corazón, gracias, muchas gracias *Benja* por todo lo otorgado a base de tu esfuerzo, ahora sé con mayor claridad lo que cuestan las cosas y vaya que se disfrutan. Te ama y te extraña muchísimo tu “enano”.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN	3
1. Los ritmos circadianos	3
2. Características de los osciladores circadianos	5
2.1 Ritmicidad endógena	6
2.2 Compensación de la temperatura	7
2.3 Sincronización a señales cíclicas	8
2.4 Acoplamiento con el resto del organismo	9
3. Marcapasos y osciladores	10
3.1 El marcapaso circadiano de mamíferos	10
3.2 Anatomía del NSQ	12
3.3 Vías aferentes	14
3.4 Vías eferentes	15
3.5 Osciladores centrales y periféricos	15
4. Bases moleculares de los ritmos circadianos	16
5. Desarrollo de los ritmos circadianos en mamíferos	18
5.1 Desarrollo del NSQ	19
5.2 Desarrollo de la ritmicidad endógena	19
6. Sincronización a edades tempranas del desarrollo	21
7. El conejo europeo como un modelo natural de sincronización durante el desarrollo	23
7.1 Expresión rítmica de la temperatura corporal y actividad locomotora	24
8. Lesiones de NSQ	28
8.1 Lesiones del NSQ en animales neonatos	29

8.2 Sincronización por alimento en roedores adultos	30
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	34
III. HIPÓTESIS	35
IV. OBJETIVOS.....	36
4. Objetivo general	36
4.1 Objetivos particulares.....	36
V. MATERIAL Y MÉTODOS	37
5. Condiciones de alojamiento.....	37
5.1 Partos.....	37
5.2 Animales y grupos	38
5.3 Cirugías.....	38
5.3.1 Cirugía estereotáxica	39
5.3.2 Implantación del sensor de telemetría	41
5.4 Registro de temperatura corporal y actividad locomotora	42
5.5 Acceso controlado al amantamiento y al alimento sólido	43
5.6 Análisis histológico.....	46
5.7 Análisis de datos.....	47
VI. RESULTADOS	51
6. Análisis histológico.....	51
6.1 Ganancia de peso.....	53
6.2 Temperatura corporal	54
6.2.1 Temperatura corporal diaria.....	54
6.2.2 El patrón diurno de temperatura corporal	56
6.2.3 Acrofase y nadir de temperatura corporal	63
6.2.4 Duración de la anticipación de la temperatura corporal	68
6.2.5 Intensidad de anticipación de temperatura corporal.....	71
6.3 Actividad locomotora.....	74

6.3.1 Promedio diario de la actividad locomotora	74
6.3.2 El patrón diurno de la actividad locomotora	75
6.3.3 Acrofase y nadir de la actividad locomotora	83
6.3.4 Duración de la anticipación de la actividad locomotora	86
6.3.5 Intensidad de anticipación de la actividad locomotora	90
V. DISCUSIÓN	93
VIII. CONCLUSIONES	103
IX. BIBLIOGRAFÍA	104

Tablas

Tabla 1. Posición del componente de 24 horas de acuerdo al nivel de energía obtenidos mediante la transformada rápida de Fourier de las series de tiempo de la temperatura corporal obtenidas en los conejos intactos (Con), con lesiones falsas (Sham) y con lesiones de núcleo supraquiasmático (Lx-NSQ).

Tabla 2. Duración del incremento anticipatorio de la temperatura corporal de conejos intactos (Con), con lesiones falsas (Sham) y con lesiones totales de núcleo supraquiasmático (Lx-NSQ), previo al amamantamiento ó acceso al alimento.

Tabla 3. Intensidad de la anticipación de la temperatura corporal de conejos intactos (Con), lesiones falsas (Sham) y lesiones totales de núcleo supraquiasmático (Lx-NSQ), previo al amamantamiento ó acceso al alimento.

Tabla 4. Posición del componente de 24 horas de acuerdo al nivel de energía obtenidos mediante la transformada rápida de Fourier de las series de tiempo de la actividad locomotora de conejos intactos (Con), con lesiones falsas (Sham) y lesiones de núcleo supraquiasmático (Lx-NSQ).

Tabla 5. Duración del incremento anticipatorio de la actividad locomotora de conejos intactos (Con), con lesiones falsas (Sham) y con lesiones totales de núcleo supraquiasmático (Lx-NSQ), previo al amamantamiento ó acceso al alimento.

Tabla 6. Número movimientos cada 5 minutos durante la anticipación de la actividad locomotora de conejos intactos (Con), con lesiones falsas (Sham) y con lesiones totales de núcleo supraquiasmático (Lx-NSQ), previo al amamantamiento ó acceso al alimento.

Figuras

Figura 1. Esquema representativo de los conceptos básicos de los ritmos circadianos.

Figura 2. Actograma representativo de la actividad locomotora de un roedor.

Figura 3. Microfotografías demostrativas de la localización del núcleo supraquiasmático del hipotálamo.

Figura 4. Esquema del asa de retroalimentación molecular que ocurre en las neuronas del NSQ.

Figura 5. Patrones temporales de temperatura corporal de conejos en condiciones normales y en ayuno de 48 h.

Figura 6. Esquema representativo del procedimiento quirúrgico para lesionar el NSQ.

Figura 7. Esquema del protocolo de sincronización por amantamiento y alimentación sólida restringida.

Figura 8. Esquema representativo del orden de obtención de los cortes histológicos.

Figura 9. Imágenes representativas de cortes coronales de conejos neonatos de 29 días de edad del grupo control (Con), con lesiones falsas (Sham) y con lesiones totales de núcleo supraquiasmático (Lx-NSQ) teñidos con la técnica de Nissl e inmunohistoquímica contra la proteína intranuclear NeuN.

Figura 10. Ganancia diaria de peso corporal en conejos intactos (Con) con lesiones falsas (Sham) y con lesiones completas de núcleo supraquiasmático (Lx-NSQ), durante los días de edad 20-29, en los que se llevó a cabo la transición de amamantamiento a alimentación sólida.

Figura 11. Promedio diario de temperatura corporal del día postnatal 5 a 29 de conejos intactos (Con); con lesiones falsas (Sham) y con lesión completa de núcleo supraquiasmático (Lx-NSQ).

Figura 12. Patrón diario de temperatura corporal de conejos representativos del grupo de conejos intactos (Con), con lesiones falsas (Sham) y con lesiones totales de núcleo supraquiasmático (Lx-NSQ).

Figura 13. Gráficas representativas de las 25 frecuencias de mayor energía detectadas por la transformada rápida de Fourier en el ritmo de temperatura corporal de conejos intactos (Con, sujeto # 101), con lesiones falsas (Sham, sujeto # 97) y con lesiones de núcleo supraquiasmático (Lx-NSQ, sujeto # 95) analizados por segmento.

Figura 14. Promedio de la acrofase y el nadir de la temperatura corporal de los conejos de los grupos intactos (Con, n=6), con lesiones falsas (Sham, n=6) y con lesión completa de núcleo supraquiasmático (Lx-NSQ, n=6) durante los 25 días de registro.

Figura 15. Duración de la anticipación de la temperatura corporal en las crías de conejo previo al amamantamiento ó acceso al alimento en los grupos intactos (Con), con lesiones falsas (Sham) y con lesiones totales de NSQ (Lx-NSQ).

Figura 16. Gráfica del promedio de la intensidad de la anticipación de la temperatura corporal en conejos intactos (Con), con lesiones falsas (Sham) y con lesiones totales de núcleo supraquiasmático (Lx-NSQ).

Figura 17. Promedio diario de la actividad locomotora del día postnatal 5 a 20 de conejos intactos (Con), con lesión falsa (Sham) y con lesión completa de núcleo supraquiasmático (Lx-NSQ).

Figura 18. Actogramas representativos de actividad locomotora de los conejos intactos (Con, sujeto # 101), con lesiones falsas (Sham, sujeto # 97) y con lesiones completas de núcleo supraquiasmático (Lx-NSQ, sujeto # 95) registrados del día 5 al día 29 postnatal.

Figura 19. Patrón diario de la actividad locomotora de conejos representativos del grupo de conejos intactos (Con), con lesiones falsas (Sham) y con lesiones totales de núcleo supraquiasmático (Lx-NSQ).

Figura 20. Gráficas representativas de las 25 frecuencias de mayor energía obtenidas por la transformada rápida de Fourier en el ritmo de la actividad locomotora de conejos intactos (Con, sujeto # 101), con lesiones falsas (Sham, sujeto # 97) y con lesiones completas de núcleo supraquiasmático (Lx-NSQ, sujeto # 95) analizados por segmento.

Figura 21. Promedio de la acrofase y el nadir de la actividad locomotora de los conejos de los grupos intactos (Con), con lesiones falsas (Sham) y con lesión completa de núcleo supraquiasmático (Lx-NSQ) durante los 25 días de registro.

Figura 22. Duración de la anticipación de la actividad locomotora en las crías de conejo previo al amamantamiento ó acceso al alimento en los grupos intactos (Con), con lesiones falsas (Sham) y con lesiones totales de NSQ (Lx-NSQ).

Figura 23. Promedio de la intensidad de la anticipación de la actividad locomotora en conejos intactos (Con), con lesiones falsas (Sham) y con lesiones totales de núcleo supraquiasmático (Lx-NSQ).

Glosario

Oscilación espontánea o libre corrimiento: Corresponde a la expresión de un ritmo circadiano bajo la ausencia de señales cíclicas. Dependiendo de la naturaleza del organismo, el periodo del ritmo circadiano puede ser ligeramente mayor o menor a 24.

Día subjetivo: Se refiere al inicio de la actividad en los animales diurnos mantenidos en condiciones constantes, por convención corresponde al tiempo circadiano 0 (TC0).

Noche subjetiva: Corresponde al inicio de la actividad de los organismos nocturnos bajo condiciones constantes, por convención pertenece al tiempo circadiano 12 (TC12).

Sincronizador ó Zeitgeber (este ultimo es un verbo alemán que significa *dar*): Son estímulos ambientales cíclicos capaces de reajustar el ritmo de un individuo a la evolución del ciclo externo.

Frecuencia: Se refiere al numero de veces que se repite un fenómeno biológico dentro de un tiempo determinado, en el caso de los ritmos circadianos, estos se repiten una vez aproximadamente cada 24 horas, por lo que su frecuencia es igual a uno.

Abreviaciones

AAA	Actividad anticipatoria al alimento
AcL	Actividad locomotora
Ccg	Genes controlados por el reloj.
CK1 ϵ ,	Caseín cinasa 1 épsilon
CK1 δ	Caseín cinasa 1 delta.
Con	Control (grupo)
GABA	Ácido gamma-aminobutírico.
HIG	Hojuela intergeniculada.
L:L	Luz continua.
L:O	Luz – oscuridad.
Lx-NSQ	Lesión de núcleo supraquiasmático (grupo)
NRD	Núcleo del rafe dorsal.
NSQ	Núcleo supraquiasmático.
O:O	Oscuridad continua.
OSA	Oscilador sincronizado por alimento
QO	Quiasma óptico.
SNC	Sistema nervioso central.
SNP	Sistema nervioso periférico.
Tc	Temperatura corporal
TGH	Tracto genículo hipotalámico.
TRH	Tracto retino hipotalámico.
TRF	Transformada rápida de Fourier.
VIP	Péptido vasoactivo intestinal.
VP	Vasopresina.

RESUMEN

Una característica inherente en los organismos es el exhibir oscilaciones rítmicas en importantes procesos fisiológicos, bioquímicos y conductuales, cuya frecuencia es cercana a 24 horas, estas fluctuaciones son conocidas como ritmos circadianos. Estos ritmos son generados de forma endógena y autosostenida por marcapasos y osciladores circadianos los cuales ajustan su funcionamiento a los cambios cíclicos del medio ambiente, fenómeno que se conoce como sincronización. En mamíferos, el principal marcapaso está localizado en el núcleo supraquiasmático (NSQ) y es el responsable de generar diversos ritmos. En roedores adultos se ha demostrado que lesiones completas del NSQ eliminan la expresión de diversos patrones rítmicos tales como: la ingesta de agua, el ciclo sueño vigilia, la actividad locomotora (AcL), secreción de cortisol, entre otros. Sin embargo, algunos otros parámetros persisten tales como el ritmo de la temperatura corporal (Tc) y la actividad anticipatoria al alimento (AAA). En el presente estudio se investigó el efecto de la lesión completa del NSQ de conejos neonatos de 4 días de edad sobre el patrón de la Tc y AcL mantenidos en luz continua durante el amamantamiento (señal sincronizadora), en ausencia de esta y con alimentación sólida controlada. Se demostró que la lesión completa del NSQ, no tiene efecto en la expresión rítmica de la Tc y AcL durante el periodo de amamantamiento y alimentación sólida controlada. Adicionalmente la AAA de ambos parámetros persistieron en ausencia del amamantamiento, sin embargo se encontró un efecto significativo en la duración e intensidad del componente anticipatorio de la AcL tanto en el periodo de amamantamiento como en la alimentación sólida controlada. Estos datos sugieren que existe otra u otras estructuras capaces de generar la ritmicidad diaria de la Tc y AcL de conejos en edades tempranas del desarrollo independientemente de la integridad del NSQ.

Palabras clave: ritmos circadianos, anticipación al amamantamiento, lesión de núcleo supraquiasmático, temperatura corporal, actividad locomotora.

ABSTRACT

An innate characteristic of organism is to show rhythms oscillation in important process as a chemistry, physiology and behavioral process; whose frequency is near at 24 hours, these processes are called circadian rhythms. These rhythms are produced endogenously by pacemakers and circadian oscillators, which adjust their function to the cyclical changes of the environment, a phenomenon known as synchronization. In mammals the main pacemaker is located in the suprachiasmatic nucleus (SCN) and this it is responsible to coordinate divers rhythms. In adults rodents have been shown that complete lesion of the SCN abolished different rhythms patterns such as: sleeping-wake cycle, locomotor activity (LA), cortisol release and other. However, other parameters continue such as body temperature rhythm (Bt) and food anticipatory activity (FAA). In the present work we investigated the effect of complete lesion of the SCN in 4 days old rabbits pups, using the Bt and LA patterns and keeping the animals in different feeding condition: in constant lighting during nursing (synchronizing signal), fasting nursing and with solid controlled food. We observed that the complete lesion of SCN did not disrupt the daily rhythms of Bt and LA during nursing and solid controlled food. Further, both FAA of Bt and LA continued in fasting nursing conditions, however, we detected a significative change in the duration and intensity of anticipatory compound of AL during nursing and solid controlled food. This data suggest that there are another structures that are able to generate daily rhythmicity of Bt and LA in rabbits in early stages of development regardless of the integrity of the SCN.

Keywords: circadian rhythms, anticipation of nursing, lesión of suprachiasmatic nucleus, body temperatura, locomotor activity.

I. INTRODUCCIÓN

1. Los ritmos circadianos

Una característica presente en los organismos es manifestar diariamente oscilaciones rítmicas en diversos parámetros biológicos que van desde la expresión conductual, hasta mecanismos moleculares complejos. Estos eventos están estrechamente relacionados con las variaciones cíclicas generadas por el movimiento de rotación de la tierra, tal como el ciclo luz-oscuridad, por lo que diversas variables biológicas de un organismo muestra fluctuaciones cercanas a las 24 horas (Pittendrigh, 1960, 1965).

Los ritmos circadianos (la palabra “circadiano” proviene del Latín: *circa* = cerca; *dies* = día) son todos aquellos procesos biológicos que se repiten con una frecuencia cercana a las 24 horas, tales como el ciclo sueño-vigilia (Munch *et al.*, 2007), la liberación de hormonas (Alvarez *et al.*, 2005; Díaz-Muñoz *et al.*, 2000), neurotransmisores (Aton *et al.*, 2005; Gillette y Reppert, 1987; Kalsbeek *et al.*, 2010), actividad neuronal (Shibata *et al.*, 1982; Welsh *et al.*, 1995), cambios metabólicos (Bass, 2011; Kalsbeek *et al.*, 2007; Schwartz *et al.*, 1983), fisiológicos (Castillo *et al.*, 2005; Jilge *et al.*, 2001), entre otros.

Los ritmos circadianos son un fenómeno complejo que coordinan la fisiología del organismo con el medio ambiente, es decir la temporalidad de los eventos del medio interno ocurren de acuerdo a los cambios diarios del medio ambiente. Esto confiere el valor adaptativo a los ritmos circadianos, ya que muchas funciones vitales de los organismos ocurren con relación a los eventos cíclicos ambientales, esto propicia que el sistema circadiano pueda anticiparse y generar un correcto funcionamiento interno con respecto al mundo externo (Davidson y Menaker, 2003; Gruart *et al.*, 2002).

Para poder caracterizar los ritmos circadianos, fueron establecidos ciertos parámetros para referirse y explicar los fenómenos cíclicos; a continuación, se

encontrará un enlistado con los parámetros comúnmente analizados en las señales rítmicas (fig. 1).

- a) **Periodo:** Es el lapso de tiempo que tarda en repetirse un fenómeno rítmico y se refiere al intervalo de tiempo entre dos puntos de referencia idénticos. En donde τ indica la duración del periodo del ritmo generado por el organismo en ausencia de señales cíclicas. Mientras que T corresponde al tiempo en que se repite una señal cíclica externa.
- b) **Fase (Φ):** Es cualquier momento instantáneo en una escala temporal arbitraria, por practicidad suele tomarse el inicio del evento, el punto máximo o mínimo del mismo.
- c) **Ángulo ó relación de fase (Ψ):** Corresponde a la diferencia en grados o tiempo que guardan dos señales cíclicas, con relación a dos fases ó puntos de referencia, pudiendo comparar un periodo T , con uno ó mas periodos τ endógenos.
- d) **Acrofase:** Se refiere al momento máximo de la oscilación del ritmo.
- e) **Nadir:** Es el valor mínimo registrado del ritmo.
- f) **Amplitud:** Se refiere a la distancia que existe entre la acrofase y el nadir.
- g) **Mesor:** Es el punto medio de la amplitud.
- h) **Tiempo Circadiano (TC):** Los ritmos circadianos mantenidos en oscilación espontánea no son exactos a 24 horas, por convención se estableció que una hora circadiana de un organismo corresponde al cociente del periodo endógeno entre 24 horas.
- i) **Tiempo del sincronizador ó Zeitgeber (TZ):** Es el lapso y periodo de tiempo en que el estímulo esta presente; por convención el inicio de ese momento se considera TZ0.

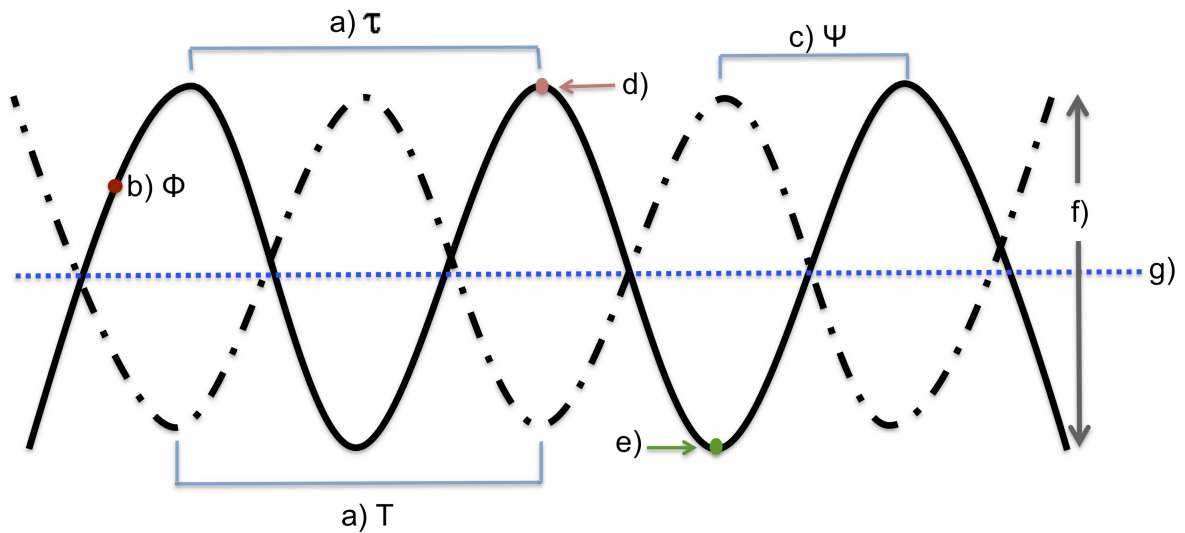


Figura 1. Esquema representativo de los conceptos básicos de los ritmos circadianos; a) periodo de la oscilación interna; b) fase del ritmo; c) ángulo o relación de fase; d) acrofase; e) nadir; f) amplitud; g) mesor. La línea continua indica la expresión del ritmo circadiano, la línea punteada se refiere al ritmo del sincronizador. Para mayor detalle revisar texto. (imagen modificada de Gruart *et al.*, 2002).

2. Características de los osciladores circadianos

Actualmente se sabe que los ritmos circadianos son generados por estructuras internas que se conocen como **osciladores circadianos**, los cuales tienen la capacidad de regular la ritmicidad de diversas variables (Hastings *et al.*, 2007; Weaver, 1998).

Con base a sus características funcionales se denomina **marcapasos u osciladores primarios** a las células (Welsh *et al.*, 1995) ó tejidos (Weaver, 1998) que poseen la capacidad de mantener su ritmicidad circadiana por varios ciclos de manera autosostenida y que además influyen en la generación y control de ritmicidad de otras células (Li *et al.*, 2008). En contraste se considera como **osciladores secundarios** a los grupos de células (Balsalobre *et al.*, 2000a) o tejidos que exhiben variaciones cercanas a las 24 horas del día, pero estos

requieren de estímulos periódicos para sostener su ritmicidad; sin dicho estímulo diario el oscilador secundario no es capaz de mantener su ritmicidad (Yamazaki *et al.*, 2000).

Los marcapasos y osciladores circadianos poseen una serie de particularidades que permiten el adecuado funcionamiento del organismo. Dentro de las características más importantes se encuentran: 1) Generan ritmicidad de manera endógena, 2) compensan la temperatura, 3) son sincronizables a señales cíclicas y 4) imponen periodo y fase al resto del organismo (sólo en el caso de los marcapasos los cuales serán explicados más adelante); esto permite a los marcapasos y osciladores circadianos generar y coordinar la expresión de diversos ritmos del organismo con relación al ambiente externo.

2.1 Ritmicidad endógena

Las fluctuaciones circadianas son autónomas como parte de los mecanismo de regulación interna. En condiciones naturales los marcapasos y osciladores secundarios están sincronizados al ambiente local. Sin embargo al colocar a un organismo bajo la ausencia de señales cíclicas, estos son capaces de mostrar su ritmicidad endógena durante varios ciclos, este fenómeno es conocido como **oscilación espontanea** ó libre corrimiento (fig. 2) (Moore-Ede *et al.*, 1982). Entre individuos de la misma especie, un mismo ritmo en oscilación espontánea no siempre tiene el mismo periodo, existe un rango de variación de oscilación espontánea, por lo que después de varios ciclos los sujetos se desincronizan entre si (Gruart *et al.*, 2002; Shibata y Moore, 1988a). Además estos ritmos cumplen con la característica de ser heredables y permanecer por varias generaciones en ausencia de señales cíclicas (Díez-Noguera *et al.*, 1989).

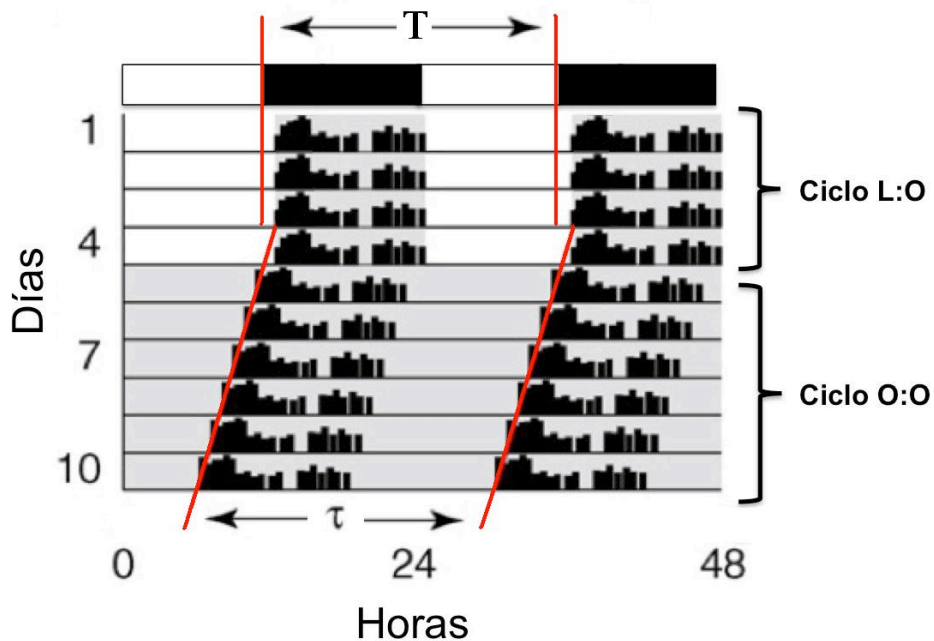


Figura 2. Actograma representativo de la actividad locomotora de un roedor. Los primeros 4 días, el animal estuvo bajo un fotoperiodo de 12 horas de luz por 12 horas de oscuridad (L:O, representado con las barras superiores blanca y negra). El inicio de la actividad locomotora comenzó con el apagado de las luces y cesó con el encendido de las mismas. Del día 5 al día 10, el animal fue mantenido bajo oscuridad continua (O:O). El animal muestra su periodo endógeno τ el cual es menor a 24 horas, por lo que día con día el inicio de la actividad comienza momentos antes que en el día anterior. (Imagen modificada de Kohsaka y Bass, 2007).

2.2 Compensación de la temperatura

Los osciladores circadianos deben de mantener de forma estable su funcionamiento de tal forma que la duración del periodo no se alargue ó acorte debido a la variación de temperatura ambiental, es decir el oscilador debe ser capaz de compensar los cambios de temperatura independientemente del sitio en el que habite el individuo (Pittendrigh, 1960). Los cambios producidos por la temperatura de muchas reacciones biológicas son medidas con el coeficiente de temperatura: Q_{10} , el cual normalmente para la gran mayoría de reacciones químicas oscila entre un valor de 2 a 3. El valor de Q_{10} para el periodo circadiano de mamíferos permanece cerca de 1 (revisado en Kuhlman *et al.*, 2007). Hasta el

momento no se conoce con exactitud el mecanismo mediante el cual el sistema circadiano es capaz de compensar adecuadamente la temperatura.

2.3 Sincronización a señales cíclicas

La sincronización se refiere al proceso a través del cual es posible el funcionamiento coordinado entre el sistema endógeno y el medio ambiente, por lo que se define como el ajuste del periodo y de la fase del sistema circadiano igualando al T de la señal sincronizadora, esto permite que el organismo sea capaz de anticipar y responder de forma óptima a los cambios diarios del ambiente (Pittendrigh, 1965; Daan y Aschoff, 2001). Cuando la sincronización ocurre, el sistema adopta una relación de fase específica con la señal sincronizadora (Daan y Aschoff, 2001).

Las señales cíclicas del ambiente o sincronizadores desempeñan un papel relevante sobre la ritmicidad de un organismo, ya que los osciladores circadianos son sensibles a estas, lo cual permite al sistema tener una orientación temporal adaptativa de su medio interno, con el externo (Gruart *et al.*, 2002; Pittendrigh, 1960).

En condiciones naturales existen múltiples señales temporales ambientales, las cuales deben cubrir los siguientes criterios para que sean considerados como señales sincronizadoras:

- a) Las señales sincronizadoras o zeitgebers deben ser estables en cuanto a su periodo y fase.
- b) Los osciladores circadianos deben ser sensibles a dichas señales.
- c) El periodo del sincronizador debe de estar dentro del rango de sincronización, el cual varía entre especies. Por ejemplo estudios con ratones mostraron que el rango de sincronización de la actividad locomotora (AcL) a ciclos de luz-oscuridad (L:O) puede ir de 21 a 28 horas (Moore-Ede *et al.*, 1982). Mientras que para un ave (*Fringilla*

coelebs) en condiciones similares el rango de sincronización de la actividad locomotora va de 23 a 25 horas (Daan y Aschoff, 2001).

- d) La señal sincronizadora debe ser capaz de ajustar diariamente la fase del oscilador, hasta que τ sea igual a T (Daan y Aschoff, 2001; Pittendrigh, 1965).

El ciclo L:O generado por la rotación terrestre propicia un periodo y fase estable, por ello el ciclo del fotoperiodo es considerado como la principal señal sincronizadora del sistema circadiano (Daan y Aschoff, 2001; Moore-Ede *et al.*, 1982).

El sistema circadiano además de ser sensible y sincronizable a señales fóticas, también lo es a diferentes estímulos externos cíclicos que difieren de las señales luminosas tal como es el caso de la sincronización con la rueda de actividad (Bobrzynska y Mrosovsky, 1998), la alimentación restringida (Escobar *et al.*, 1998; Mistlberger, 1994; Stephan, 1992), cambios de temperatura ambiental en explantes hipotalámicos (Buhr *et al.*, 2010), la restricción materna (Ohta *et al.*, 2003), el amamantamiento (Caldelas *et al.*, 2009; Gilge *et al.*, 1987), inyecciones hormonales (Balsalobre *et al.*, 2000a; Davis y Mannion, 1988; Hastings *et al.*, 1992) y en cultivos *in vitro* a exposición periódica de concentraciones de suero (Balsalobre *et al.*, 1998) entre otros estímulos. Estas manipulaciones no involucran un fotoperiodo de L:O, por lo tanto son consideradas como señales no fóticas, las cuales cumplen con características suficientes dentro los criterios de sincronización para ser consideradas señales sincronizadoras.

2.4 Acoplamiento con el resto del organismo

El acoplamiento es el proceso por el cual los osciladores del organismo se mantienen funcionando de manera coordinada. Esto es posible cuando se ajusta el periodo y la fase entre los diferentes osciladores (revisado en Caldelas, 2000).

En organismos complejos los osciladores están organizados y distribuidos de tal manera que conforman una red compleja que permite la interacción y

comunicación entre ellos para coordinar los diferentes ritmos fisiológicos (Abe *et al.*, 2002; Dibner *et al.*, 2010; Fanjul-Moles y Marcia, 2009; Herzog, 2007).

Hasta el momento se ha sugerido que el fenómeno de acoplamiento se lleva a cabo por tres maneras: 1) Vía secreción de hormonas, 2) vía parasimpática y 3) vía simpática del sistema nervioso autónomo. Por medio de estas rutas los osciladores centrales y periféricos preparan la actividad para los cambios que se avecinan así como a las hormonas que se asocian con estos cambios (Buijs *et al.*, 2006). Sin embargo, cuando ocurre una interrupción en el funcionamiento del marcapaso circadiano, como el caso de lesiones hipotalámicas ó a la exposición prolongada de luz ó oscuridad continua, se presenta un fenómeno conocido como desincronización interna. Una particularidad de la desincronización interna es la presencia de diferentes periodos rítmicos generados por los osciladores; estos periodos también pierden la relación de fase que existía entre ellos (Caldelas, 2000).

3. Marcapasos y osciladores

Hasta el momento se han identificado estructuras en diferentes especies con el papel de un marcapaso circadiano, por ejemplo, se sabe que la glándula pineal, la retina y el hipotálamo anterior están relacionadas con la generación de ritmos en aves (Gwinner y Brandstätter, 2001). Estructuras en reptiles (*Iguana iguana*) como la retina, la glándula pineal y áreas del hipotálamo funcionan de la misma manera (Bartell *et al.*, 2004). El núcleo supraquiasmático del hipotálamo anterior es considerado como el principal marcapaso en mamíferos (Weaver, 1998).

3.1 El marcapaso circadiano de mamíferos

Diversos experimentos demuestran que el núcleo supraquiasmático (NSQ) es el principal marcapaso identificado en mamíferos. Es el responsable de orquestar la

mayoría de ritmos biológicos que van desde conductuales (Satinoff y Prosser, 1988; Stephan y Zucker, 1972), hormonales (Buijs *et al.*, 1993; Davis y Mannion, 1988; Moore y Eichler, 1972), metabólicos (Reppert y Schwartz, 1984; Schwartz *et al.*, 1983), entre otros.

Los primeros indicios fueron identificados por dos grupos de investigación, los cuales llevaron a cabo lesiones electrolíticas bilaterales del NSQ en ratas adultas; el resultado fue la pérdida del ritmo de actividad locomotora e ingesta de agua (Stephan y Zucker, 1972) y de la pérdida del ritmo en los niveles de corticosterona en sangre (Moore y Eichler, 1972). Investigaciones posteriores revelaron que este tipo de lesiones también abolen ritmos de carácter hormonal (Davis y Mannion, 1988) y reproductivos (Mosko y Moore, 1979a). También se demostró que trasplantes de NSQ fetal a animales adultos arrítmicos previamente lesionados, producían la recuperación de la ritmicidad (Drucker-Colin *et al.*, 1984; Sawaki *et al.*, 1984). Estudios adicionales confirmaron que el NSQ transplantado impone el periodo al organismo hospedero, ya que en hámsters silvestres arrítmicos por lesiones previas al NSQ, trasplantes de tejido fetal de NSQ de hámsters mutantes *tau* (fenotipo que muestra un periodo más corto de actividad locomotora) recuperaron la función rítmica la cual correspondió al fenotipo del NSQ transplantado (Ralph *et al.*, 1990).

Adicionalmente en condiciones *in vitro* el NSQ muestra ciclicidad en su tasa de disparo (Shibata *et al.*, 1982), en la actividad metabólica (Gillette y Reppert, 1987; Shibata y Moore, 1988b), en la liberación de neurotransmisores (Gillette y Reppert, 1987) y en la expresión génica (Abe *et al.*, 2002; Yamazaki *et al.*, 2000). También se ha demostrado que cada célula del NSQ posee la capacidad de generar oscilaciones independientes en su tasa de disparo por varios ciclos (Welsh *et al.*, 1995).

Después de conocer que las células del NSQ son capaces de funcionar como osciladores independientes, se comenzó a indagar sobre las bases de la generación de los ritmos circadianos. La llegada de las herramientas moleculares propiciaron que al final de la década de los 90's se comenzaran a describir las

oscilaciones de algunas proteínas en el NSQ de ratón (Honma *et al.*, 1998). Actualmente se sabe que este fenómeno cíclico esta dado por una compleja expresión e interacción de genes denominados genes reloj, así como de sus productos proteicos (Pegoraro y Tauber, 2011; Takahashi, 1991), los cuales serán mencionadas a mayor detalle en secciones posteriores.

3.2 Anatomía del NSQ

El NSQ es una estructura bilateral ubicada en el hipotálamo anterior, dorsal al quiasma óptico (QO) y lateral al III ventrículo (fig. 3). El NSQ está constituido por neuronas pequeñas de aproximadamente 12 μm de diámetro y consta entre 10,000 a 20,000 neuronas en roedores (Moore y Leak, 2001).

En ratas el NSQ tiene aproximadamente 300 μm de diámetro y se expande caudalmente sobre el QO a nivel del área retroquiasmática, alcanzando una longitud aproximada de 730 μm (Moore y Leak, 2001).

Típicamente el NSQ está dividido en dos subregiones de acuerdo a los dos principales neurotransmisores producidos por las neuronas, la primera corresponde a la región conocida como “core”; esta región se caracteriza por contar con neuronas positivas al péptido intestinal vasoactivo (VIP) y conforma aproximadamente el 24% de la neuronas del NSQ (Moore *et al.*, 2002). La segunda división es conocida como “Shell” en la cual las células producen principalmente vasopresina (VP) y constituye el 37% del total del NSQ (Moore *et al.*, 2002).

Sobre el eje rostro-caudal del NSQ, la distribución de ambas regiones van cambiando conforme su tamaño y morfología. Estas variaciones difieren también entre especies (Morin, 2007). Otros neurotransmisores producidos por el NSQ son, el péptido liberador de la gastrina, péptido histidina isoleucina, sustancia p, calbindina, encefalina, factor liberador de la corticotropina, entre otros (Moore y Leak, 2001; Morin, 2007; van Esseveldt *et al.*, 2000). Esta variedad de neurotransmisores producida en el NSQ sugiere la existencia de una compleja

comunicación intrínseca y extrínseca del NSQ, así como una estructura multioscilaria (Morin, 2007; Welsh *et al.*, 1995), relevante para la coordinación de diversos ritmos (Herzog, 2007).

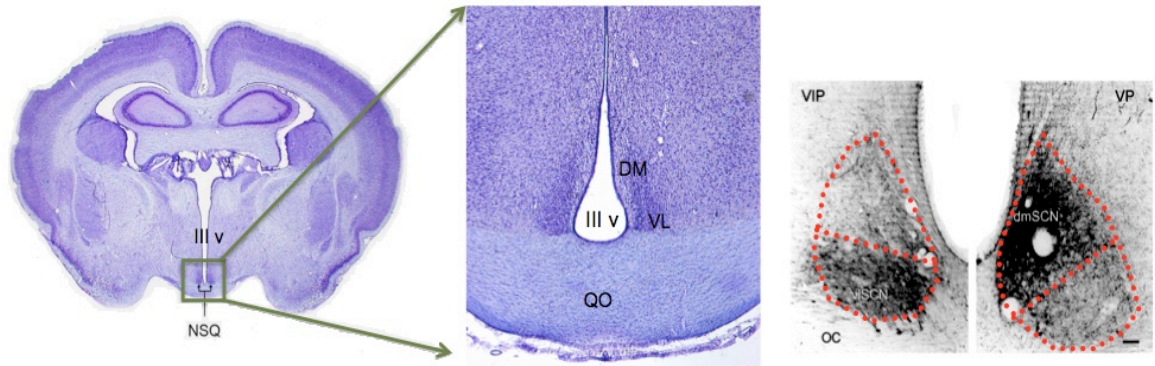


Figura 3. Microfotografías demostrativas de la localización del núcleo supraquiasmático del hipotálamo. Las imágenes izquierda y central pertenecen cortes coronales de tejido cerebral de conejos neonatos a las cuales se les realizó la tinción de Nissl. La fotografía de la derecha pertenece a un NSQ de un roedor, en la cual se representan las neuronas inmuno-positivas al péptido vasoactivo intestinal (VIP) localizadas en la zona ventrolateral, mientras la zona dorsomedial contiene principalmente células inmuno-positivas a vasopresina (VP). QO, Quiasma óptico; DM, región dorsomedial; VL, región ventrolateral y III v, tercer ventrículo. (Esta última fue modificada de van Esseveldt *et al.*, 2000).

El NSQ recibe información del medio ambiente por medio de vías aferentes como el tracto retino-hipotalámico las cuales permiten la sincronización del sistema circadiano (van Esseveldt *et al.*, 2000). Mientras las vías eferentes transmiten la información generada por los osciladores a los demás sistemas por diversas señales de tipo humoral ó eléctricas que a su vez regulan la expresión de diversos procesos rítmicos, a nivel molecular, fisiológico, metabólico o conductual (Herzog, 2007; Roenneberg y Merrow, 2005).

3.3 Vías aferentes

En mamíferos la principal vía aferente por la cual la luz llega al NSQ proviene del tracto retino hipotalámico (TRH) (Aguilar-Roblero y Toledo, 2004; Moore *et al.*, 1995). Esta proyección inicia en las células ganglionares de la retina e inerva la región ventral del NSQ (Berson *et al.*, 2002). Estudios realizados en ratones modificados genéticamente para la carencia de conos y bastones mostraron que esta ruta es totalmente independiente a la vía encargada de la percepción visual, por lo que la degeneración de estos fotorreceptores no tiene efectos en la sincronización por luz (Freedman *et al.*, 1999). Se sabe que dicha vía involucra la participación de neurotransmisores tales como el glutamato y del polipéptido pituitario activador de la adenilato ciclasa (Hannibal, 2002). Adicionalmente otras vías aferentes que participan en modular información fótica y no-fótica, provienen del tracto genículo hipotalámico (TGH) el cual está comprendido por la hojuela intergeniculada (HIG). Los principales neurotransmisores producidos en el TGH son el ácido gamma-aminobutírico (GABA) y el neuropéptido Y (Mrosovsky, 1995). Otras dos vías ampliamente descritas provienen de las fibras serotoninérgicas originadas en el núcleo del rafe dorsal (NDR), el cual tiene proyecciones hacia el NSQ y hacia la HIG, mientras que el rafe medial tiene aferencias hacia el NSQ (Dibner *et al.*, 2010). Mientras tanto, por medio de la melatonina, la glándula pineal también es considerada una vía aferente al NSQ, sin embargo la síntesis de la melatonina está modulada por la actividad del NSQ por medio de la enzima N-acetil-transferasa formando un circuito neuroendocrino entre ambas estructuras (Aguilar-Roblero *et al.*, 2004). La administración de melatonina exógena puede sincronizar el ritmo de la actividad locomotora en roedores bajo oscilación espontánea (Cassone *et al.*, 1986). Sin embargo la administración exógena de esta hormona no tiene efecto sobre la actividad de los hámsters sirios, por lo que se considera que el efecto de la melatonina difiere entre especies, cabe señalar que la sincronización con melatonina en roedores adultos es posible únicamente con dosis superiores a las fisiológicas (revisado en Caldelas *et al.*, 2005).

3.4 Vías eferentes

La función del marcapaso implica la generación y transmisión de la ritmicidad a otros osciladores centrales y periféricos, por lo tanto, las conexiones del NSQ a otras áreas del cerebro son bastante diversas. Las eferencias son altamente densas en la zona subparaventricular y rostralmente en el área preóptica en la base con el núcleo de la estría terminal y el septo lateral. Dorsalmente con el hipotálamo dorsomedial y con el núcleo arcuato. El NSQ también tiene proyecciones al tálamo, las cuales inervan al núcleo paraventricular. Otras proyecciones ya han sido confirmadas en la habénula y la amígdala. Se sabe que aproximadamente el 30% de los axones del NSQ contienen GABA y que también el glutamato presente en los axones transmite señales circadianas a las estructuras hipotalámicas (Dibner *et al.*, 2010).

3.5 Osciladores centrales y periféricos

Existen evidencias que indican que además del NSQ existen otras entidades en el sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP) que generan ritmicidad; de hecho se ha propuesto la existencia de osciladores extra-NSQ los cuales también cuentan con los mecanismos capaces de generar ritmicidad. Abe y colaboradores (2002) realizaron estudios utilizando animales transgénicos caracterizados por emitir bioluminiscencia cuando expresan un gen reloj (el cual será explicado más adelante) al que le fue acoplada en su secuencia promotora el gen reportero de luciferasa (Yamazaki *et al.*, 2000). Con este modelo encontraron que diferentes áreas cerebrales exhibían ritmicidad circadiana *in vitro* tales como la glándula pineal, la glándula pituitaria, el área retroquiasmática, la eminencia media y el bulbo olfatorio, entre otras. Asimismo, Guilding y colaboradores (2009) encontraron que el hipotálamo dorsomedial, el núcleo arcuato, la parte tuberal y la eminencia media también exhiben ritmicidad circadiana.

Las oscilaciones circadianas no solo se limitan al SNC, actualmente se conoce que distintos tejidos como la retina (Tosini y Menaker, 1996), el hígado (Davidson

et al., 2008), el pulmón, el músculo esquelético (Yamazaki *et al.*, 2000), el estómago, riñón, el corazón, el testículo (Nishide *et al.*, 2006), los fibroblastos (Balsalobre *et al.*, 2000a) entre otros tejidos mantienen oscilaciones circadianas. A diferencia del NSQ, estos osciladores periféricos necesitan de las señales regulatorias del marcapaso (Guo *et al.*, 2006) o en condiciones *in vitro*, recambios de medio de cultivo son necesarios para que el oscilador pueda reiniciar y continuar su ciclicidad (Balsalobre *et al.*, 2000b; Davidson *et al.*, 2008; Nishide *et al.*, 2006; Yamazaki *et al.*, 2000).

4. Bases moleculares de los ritmos circadianos

El mecanismo molecular que genera oscilaciones autosostenidas en el NSQ, involucra una asa de transcripción-traducción autorregulada cuya duración es cercana a 24 horas, la cual consta de asas positivas y negativas (fig. 4). En esta los factores de transcripción CLOCK y BMAL1, forman un heterodímero (CLOCK:BMAL1) y se unen a la caja E de los promotores de los genes de las familias *Periodo* (*Per1*, *Per2*, *Per3*) y *Criptocromo* (*Cry1* y *Cry2*) entre otros, para activar su transcripción, posteriormente sus productos proteicos son traducidos en el citoplasma (Borgs *et al.*, 2009). La asa negativa esta integrada por el heterodímero PER:CRY, el cual después de traducirse y unirse en el citoplasma es fosforilado por la enzima caseína cinasa 1 épsilon (CK1 ϵ) o delta (CK1 δ), posteriormente este heterodímero se trasloca al núcleo para reprimir su propia transcripción actuando sobre el complejo CLOCK:BMAL1 (Ko y Takahashi, 2006). Por otra parte existe otra asa involucrada en la generación y regulación circadiana, la cual también incluye al heterodímero CLOCK:BMAL1 el cual activa la transcripción de los genes *Rev-erba* y *Rora*, estos son capaces de regular la expresión de *Bmal1*, activándola por medio de las proteínas ROR o reprimiéndola las proteínas REV-ERB (Guillaumond *et al.*, 2005). Por otra parte, se sugiere que algunos genes controlados por el reloj (*Ccg*) están modulados directamente por

los procesos de auto regulación de CLOCK:BMAL1 en el NSQ, y la expresión de estos son los que producen los eventos rítmicos tales como la secreción rítmica de la arginina vasopresina presente en las neuronas del NSQ (Balsalobre, 2002).

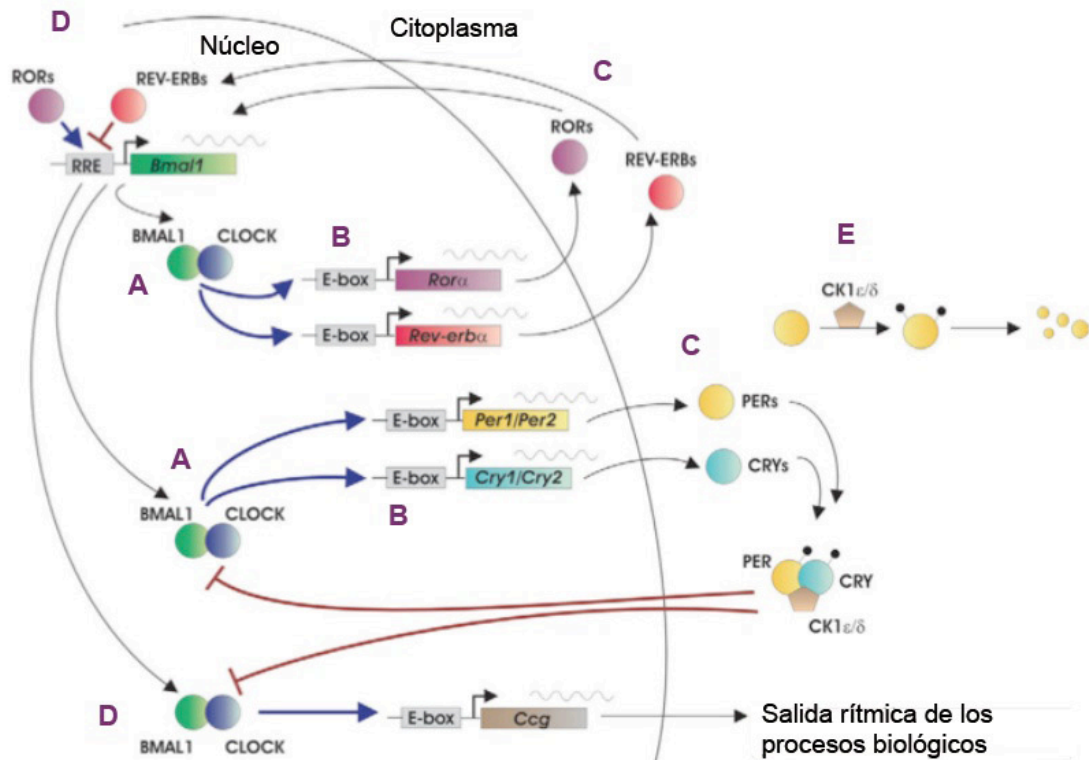


Figura 4. Esquema del asa de retroalimentación molecular que ocurre en las neuronas del NSQ. A) Los factores de transcripción BMAL1-CLOCK se dimerizan. B) Este dímero se une a la región promotora de la caja E de los genes *Per1*, *Cry1*, *Rora*, *Rev-Erb α* y los genes *Ccg* (genes controlados por el reloj). En el citoplasma los productos proteicos PERs, CRY, RORs y REV-ERBs siguen dos vías: C) las proteínas PERs y CRYs forman un complejo con la enzima CK1 ϵ/δ y se trasloca al núcleo; de manera similar las proteínas RORs y REV-ERBs ingresan al núcleo. D) En el núcleo de la célula, RORs se une al promotor RRE y activa la transcripción del gen *Bmal1*, por otro lado la proteína REV-ERBs inhiben la transcripción de *Bmal1*. Mientras que al mismo tiempo el dímero PER-CRY, evita la actividad transcripcional de CLOCK-BMAL1. E) Las proteínas PERs que no son dimerizadas con las proteínas CRYs, son fosforiladas por la enzima CK1 ϵ/δ . Imagen modificada de Ko y Takahashi, 2006.

Actualmente se conoce que las mutaciones de alguno de estos genes tienen generalmente un efecto sobre la expresión rítmica, por ejemplo, la mutación alélica del gen *Clock* en ratones confiere un alargamiento del periodo llegando a mostrar arritmicidad bajo condiciones de oscuridad continua (Vitaterna *et al.*, 1994). En roedores la carencia simultánea de los genes *Per1* y *Per2*, (o de *Cry1* y *Cry2*) causa un arritmicidad a nivel molecular y de comportamiento (Ko y Takahashi, 2006). Experimentos con ratones carentes de la expresión del gen *Per1* mostraron un acortamiento en el periodo en oscilación espontánea entre 0.5 a 1 hora, mientras que para ratones carentes del gen *Per2* el periodo se acortó ~1.5 h en las mismas condiciones (Bae *et al.*, 2001). De manera similar ratones deficientes en el gen *Cry1* muestran un acortamiento en su periodo en oscilación espontánea de ~1 hora. En contraste ratones sin el gen *Cry2* muestran un alargamiento en su periodo de ~1 hora bajo condiciones constantes en comparación con los animales silvestres (van der Horst *et al.*, 1999). Por último se conoce que las enzimas CK1 ϵ y CK1 δ son factores críticos que regulan las proteínas en turno. Mutaciones en cualquiera de estas alteran la actividad enzimática y causan el acortamiento en el periodo en mamíferos (Ko y Takahashi, 2006), inclusive en humanos generando el síndrome de avance de fase del sueño (Xu *et al.*, 2005).

5. Desarrollo de los ritmos circadianos en mamíferos

Existen varias interrogantes en la comprensión del desarrollo de los ritmos circadianos, una de ellas es identificar ¿cuál o cuáles son las primeras estructuras oscilatorias del organismo en desarrollarse?, por consiguiente ¿cuál es el momento y bajo qué características estas entidades son capaces de generar ritmicidad?, a su vez también es de suma importancia establecer el momento en que el patrón de expresión circadiano de un organismo en desarrollo es comparable con el de un adulto. A continuación se explicará brevemente el desarrollo de algunos de los factores y mecanismos implicados en la generación

de la ritmicidad circadiana de animales en etapas prenatales y postnatales tempranas.

5.1 Desarrollo del NSQ

El desarrollo del NSQ ha sido ampliamente estudiado en roedores, particularmente en la rata. Entre los días embrionario (E) 14 y E15, el NSQ y otras áreas hipotalámicas se forman a partir de la migración de células del epitelio germinal diencefálico ventral, hacia la región ventral de lo que será el NSQ. Posteriormente, entre los días E16-E17 otro grupo de neuronas migran hacia la región dorsal del NSQ, formando la región dorsomedial (Altman y Bayer, 1978). La neurogénesis en el NSQ concluye alrededor del día E18, en este momento el núcleo aumenta su tamaño casi tres veces y su volumen se incrementa hasta nueve veces, paralelamente el desarrollo de la red sináptica es gradual hasta el día E21, aumentando rápidamente durante los días postnatales (P) 3 al día P10, posteriormente el desarrollo de la red sináptica continúa lentamente hasta el estado adulto (Moore y Bernstein, 1989).

5.2 Desarrollo de la ritmicidad endógena

En fetos de ratas de 19 y 20 días de gestación se ha demostrado que el NSQ exhibe un claro ritmo circadiano en la actividad metabólica (Reppert y Schwartz, 1984), teniendo su acrofase en el día subjetivo. Estudios *in vitro* de NSQ fetal elaborados por Shibata y Moore (1987) demostraron que en el día E22 la tasa de disparo exhibe un patrón circadiano de baja amplitud, la cual se va incrementando conforme pasan los días, así mismo, encontraron que la acrofase de la actividad eléctrica exhibe similitudes en la actividad metabólica reportada por Reppert y Schwartz (1984). A nivel molecular, Sládek y colaboradores (2004), demostraron que el NSQ de ratas en el día E19 la expresión de los genes *Per1*, *Per2*, *Cry1* y *Bmal1* ya es evidente, sin embargo, se requieren varios días para que se consolide la expresión circadiana de los mismos. Por el contrario, datos publicados

por Ohta y colaboradores (2003) encontraron que el NSQ fetal de ratas, presenta ritmicidad *in vitro* a partir del día E20, las diferencias reportadas entre ambos estudios posiblemente se deben a la metodología empleada.

Para discernir si las oscilaciones halladas en el NSQ fetal tenían un origen endógeno y no fueran producto de la madre, se realizaron diversos estudios; el realizado por Shibata y Moore (1988a), donde reportó que la actividad metabólica del NSQ, tanto de los fetos, como de las hembras intactas mantenidas en L:L, manifestaron un patrón rítmico, en contraste, la actividad del NSQ de los fetos de hembras con lesiones del NSQ aparentemente mostraron arritmicidad. Sin embargo, los autores sugieren que esta aparente arritmicidad era causada por la desincronización entre los fetos y la ausencia de señales rítmicas por parte de la madre. Otro experimento que refuerza esta hipótesis fue el que llevaron a cabo Jud y Albrecht (2006), donde ratones hembras doble mutantes carentes de $mPer1^{Brdm1} / mPer2^{Brdm2}$ y $mPer2^{Brdm1} / Cry1^{-/-}$, característicos por mostrar arritmicidad en su actividad locomotora fueron apareados con machos silvestres; a las crías de estas cruza les fue medida su actividad locomotora a las 7 semanas de edad de manera individual y en condiciones de oscuridad constante la cual fue comparada con la actividad locomotora de la madre y el padre mantenidos en ciclo L:O. Con lo que encontraron que las crías heterocigotas mostraron una oscilación espontánea para la actividad locomotora aunque con un τ más corto en comparación con las crías provenientes de madre y padre cepa silvestre, mientras que las madres no mostraron ritmicidad en su actividad a lo largo del experimento. Por lo que concluyeron que el NSQ de las crías heterocigotas es capaz de generar su propia ritmicidad desde etapas prenatales independientemente de la funcionalidad del sistema circadiano de la madre.

6. Sincronización a edades tempranas del desarrollo

En los mamíferos en desarrollo, en particular animales altriciales, la sincronización materna resulta de gran relevancia para su óptimo desarrollo y supervivencia. Como ya se mencionó, la luz es la principal señal sincronizadora en la mayoría de los mamíferos y tiene la capacidad de regularizar el funcionamiento de las neuronas del NSQ. En el caso de los fetos y neonatos altriciales esta situación es diferente (Ohta *et al.*, 2008), debido a que el sistema circadiano aún no se encuentra totalmente maduro, de hecho el desarrollo de TRH ocurre durante etapas postnatales por lo que estos dependen de otras vías no-fóticas para ajustar sus osciladores endógenos al tiempo geofísico, tales como el olfato en mamíferos macrosmáticos (Granados-Fuentes *et al.*, 2011; Granados-Fuentes *et al.*, 2004b), o bien, señales que tienen lugar durante el momento de amamantamiento tales como los cambios de la temperatura (Jilge *et al.*, 2001), la ingesta de la leche (Meza *et al.*, 2008), la restricción materna (Ohta *et al.*, 2003), entre otros.

El NSQ de los animales en desarrollo en particular de roedores puede sincronizarse a señales maternas desde que este se encuentra en el útero, aunque aún se desconocen los mecanismos por los cuales se logra este fenómeno (Reppert y Schwartz, 1986). La madre genera las primeras señales cíclicas que recibe el feto y tienen una influencia sobre el sistema circadiano de este, así lo demuestran experimentos realizados en hembras de hámsters gestantes a las cuales les fue lesionado el NSQ y durante la gestación cada 12 horas recibieron una inyección de aceite y 12 horas después una de melatonina. Al nacer las crías permanecieron con la madre hasta a los 21 días, edad donde fueron destetadas y separadas individualmente para evaluar el inicio de la actividad locomotora con el empleo de una rueda de actividad y compararla con el inicio de la actividad de la madre, en los cuales ambos fueron mantenidos en oscuridad continua. El resultado fue que el inicio de actividad de las crías fue similar al inicio de actividad de las madres con NSQ lesionado que recibieron

inyecciones de melatonina. Este trabajo demostró que las señales maternas (melatonina) influyen sobre el sistema circadiano del feto (Davis y Mannion, 1988). Estudios con técnicas moleculares realizados por Ohta y colaboradores (2003), demuestran que desde el día E20 a P6 el patrón de expresión de los genes *Per1* y *Per2* en el NSQ de ratas mantienen una relación de fase con respecto al horario en el que las crías tuvieron acceso a la madre. Estos trabajos revelan que las señales maternas desempeñan un papel importante en etapas tempranas de la ontogenia y que tienen una influencia en la expresión de los ritmos circadianos de animales en desarrollo.

Estudios adicionales de nuestro grupo de trabajo demuestran por medio de hibridación *in situ* que la maduración de la maquinaria molecular de los genes *Per1*, *Bmal1* y *Cry1* presentes en el bulbo olfatorio de conejos neonatos y juveniles se consolida de manera rítmica antes que los patrones de expresión presentes en el NSQ (Montúfar-Chaveznava *et al.*, 2012). Estos trabajos nos sugieren que el desarrollo y maduración del sistema circadiano en animales neonatos altriciales se lleva de manera gradual y heterocrónica para cada uno de los elementos moleculares.

Es claro que la maquinaria molecular presente en el NSQ de mamíferos en desarrollo es sincronizable a señales cíclicas maternas, paralelamente algunos trabajos abordaron el efecto que tienen estas señales cíclicas maternas en el desarrollo y expresión de los ritmos en los osciladores periféricos. Ohta y colaboradores (2003) encontraron que la presencia materna además de sincronizar la fase de expresión de los genes *Per1* y *Per2*, a nivel central, también es capaz de reiniciar la maquinaria molecular en osciladores extra-NSQ, tales como el hipocampo y en el núcleo paraventricular hipotalámico. A nivel periférico se ha encontrado que en el hígado la expresión de los genes *Per1* y *Rev-erb α* ya se encuentra presente desde el día E20, sin embargo, la fase de expresión de *Rev-erb α* se ajusta hasta el día P10, adquiriendo un patrón similar al de adultos. De igual manera, el patrón temporal de *Per1* exhibe estrechas similitudes al patrón de expresión de los adultos desde el día P10 (Sumová *et al.*, 2008). Toda esta

evidencia indica que a edades tempranas del desarrollo, el sistema circadiano presenta las características neuroanatómicas y fisiológicas para sincronizarse y responder paulatinamente de manera adecuada a las señales cíclicas externas tal como sucede en los animales adultos.

7. El conejo europeo como un modelo natural de sincronización durante el desarrollo

Las características biológicas del conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*) ofrece un modelo natural para el estudio de la ritmicidad circadiana en etapas tempranas del desarrollo. En la naturaleza, la hembra elabora un nido con forraje y pelo que se desprende de su vientre y flancos 2 a 3 días antes de parir. Una vez que pare la hembra, abandona su madriguera cubriendo la entrada y sólo retorna una vez al día para alimentar a sus crías durante un lapso de 3 a 5 min (Zarrow *et al.*, 1965). Por otra parte al momento del nacimiento, los neonatos nacen con los párpados y canales auditivos cerrados, adicionalmente la madriguera está aislada de señales cíclicas ambientales. Por lo que resulta de suma importancia que el sistema circadiano de los neonatos funcione adecuadamente de tal forma que les permita anticipar la llegada de la madre para alimentarse en el corto lapso que tiene la visita de la hembra lactante (Hudson y Distel, 1982). Esta relación madre-cría y el repertorio conductual de estos persiste en condiciones de cautiverio, sin alterarse por algún tipo de manejo (Hudson y Distel, 1982; Jilge y Hudson, 2001).

Se sabe que desde los primeros días de vida, los conejos neonatos anticipan el momento de la llegada de la madre (Caldelas *et al.*, 2007; Hudson y Distel, 1982; Jilge *et al.*, 2001) lo cual es un claro indicador de que el sistema circadiano es funcional en esta etapa del desarrollo.

Estudios realizados en edades tempranas en esta especie han demostrado que el proceso del amantamiento funciona como un sincronizador no-fótico a nivel de NSQ (Caldelas *et al.*, 2005) siendo este capaz de modificar la expresión de los

genes *Per1*, *Per2* y *Bmal1* a un cambio de horario de amantamiento (Caldelas *et al.*, 2009). Estos experimentos sugieren que el proceso de amantamiento puede sincronizar al sistema circadiano de los neonatos posiblemente con la participación de una o varias señales presentes en el proceso, tales como el contacto de la madre con la cría, lo cual involucra la temperatura, presión táctil de la piel y el pezón, (revisado en Caldelas *et al.*, 2005) o la feromona 2-metilbut-2-enal presente en la leche materna de conejos (Schaal *et al.*, 2003), entre otras señales.

Por otra parte se conoce que en neonatos la sincronización al evento de amantamiento produce oscilaciones rítmicas a nivel fisiológico (Jilge y Hudson, 2001; Jilge *et al.*, 2000; Trejo-Muñoz *et al.*, 2012), endocrino (Escobar *et al.*, 2000; Rovirosa *et al.*, 2005), conductual (Trejo-Muñoz *et al.*, 2012) y molecular (Caldelas *et al.*, 2009; Caldelas *et al.*, 2007).

Más sorprendentemente es, que esta ciclicidad se mantiene bajo condiciones de ayuno después de varios ciclos, lo que corrobora la participación del sistema circadiano en la regulación temporal de procesos vitales en conejos neonatos (Caldelas *et al.*, 2009; Jilge y Hudson, 2001; Jilge *et al.*, 2000; Trejo-Muñoz *et al.*, 2012).

7.1 Expresión rítmica de la temperatura corporal y actividad locomotora

Jilge y colaboradores (2001) caracterizaron el ritmo de temperatura corporal (T_c) en conejos neonatos mantenidos en L:L y amamantados cada 24 horas desde el día P4 al P28 de edad. En dicho trabajo reportan tres componentes característicos del ritmo de temperatura corporal (fig. 5):

1. **Aumento anticipatorio al amantamiento:** la temperatura corporal muestra un incremento de aproximadamente 0.4-0.6 °C por encima de la temperatura media entre 3 a 4 horas antes de la llegada de la madre.
2. **Pico de temperatura:** la máxima temperatura corporal tiene lugar durante el momento en que el animal está siendo amamantado, esta se

incrementa en promedio de 0.3-0.6 °C.

3. **Postprandio:** momentos después que el animal termina de consumir la leche, el patrón de la temperatura sufre un decremento entre 1.2-1.5 °C y permanece baja por alrededor de 3 a 5 horas.

Por otra parte al ser sometidos los conejos neonatos a restricción materna de 48 horas (Jilge *et al.*, 2000) y 72 horas (Jilge *et al.*, 2001), se encontró que durante el primer ciclo de restricción materna, el aumento anticipatorio al amamantamiento en la Tc se prolonga por alrededor de 5 a 7 horas y no ocurre el aumento de temperatura correspondiente al pico de ingesta de alimento ni tampoco la disminución abrupta de temperatura característica del postprandio. Posteriormente, la temperatura va decreméntándose hasta alcanzar el promedio del día. Durante el segundo ciclo de ayuno, se repite el mismo patrón con la diferencia de que el componente anticipatorio es de menor amplitud. La persistencia del componente anticipatorio durante la restricción materna es un claro indicador que está siendo generado y modulado por el sistema circadiano de manera endógena. Mientras que el pico de temperatura y el postprandio están asociados al evento del amamantamiento, por lo que no son considerados como parte de un proceso circadiano (Jilge *et al.*, 2000; 2001; Trejo-Muñoz *et al.*, 2012).

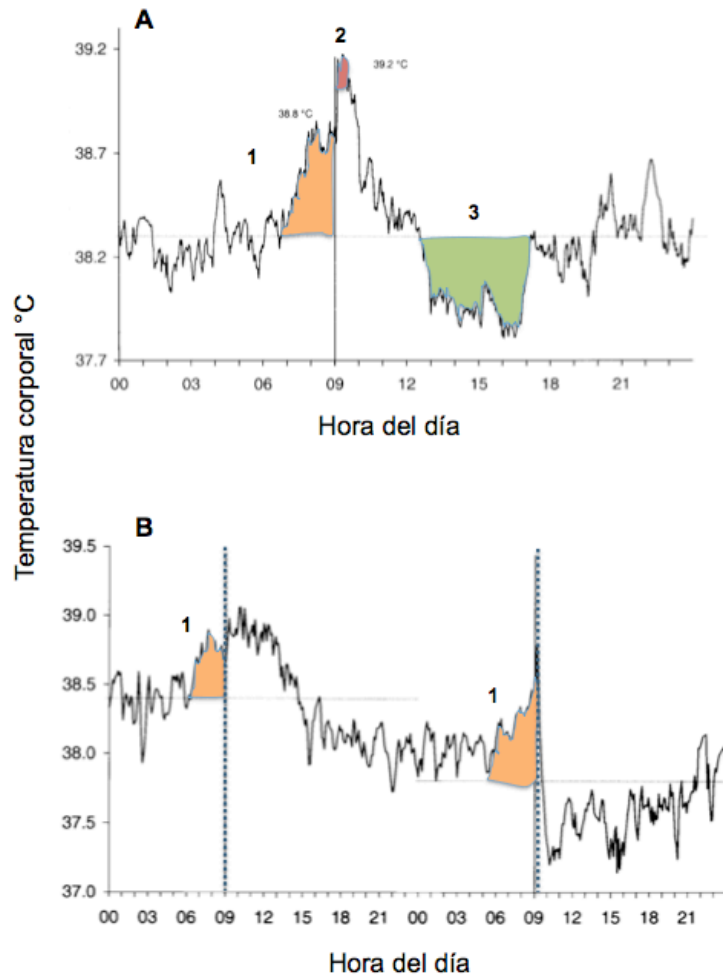


Figura 5. Patrones temporales de temperatura corporal de conejos en condiciones normales (A) y en ayuno de 48 h (B). En la gráfica A se pueden observar los componentes presentes, antes, durante y después del amamantamiento. El número 1, representa el aumento anticipatorio al alimento el cual se eleva por encima de la media horas antes de arribo de la madre. En el número 2, esquematiza el pico de ingesta de alimento y corresponde al momento en que el neonato es alimentado. El número 3, se refiere al periodo postprandio e indica a la disminución de la temperatura por un lapso importante de tiempo después de comer. En la gráfica B las líneas verticales punteadas indican el horario en que el amamantamiento fue omitido, como se puede observar el patrón carece de los componentes 2 y 3 presentes en la gráfica A. Lo cual indica que el único componente producido endógenamente es el aumento anticipatorio del amamantamiento. Imagen modificada de Jilge *et al.*, 2000.

Respecto a la actividad locomotora los conejos neonatos muestran un claro patrón de actividad anticipatoria a la llegada de la madre lactante (Caba *et al.*, 2008; Caldelas *et al.*, 2009; Jilge, 1995; Trejo-Muñoz *et al.*, 2012). En el primer trabajo, dos grupos de neonatos fueron mantenidos en oscuridad continua, sin embargo, las hembras lactantes fueron colocadas en ciclo L:O, un grupo de neonatos fueron amamantados durante la noche subjetiva mientras el grupo restante en el día subjetivo. En ambos grupos de animales fue reportada una evidente actividad anticipatoria en la actividad locomotora horas antes de la llegada de la hembra lactante. Es importante señalar que la actividad anticipatoria de los neonatos en los experimentos realizados por Jilge (1995) y Caba (2008) fueron hechos grupalmente. A diferencia del estudio publicado por Trejo-Muñoz y colaboradores (2012) donde el análisis de actividad anticipatoria de cada animal fue realizado individualmente y junto con el desarrollo de un análisis matemático más específico, se dió a conocer que el patrón circadiano de la anticipación al amamantamiento en actividad locomotora y temperatura corporal inicia 2 horas previas al arribo la coneja lactante. Además muestra como este evento se consolida alrededor de día P5 y este permanece durante dos ciclos continuos en ausencia de la señal sincronizadora. Esta serie de trabajos demuestran que el conejo neonato es hasta el momento el único modelo animal en presentar anticipación en la temperatura corporal y actividad locomotora ante las señales maternas. En el neonato ambos procesos son modulados por el sistema circadiano, dicho modelo otorga ventajas para investigar de manera natural y poco invasiva cuál o cuáles son los mecanismos involucrados en la generación y respuesta ante una señal compleja no-fótica como lo es el amantamiento.

8. Lesiones de NSQ

A lo largo del tiempo se han realizado diversos estudios para establecer el efecto de las lesiones de NSQ sobre la expresión de diferentes variables en otras especies tales como, la rata (Aguilar-Roblero *et al.*, 1992; Clarke y Coleman, 1986; Drucker-Colin *et al.*, 1984; Moore y Eichler, 1972; Stephan y Zucker, 1972), el ratón (Marchant y Mistlberger, 1997; Moriya *et al.*, 2009), el hámster (Refinetti *et al.*, 1994) y el mono ardilla (Fuller *et al.*, 1981), sin embargo, cabe destacar que prácticamente casi todos los estudios publicados a la fecha, han sido realizados en animales adultos.

Desde los primeros estudios realizados a principios de los años 70's, las lesiones de NSQ han sido una estrategia muy recurrida con la que tanto Moore y Eischler (1972), como Stephan y Zucker (1972) evidenciaron que ritmos conductuales y hormonales perdían su organización temporal característica a consecuencia de la lesión de esta estructura hipotalámica.

Estos datos fueron confirmados por estudios posteriores por Fuller y colaboradores (1981) donde lesiones bilaterales del NSQ de monos ardilla no modificaron el patrón de expresión de la temperatura corporal, mientras que el ritmo de ingesta de agua se perdió cuando los animales fueron mantenidos en L:L. En contraste, Eastman y colaboradores (1984) reportaron que tanto el ritmo de sueño-vigilia y la temperatura rítmica cerebral son eliminados por lesiones de NSQ en ratas alojadas en L:L, mientras que animales con lesiones parciales mostraron una débil oscilación espontánea para ambos ritmos en condiciones similares, un número limitado de estos mostraron una recuperación total en la expresión de parámetros rítmicos. De forma similar, Refinetti y colaboradores (1994) demostraron que las lesiones totales de NSQ de hámsters mantenidos en condiciones constantes de L:L ó O:O producían pérdida de la ritmicidad a nivel conductual y de la temperatura corporal. En contraste, existen reportes en la literatura de trabajos realizados en ratas, en los que la ritmicidad en la temperatura corporal persiste a pesar de haber sido eliminado el NSQ y en algunos casos,

encontraron la eliminación total del ritmo de ingesta de agua (Satinoff y Prosser, 1988). Dichos estudios ponen en evidencia la controversia que existe sobre el efecto que tienen las lesiones totales de NSQ sobre la regulación rítmica de la temperatura corporal. El control de temperatura es una variable fisiológica compleja, que no solo involucra la regulación de núcleos cerebrales (Saper *et al.*, 2005), sino también la participación de órganos periféricos (Refinetti y Menaker, 1992).

Cabe señalar también que diversas aproximaciones evaluaron el efecto de las lesiones totales del NSQ y la administración restringida de alimento sobre la organización temporal de roedores. Krieger y colaboradores (1977) sometieron a ratas lesionadas a un programa de restricción de alimento en donde las ratas tenían acceso a este durante 2 horas en la fase luminosa encontrando que el ritmo de temperatura corporal persiste a pesar de la lesión del NSQ, aún más, en este parámetro fue evidente el incremento horas antes del acceso al alimento mostrando un claro componente anticipatorio a este. Posteriormente fue corroborado en múltiples experimentos en roedores adultos que la actividad anticipatoria al alimento (AAA) es un fenómeno que no depende de la integridad del NSQ (Stephan, 2002).

8.1 Lesiones del NSQ en animales neonatos

Existen escasos trabajos en los que se ha explorado el efecto de las lesiones del NSQ en etapas tempranas del desarrollo (Mosko y Moore, 1978; 1979a; 1979b; 1979c). Dichos estudios fueron realizados en ratas de 2 días de edad, con la finalidad de establecer si el NSQ y el hipotálamo adyacente tenían la capacidad de mostrar fenómenos plásticos que llevaran a la regeneración de la función rítmica, sin embargo, encontraron que las ratas exhibían la pérdida de la ritmicidad tanto en la actividad locomotora, la ingesta de agua, así como alteraciones en el ciclo estral en hembras. Adicionalmente, no fueron encontrados indicios de regeneración neuronal en la zona lesionada. Posteriormente estos mismos autores

mediante infiltraciones de prolina radioactiva [³H] en el ojo de ratas de 25 días de edad con lesiones totales de NSQ realizadas a los 2 días de edad, encontraron que la lesión no tiene efecto sobre el desarrollo postnatal de las fibras del tracto retino hipotalámico, sin embargo, sí encontraron alteraciones en la formación de estas fibras en animales con lesiones unilaterales (Mosko y Moore, 1979c). Resultados que sugieren que la formación de las proyecciones del TRH dependen del tamaño y localización del NSQ no dañado. En esta serie de cuatro estudios descubrieron que la lesión de NSQ a edades tempranas del desarrollo tuvo un efecto irreversible sobre la expresión de la actividad locomotora, ingesta de agua y ciclo estral.

8.2 Sincronización por alimento en roedores adultos

Dentro de la cronobiología en muchos mamíferos, incluidos los roedores de laboratorio, la variación en la porción y la frecuencia de las comidas puede ser explicada de acuerdo a la hora del día, de forma más precisa a la hora biológica. (Rosenwasser *et al.*, 1981).

La restricción diaria de alimento tiene una propiedad muy interesante sobre el funcionamiento del sistema circadiano, ya que esta actúa como un estímulo sincronizador no-fótico (Mistlberger, 2011).

El fenómeno anticipatorio es una característica adaptativa vital y relevante para el organismo, puede ser considerado como un proceso de respuesta basado en los cambios predictivos del entorno (Antle y Silver, 2009). La restricción diaria de alimento dentro de una ventana de tiempo desencadena una respuesta compleja del organismo conocida como AAA, la cual se caracteriza por el incremento en diversos parámetros cercanos al acceso al alimento como lo son: cambios metabólicos (aumento de la actividad enzimática de la glucógeno sintetasa y fosforilasa, tirosina transaminasa además de otras), hormonales (incremento en suero de corticosterona, prolactina, insulina, adrenocorticotropina entre otras), fisiológicas (incremento de la temperatura corporal, consumo de oxígeno, emisión

de bióxido de carbono entre otras) y conductuales (incremento de la actividad locomotora, ingesta de agua) sólo por mencionar algunas (revisado en Boulos y Terman, 1980).

Evidencias experimentales demuestran que para que se genere el fenómeno de la AAA, el alimento debe ser presentado dentro de un rango determinado de tiempo, por lo regular el sistema necesita de 2 a 4 horas de acceso al alimento para que el organismo produzca este fenómeno (Mistlberger, 2009). Sin embargo estudios realizados por Stephan y Becker (1989) mencionan que la AAA puede presentarse en restricciones de 4 a 10 horas y puede perderse en un rango de 12 horas.

Bajo estas condiciones, el acceso restringido al alimento conlleva al organismo a una serie de cambios anticipatorios que van desde niveles metabólicos (Díaz-Muñoz *et al.*, 2000; Escobar *et al.*, 1998), conductuales (Stephan, 1992), hormonales (Krieger y Hauser, 1978; LeSauter *et al.*, 2009) y fisiológicos como el aumento de la temperatura corporal (Boulamery-Velly *et al.*, 2005; Caldelas *et al.*, 2009; Trejo-Muñoz *et al.*, 2012), entre otros.

La AAA es una respuesta compleja que se regula periódicamente, la cual actualmente se sugiere que involucra a más de un oscilador circadiano. Esta hipótesis resulta de diversos estudios donde la restricción de alimento tiene un efecto sincronizador sobre la expresión rítmica de genes como *Per1* y *Per2* en zonas cerebrales tales como el hipotálamo dorsomedial (Mieda *et al.*, 2006), el hipocampo, la corteza cerebral (Wakamatsu *et al.*, 2001), el núcleo acumbens, el septo lateral, la corteza prefrontal (Angeles-Castellanos *et al.*, 2007) entre otras estructuras centrales. Sin embargo, otros trabajos también demuestran que en osciladores periféricos tales como el hígado y pulmón la restricción de alimento es capaz de modular la expresión de los genes *Per1* (Stokkan *et al.*, 2001). Damiola y colaboradores (2000) mostraron que esta restricción modula la fase de expresión de los genes *Per1*, *Per2*, *Per3* y *Cry1* en el hígado de ratas adultas cuya sincronización ocurre de forma más rápida en comparación de otros órganos tales como el riñón, páncreas y corazón.

Toda esta evidencia hizo suponer la existencia de un oscilador anatómico específico para el alimento, el cual se denominó oscilador sincronizado por alimento (OSA) (Stephan, 2002). Por ello, para localizar el OSA se comenzaron a realizar experimentos lesionando estructuras cerebrales tales como el núcleo dorsomedial del hipotálamo (Landry *et al.*, 2006; Moriya *et al.*, 2009), el núcleo ventromedial del hipotálamo (Mistlberger y Rechtschaffen, 1984), el núcleo paraventricular talámico (Landry *et al.*, 2007), por mencionar algunas. Sin embargo, el resultado de estas lesiones no eliminó el fenómeno anticipatorio. Por lo que a la fecha no se ha podido identificar a un sustrato neuroanatómico que regule dicho fenómeno. Actualmente existen varias hipótesis que proponen que la AAA está generada por la interacción entre osciladores periféricos y centrales (Escobar *et al.*, 2009). Un trabajo reciente publicado por Acosta-Galvan y colaboradores (2011) demostraron que la interacción entre el NSQ y el núcleo dorsomedial del hipotálamo conforman una comunicación entre ambas estructuras modulando la AAA al alimento de la actividad locomotora. La conclusión de este trabajo se logró mediante lesiones del núcleo dorsomedial de ratas adultas, en las cuales se utilizó ácido caínico como un mecanismo alternativo a la lesión electrolítica, permitiendo así explicar la controversia que existe entre diversos trabajos sobre la participación del núcleo dorsal del hipotálamo en la generación de la AAA (Moriya *et al.*, 2009).

Sorprendentemente la restricción de alimento no tiene un efecto sobre el patrón de expresión de los genes *Per1* y *Per2* en el NSQ (Damiola *et al.*, 2000; Stokkan *et al.*, 2001). Así lo demuestran estudios con ratas transgénicas las cuales fueron sometidas a un régimen de alimentación restringida durante la fase luminosa del ciclo, en las cuales se evaluó la expresión del gen *Per1* en explantes de NSQ, donde encontraron claras similitudes en la fase de expresión de *Per1* tanto en animales restringidos como *ad libitum*. En contraste, la fase de expresión hallada en el hígado en los animales *ad libitum* ocurrió en el último tercio de la fase de oscuridad mientras que la fase en los animales con alimentación restringida sucedió durante la fase de luz, al final de la presentación del alimento (Stokkan *et*

al., 2001). Por otra parte Wakamatsu y colaboradores (2001) usando hibridación *in situ* mostraron que las fases de expresión de los genes *Per1* y *Per2* en corteza cerebral e hipocampo, fueron sincronizadas al momento de acceso al alimento tanto en la fase luminosa del ciclo L:O como en oscuridad continua (O:O), mientras que las fases de los genes mencionados en el NSQ en los grupos de animales *ad libitum* y restringidos no tuvieron cambios tanto en L:O como en O:O. Esta evidencia indica que el acceso restringido al alimento no tiene un efecto sobre la expresión génica del marcapaso circadiano.

Adicionalmente, trabajos realizados en roedores adultos con lesiones completas de NSQ, evidenciaron que esta estructura no es necesaria para la generación y control de la AAA, debido a que la ritmicidad en los niveles plasmáticos de cortisol permanecen sincronizados al momento del acceso al alimento en la fase de luz (Krieger *et al.*, 1977), así como la actividad locomotora (Clarke y Coleman, 1986). Con lo que se constató que el fenómeno anticipatorio no depende de la integridad del NSQ.

En la actualidad, existe una gran variedad de experimentos donde se ha investigado cuáles son los mecanismos de anticipación a diversas señales cíclicas, sin embargo, la mayoría de trabajos han sido realizados en roedores adultos. Debido a las características con las que nacen los mamíferos altriciales se desconoce si estos neonatos poseen la capacidad de la anticipación a etapas tempranas del desarrollo; y en el caso que la tengan, surge la pregunta de cuál o cuáles son los mecanismos con los que estos mamíferos detectan, procesan, generan y exhiben los eventos rítmicos que ya se conocen en un animal adulto.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad se desconoce si la expresión de la ritmicidad a nivel fisiológico (temperatura corporal) y conductual (actividad locomotora) durante etapas tempranas del desarrollo, en particular en etapas pre-visuales, dependen de la integridad del NSQ. Por lo que el presente estudio está encaminado a establecer la relevancia de esta estructura hipotalámica en la organización temporal de los conejos neonatos.

III. HIPÓTESIS

En conejos neonatos la capacidad de estimar el paso del tiempo es independiente de la integridad del NSQ, por lo que las lesiones electrolíticas bilaterales de esta estructura hipotalámica, carecerán de efecto sobre la regulación temporal de los patrones de actividad locomotora y de temperatura corporal.

IV. OBJETIVOS

4. Objetivo general

- Establecer cuál es la participación del NSQ en la generación de la ritmicidad circadiana de la temperatura corporal y actividad locomotora de conejos en desarrollo, mantenidos bajo condiciones de luz continua amamantados cada 24 h y bajo alimentación sólida controlada..

4.1 Objetivos particulares

- Caracterizar el patrón temporal de la temperatura corporal y la actividad locomotora en conejos intactos (Con), con lesiones falsas (Sham) y con lesiones de NSQ (Lx-NSQ) bajo las siguientes condiciones:
 1. Ante cambios de fase de la señal sincronizadora,
 2. En la ausencia de la señal sincronizadora (amamantamiento),
 3. En la transición a alimentación sólida.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5. Condiciones de alojamiento

El presente trabajo se realizó en el Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Las conejas reproductoras fueron alojadas en jaulas individuales (120 cm de largo x 60 cm de ancho x 45 cm de altura), bajo un ciclo de luz-oscuridad de 16:8 (encendido de luz 09:00 h., con apagado a la 01:00 h) con una temperatura regulada de 21 ± 0.6 °C, humedad relativa de 20-40%, alimento procesado (Conejos Max Premiun Reproductor, Malta Cleyton, México) y agua *ad libitum*.

Adicionalmente, se utilizó una sala de registro independiente ubicada en el mismo Bioterio separado de la sala en el que se encontraban alojadas las hembras reproductoras. Las condiciones ambientales de este cuarto fueron similares al cuarto de las reproductoras, excepto la iluminación la cual fue proporcionada por lámparas de luz blanca halógena (Philips, 32 Watts Alto USA, 860-2210 luxes), las cuales permanecieron encendidas durante el desarrollo de todo el protocolo.

El manejo de los animales fue llevado a cabo con base a la Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (National Research Council 1996) y contó con la aprobación del Subcomité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales en Experimentación (SICUAE) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia perteneciente a la UNAM y por el SICUAE del Instituto de Investigaciones Biomédicas (protocolo número 098).

5.1 Partos

Los partos fueron programados con un mes de anticipación; Se utilizaron de 4 a 7 hembras gestantes por experimento. Tres días previos al parto a cada hembra gestante le fue colocada una caja nido (28 x 29.5 x 30 cm) de cloruro de polivinilo (PVC) con una entrada de 14 cm de diámetro, con material de cama (avena). En

algunos casos fue necesario inducir el parto con oxitocina, 0.2-3 UI/kg vía IM, para coordinar que el nacimiento de todas las camadas ocurriera el mismo día.

5.2 Animales y grupos

A lo largo del protocolo se emplearon conejas adultas (n=20) de la raza Chinchilla (*Oryctolagus cuniculus*) de las cuales se obtuvieron un total de 35 neonatos, de 39 camadas diferentes. De tal forma que fueron considerados en el presente estudio 6 conejos intactos, 6 con falsas lesiones (sham) y 6 con lesiones totales de NSQ. Fueron eliminados del estudio los animales que presentaron lesiones parciales de NSQ (n=12), los que presentaron alguna complicación asociada a la cirugía (n=4) y se presentó 1 deceso durante la cirugía. El rango de partos por hembra fue entre 1 a 4, con un promedio de crías por camada de 6 ± 2 .

El día de nacimiento fue considerado como día postnatal 0 (P0), cada cría fue pesada y marcados con plumones indelebles sobre la parte interna de las orejas. Los recién nacidos permanecieron con una hembra lactante hasta el día P4 y posteriormente fueron trasladados a la sala de registro. Las camadas fueron asignadas a uno de los tres grupos experimentales: grupo de animales intactos (Con); grupo con lesión falsa (Sham) y grupo con lesión total de NSQ (Lx-NSQ).

5.3 Cirugías

A los animales del grupo control les fue realizada una cirugía para la implantación de un sensor de telemetría dentro de la cavidad abdominal. Los neonatos del grupo Sham y Lx-NSQ fueron sometidos a dos cirugías, primero a una cirugía estereotáxica y posteriormente se realizó la implantación de un sensor. En el caso del grupo Sham la cirugía estereotáxica se realizó con la característica de no eliminar electrolíticamente al NSQ. Mientras que a los animales con lesión total de NSQ les fue realizado el procedimiento que se describe a continuación.

5.3.1 Cirugía estereotáxica

Para aumentar las probabilidades de lesionar completamente el núcleo supraquiasmático, se estandarizaron una serie de manipulaciones previas a la cirugía.

- Se monitoreó desde el nacimiento el peso corporal de los neonatos, de tal forma que los animales que en P0 pesaron en promedio 53.6 ± 4.6 gr, tuvieron mayor probabilidad de alcanzar un peso entre 73 ± 4.8 gr para el día P4. Este rango de peso y tamaño del animal fue fundamental para homogenizar el tamaño de la cabeza de los animales a lesionar.
- Los animales fueron anestesiados con Sevoflurano (Sevorane, Abbot, USA), en condiciones asépticas utilizando un bisturí (#10) se hizo una incisión de aproximadamente 1.5 cm en ambos pabellones auriculares, alcanzando el foramen auricular, esto con el fin de poder montar adecuadamente al neonato en un aparato estereotáxico. Se utilizó un estereotáxico para roedores (Stoelting), con un electrodo aislado de 0.25 mm de diámetro con solo 0.1 mm de punta sin aislar. Con el objetivo de montar adecuadamente la cabeza del animal, los pabellones auriculares de ambas orejas fueron incididos aproximadamente 1 cm y la cabeza fue alineada al eje horizontal de ambos lápices laterales, los cuales fueron introducidos con una ligera presión sobre el foramen auricular. Posteriormente, el cuerpo del neonato fue puesto sobre una almohadilla eléctrica de 30.5 x 34.4 cm (CONAIR Heating Pad, E.U.A) el cual fue sostenido por una plataforma de metal 11.5 x 25 cm, con el objetivo de disminuir la pérdida de temperatura corporal.
- Una vez montado, la barra de incisivos fue introducida en hocico del neonato 0.8 cm. Posteriormente, sobre la barra mencionada se elaboró una máscara de forma cilíndrica con una película plástica de parafina con la cual se controló la anestesia de forma manual.

- La cirugía estereotáxica inició con la antisepsia con yodo la parte superior del cráneo; con un bisturí se realizó una incisión de aproximadamente 2 cm en la piel del cráneo sobre línea media. Se retiró el periostio hasta visualizar la sutura sagital y la sutura bregma (fig. 6a), suturas sobre las cuales se alineó el electrodo a nivel del cráneo hasta tocar superficialmente y céntricamente la sutura bregma (fig. 6b). Se registraron las lecturas de los ejes antero-posterior, medio-lateral y dorso-ventral. A cada eje se le sumó o restó las coordenadas teóricas previamente establecidas en estudios pilotos realizados en nuestro grupo quedando de la siguiente manera: antero-posterior +0.03, medio-lateral +/- 0.03 y dorso-ventral -1.05. Una vez hecha la suma y resta para los tres planos se procedió a hacer el trepano de aproximadamente 0.5 cm x 0.3 cm con un bisturí (#11), siendo el plano transversal el más largo para evitar romper el seno venoso que se encuentra debajo de la sutura sagital (fig. 6c). El trépano se retiró parcialmente y se procedió a desplazar ligeramente el seno venoso para que este no fuera perforado con el electrodo (fig. 6d), a continuación el electrodo fue descendido a la coordenada final del plano dorso-ventral, desplazado sobre el plano medio-lateral en cada una de las coordenadas finales, en las cuales se aplicaron descargas electrolíticas con una duración de 15 segundos e intensidad de 2 a 4 milivolts. Finalmente, se regresó el electrodo a la coordenada original del plano medio-lateral y fue retirado. La tapa del trepano fue colocada en su posición original y la piel fue suturada con material absorbible (calibre 000). El neonato fue desmontado del estereotáxico para la implantación del sensor.

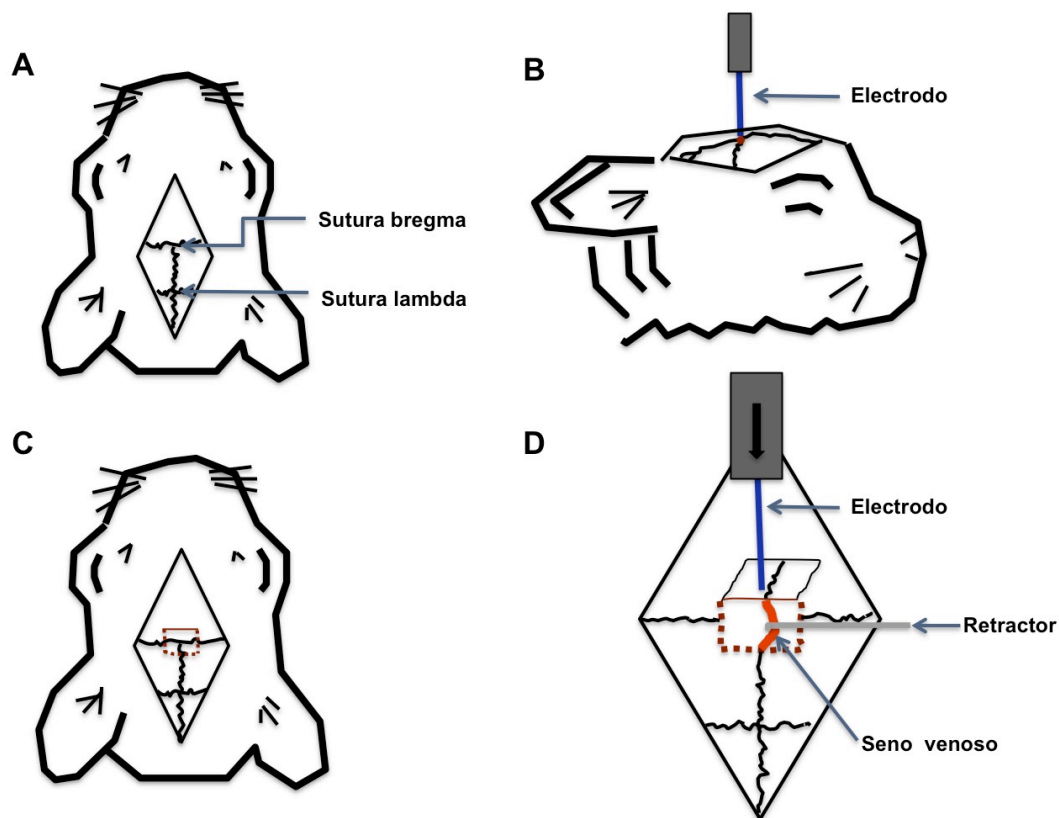


Figura 6. Esquema representativo del procedimiento quirúrgico para lesionar el NSQ. A) después de una incisión en la superficie del cráneo se localizan las suturas bregma y lambda. B) se retira en periostio, al nivel del cráneo y céntricamente se coloca el electrodo exactamente por encima de esta sutura, posteriormente se toma la lectura de los tres planos (rostro-caudal, ventro-dorsal y latero-medial). C) con un bisturí se marca un trepano en forma rectangular y cuidadosamente se elaboran los cortes (línea punteada), evitando que el trepano pueda desprenderse totalmente. D) el trepano es levantado y cuidadosamente el seno venoso es desplazado para permitir el paso del electrodo.

5.3.2 Implantación del sensor de telemetría

La cirugía para implantar los sensores de telemetría fue llevada a cabo bajo condiciones asépticas. Para las crías de los grupos Sham y Lx-NSQ, este procedimiento fue realizado inmediatamente después de la cirugía estereotáxica, dejando al final los animales del grupo control. Cada animal fue colocado de cúbito dorsal sobre un tapete térmico. De la misma manera se utilizó sevoflurano como

anestesia y se controló de forma manual. Se desinfectó el abdomen del neonato y posteriormente sobre el plano transversal al costado derecho de la cicatriz umbilical se realizó una incisión de aproximadamente 1 cm. Fueron seccionados los planos de piel, músculo y peritoneo. Al interior de la cavidad abdominal se colocó un transmisor de telemetría de 1.55 x .65 cm, con un peso de 1.1 g, (G2 E-Mitter, VitalView System, MiniMitter Respironics Inc., USA). Posteriormente, fueron suturados ambos planos, muscular y cutáneo con material de seda (calibre 000). Al final del procedimiento con la finalidad de reducir el dolor postquirúrgico y prevenir alguna infección, los animales fueron medicados por tres días con 2.2 mg/kg de meglumina de flunixin (Napzin, Pisa), cada 24 horas vía subcutánea.

5.4 Registro de temperatura corporal y actividad locomotora

Consecutivamente a la recuperación de los animales, las camadas fueron ajustadas entre 4 a 6 crías y trasladadas al cuarto de registro. Cada grupo fue colocado sobre un receptor de telemetría (ER-4000 Energizer Receiver, MiniMitter Respironics Inc., USA) en cajas de polisulfonato (Tecniplast, 48 x 27 x 20 cm) con aproximadamente 3 cm de granulina (Argo, México) como material de cama. Para el registro de la temperatura corporal y actividad locomotora se utilizó el programa de telemetría VitalView (Respironics, MiniMitter Inc., USA), el cual registró por medio del receptor de telemetría en intervalos de 5 min, el cambio de movimiento y temperatura de cada transmisor implantado en los animales. Estudios previos demuestran que este sistema de registro, es seguro y confiable (Trejo-Muñoz *et al.*, 2012). Los animales fueron monitoreados a partir del día P5 hasta el día P29. Los datos fueron almacenados en un archivo que al final del protocolo fue descargado de una computadora (Dell, USA) para su análisis.

5.5 Acceso controlado al amantamiento y al alimento sólido

Durante el día del parto, las crías tuvieron libre acceso a la hembra durante la mayor parte del día. Posteriormente se colocó una barrera metálica entre la caja nido y la hembra. Cada día la barrera fue retirada a las 11:30 h (horario de verano) durante los primeros 4 días. A partir del día P5 y a lo largo del protocolo, los animales fueron sometidos a diferentes horarios de amantamiento, ayuno y cambio de alimento. Para su mejor análisis el protocolo fue dividido en 5 segmentos (fig. 7):

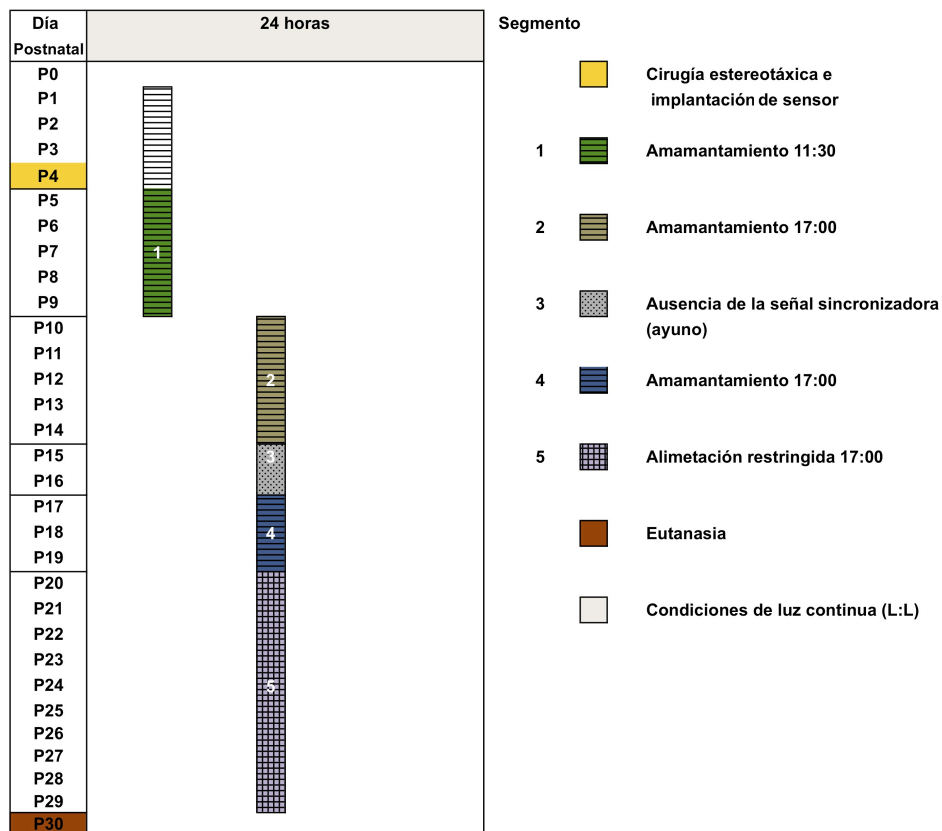


Figura 7. Esquema del protocolo de sincronización por amantamiento y alimentación sólida. La barra horizontal superior (24 horas) junto con los números inferiores indican en horas el transcurso de 1 día dentro de un tiempo geográfico (TG). La barra vertical izquierda indica los días de edad (postnatal) de los animales y la división por segmentos (5 segmentos). Las barras de colores internas junto con los cuadros externos indican el manejo, el segmento, el momento de amantamiento y alimentación, para mayor detalle leer el texto.

Segmento 1

A partir del día P5 hasta el día P9, las hembras lactantes fueron trasladadas a las 11:30 h en cajas de PVC (53 x 37 x 29 cm) al cuarto de registro para amantar a las crías. A cada hembra le fue asignado un grupo de neonatos que alimentó a lo largo de protocolo. Las hembras fueron colocadas dentro de las cajas que contuvieron a los neonatos durante 4-5 min. Posteriormente fueron retiradas y retornadas a sus jaulas.

Segmento 2

A partir del día P10 al día P14 el manejo fue el mismo, excepto por el horario de amamantamiento el cual fue retrasado 5 horas 30 minutos, es decir este tuvo lugar a las 17:00 h. En el día P14 posterior al amantamiento, sólo permanecieron en cada caja el animal bajo registro junto con un acompañante y a las cajas les fue colocada una tapa microaisladora.

Segmento 3

Los animales bajo registro y su acompañante no tuvieron acceso a la hembra lactante durante los días P15 y P16. En estos días no hubo acceso al cuarto de registro por parte de ningún usuario. Con la finalidad de mantener a las hembras lactantes, en el día P15 se les colocaron a cada una entre 3-6 conejos (de los que fueron retirados en el día P14) en su respectiva cajas nido, los cuales tuvieron acceso al amamantamiento durante 4-5 min a las 17:00 h. Para el día P16 ningún animal tuvo acceso al amantamiento.

Segmento 4

En el día P17, nuevamente las hembras lactantes fueron trasladadas al cuarto de registro y todos los animales fueron amamantados a las 17:00 horas en sus respectivas cajas, incluyendo los que habían sido retirados. Adicionalmente se comenzó a introducir entre 2-3 g de avena posterior al amantamiento sobre lo

largo de la superficie del material de cama, retirando el sobrante al día siguiente previamente al amantamiento. De manera similar al de la avena, en los días P18 y P19 fueron puestos 7-10 g de zanahoria rayada. Posteriormente, las tapas de las cajas fueron acondicionadas en las cuales se colocaron bebederos de 500 ml, para tratar de inducir a los animales a que comenzaran a beber agua. En el día P19, al final del amantamiento todos los animales acompañantes fueron retornados con las hembras con las que fueron amantados excepto un acompañante, el cual se quedó con el animal implantado. El criterio de selección del acompañante se basó en observar que este fuera capaz de tomar agua del bebedero o consumir alimento sólido durante los días previos.

Segmento 5

A partir del día P20 a todos los animales les fue colocado un comedero de plástico (15.5 x 7.5 x 5 cm) y alimentados diariamente a las 17:00 horas con 25-30 g de zanahoria rayada y 3-5 g de alimento procesado (Conejos Max Premiun Reprodutor, Malta Cleyton, México), el cual permaneció hasta el día siguiente, esto se realizó con la finalidad de que los animales comenzaran a ingerir alimento sólido a lo largo de las 24 horas debido a que la ausencia del amantamiento generó en los animales una disminución de peso en los primeros días. Diariamente a las 17:00 horas les fue retirado el alimento sobrante y remplazado por alimento nuevo hasta el siguiente día. En el día P21 la cantidad de gramos de zanahoria fue disminuida entre 20-25 g y se aumentó el alimento procesado 4-6 g. En el día P22 previo a la alimentación el animal acompañante fue retirado dejando únicamente al animal implantado al cual se le proporcionó de 15-20 g de zanahoria y 10 g de alimento procesado. Del día P23 al día P25 la zanahoria fue disminuida 5 g diarios, mientras que el alimento procesado se mantuvo en 10 g diarios. A partir del día P26, los conejos recibieron únicamente entre el 4-7% de su peso corporal de alimento procesado. La ganancia de peso fue registrada diariamente antes de la alimentación durante el resto del protocolo.

5.6 Análisis histológico

Corroboración de la lesión por medio de tinción de Nissl e inmuno-histoquímica. Para tal efecto los animales fueron sometidos a eutanasia en el día P30 con una sobredosis de Pentobarbital (60 mg/kg i.p). El sistema circulatorio fue drenado con cloruro de sodio 9% y perfundidos con paraformaldehído lisina periodato al 4% (PAF). El cerebro fue extraído y colocado en PAF aproximadamente 48 horas. Posteriormente el tejido fue colocado en sacarosa 20% durante 48 horas y consecutivamente en sacarosa 30% por aproximadamente 48 horas. El cerebro fue congelado a -20°C e inmediatamente después fue cortado en un criostato. Se realizaron cortes coronales de 40 µm tomando como referencia la unión de los nervios ópticos y finalizando con la ausencia del quiasma óptico. Los cortes obtenidos fueron ordenados en 5 juegos de tripletes de laminillas de tal forma que tuviesen cortes representativos del inicio y final del NSQ. Se utilizaron dos laminillas para inmunohistoquímica (Hsu *et al.*, 1981) contra la proteína intranuclear neural empleando anticuerpo MS x núcleo neuronal (NeuN, Millipore) en una dilución de 1:500 y a la laminilla restante le fue realizada la tinción de Nissl (fig. 8).

Posteriormente, imágenes de la extensión de la lesión fueron obtenidas con una cámara Evolution VF cooled color (MediaCybernetics, Canadá) montada a un microscopio Olympus BX51 y analizadas con ayuda del programa QCapture Pro 6.0.

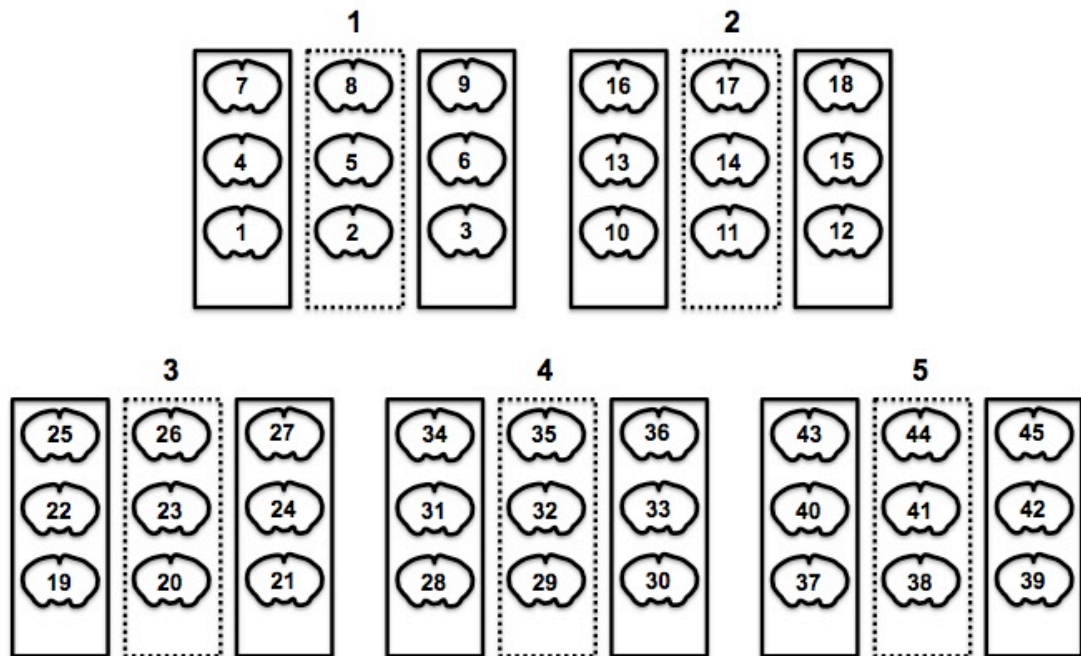


Figura 8. Esquema representativo del orden de obtención de los cortes histológicos. Los cortes de tejido fueron recolectados en 5 juegos (representado con el número superior externo) de tres laminillas. El número dentro del tejido indica el orden en que los cortes fueron obtenidos. Únicamente la laminilla representada con la línea punteada, le fue aplicada la tinción de Nissl. Mientras, al menos a una laminilla restante de cada juego le fue hecha la inmunohistoquímica contra la proteína intranuclear NeuN, dilución 1/500.

5.7 Análisis de datos

Las series de tiempo obtenidas para temperatura corporal y actividad locomotora fueron divididas en 5 segmentos y analizadas individualmente. Debido a que estudios previos elaborados en nuestro grupo de trabajo muestran que días anteriores a P4, la ritmicidad de 24 horas aún no está consolidada (Caldelas *et al.*, 2009). El primer segmento fue considerado del día P5 al día P9 ya que es sabido que la ritmicidad de 24 horas comienza a ser evidente (Caldelas *et al.*, 2009); adicionalmente los neonatos comienzan a incrementar su masa corporal y mejora su eficiencia termoregulatoria (Bautista *et al.*, 2003; Gilbert *et al.*, 2007). El segundo segmento (P10 a P14) fue considerado como el inicio de la etapa visual

(Choudhury, 1978). En el tercer segmento (P15 a P16) el amamantamiento fue omitido. En el cuarto segmento (P17 a P19), adicionalmente al amantamiento las crías, comienzan a ingerir alimento sólido, incluso desde días anteriores (Bautista *et al.*, 2008). Finalmente en el último segmento (P20 a P29) se analizó el efecto de la alimentación sólida.

El análisis de la ritmicidad de la temperatura se realizó con el siguiente procedimiento:

1) Para minimizar el incremento natural de la temperatura durante el desarrollo (Hull, 1965), los datos fueron ajustados a una línea recta ($y = mx + b$) usando el método de mínimos cuadrados, con lo cual se eliminó el incremento natural de la temperatura y obteniéndose un nuevo conjunto de datos.

2) Para eliminar el ruido en esta nueva serie de datos, se utilizó el algoritmo Wavelet shrinkage (revisado en Trejo-Muñoz *et al.*, 2012). En este proceso se aplicó la transformada de Anscombe para trasladar los datos de una distribución Poisson a Gaussian, obligando a los datos a tener una desviación estándar constante; a continuación se empleó la transformada de ondeletas (usando la ondeleta Daubechies-8) aplicado discriminación con umbral mínimo de los coeficientes de ondeletas, para remover los coeficientes correspondientes al ruido. Finalmente, se llevó a cabo la transformada de ondeletas inversa para recuperar la serie de tiempo libre de ruido.

3) Por otro lado a los datos originales les fue aplicada una transformada rápida de Fourier (TRF) y a componentes de 24 horas fue obtenida el espectro de amplitud y fase. La TRF puede determinar la amplitud A (ó energía), frecuencia ω y fase φ de cada componente presente en la serie de tiempos de cada segmento. Para cada segmento se realizó la transformada rápida de Fourier, con el fin de obtener las principales características de la señal de 24 horas de cada día. En general fueron seleccionadas y analizadas los primeros 25 componentes que presentaran un valor de energía alto.

4) Se desarrolló un análisis adicional para evaluar dentro de el componente de 24 horas la acrofase y nadir diario. Se construyó una secuencia de pulsos positivos

de w de ancho que fueron espaciados por 24 horas a partir de los datos máximos, así como una secuencia de pulsos negativos con las mismas características a partir de los datos mínimos. Los valores máximos y mínimos se obtuvieron usando la primera y segunda derivada. La secuencia de pulsos fueron posicionados y desplazados a lo largo de la serie de datos para determinar la acrofase y el nadir, que correspondió a la posición en el cual p fue máximo, considerando que $p = |\sum_{i=1}^n x_i y_i|$, donde x_i es el dato y y_i es la secuencia del pulso.

5) Por último la duración y la intensidad del componente anticipatorio fue calculado. Se definió la anticipación como el incremento constante de temperatura a lo largo del tiempo. Para ello se utilizaron los datos correspondientes a las 5 horas previas al momento de amamantamiento y alimentación restringida de cada día para determinar las posiciones en las que el incremento comenzó y terminó (duración) usando los valores máximos y mínimos así como la diferencia entre ambos valores extremos (amplitud). Se definieron cuatro casos de análisis de acuerdo a la posición del incremento referido sobre la media de los datos: a) el incremento cruzó la media; b) el incremento no cruzó la media; c) el incremento se presentó sobre la media y d) no se presentó el incremento. Únicamente los casos a) y c) se consideraron como anticipación.

El procesamiento y análisis para los datos de la actividad locomotora se llevaron a cabo de la misma manera que para la temperatura, con excepción del ajuste de los datos el cual fue excluido, debido a que el patrón de actividad locomotora no muestra la tendencia de incremento que tiene la temperatura durante el desarrollo. Adicionalmente la eliminación de ruido de los datos originales fue realizado con el filtrado de Savitzky-Golay en lugar del método Wavelet shrinkage, para preservar detalles importantes de los datos tales como los picos máximos y mínimos.

Los promedios y el error estándar fueron calculados diariamente para la temperatura corporal, la actividad locomotora, acrofases, duración e intensidad de el componente anticipatorio. Las diferencias que fueron asociadas con los segmentos fueron evaluadas usando ANOVAs de medidas repetidas de dos vías, seguidas de una prueba de Bonferroni/Dunn. Este análisis estadístico está basado

en metodología descrita para el análisis de datos publicados en el trabajo de Trejo-Muñoz y colaboradores (2012).

VI. RESULTADOS

6. Análisis histológico

La verificación histológica de las secciones cerebrales obtenidas de los tres grupos, encontramos que la tinción de Nissl fue la indicada para delimitar esta estructura hipotalámica en los grupos Con y Sham, en los cuales se observaron pequeñas neuronas teñidas de morado densamente agrupadas, ubicadas lateralmente al tercer ventrículo y dorsales al quiasma óptico (Fig. 9), mientras que los axones se observaron teñidos de un color gris.

En el grupo de conejos Lx-NSQ se verificó que la lesión electrolítica del NSQ fuera completa así como la extensión producida por el electrodo y el paso de corriente por el mismo (Fig. 9), ya que solo sujetos con lesiones completas de NSQ fueron considerados en el presente estudio.

Por otra parte, en la detección de proteína intranuclear NeuN, se observó una gran cantidad de núcleos de neuronas presentes en el hipotálamo basal, sin embargo, en el NSQ de los animales del grupo Con y Sham se notó un escaso número de células inmunopositivas, en comparación al resto del hipotálamo y otras regiones cerebrales (Fig. 9).

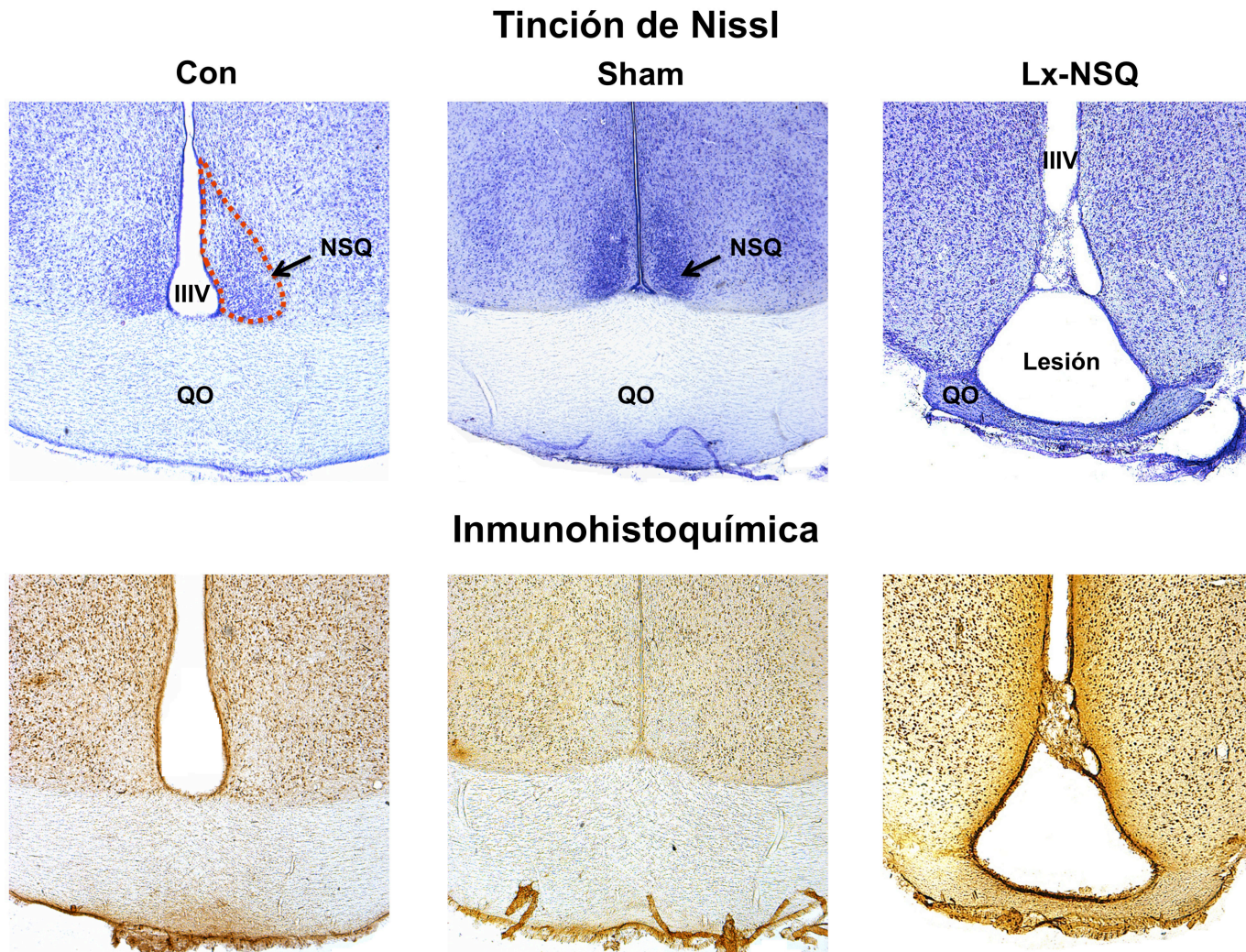


Figura 9. Imágenes representativas de cortes coronales de conejos neonatos de 29 días de edad del grupo control (Con), con lesiones falsas (Sham) y con lesiones totales de núcleo supraquiasmático (Lx-NSQ) teñidos con la técnica de Nissl (panel superior) e inmunohistoquímica contra la proteína intranuclear NeuN (panel inferior). NSQ: Núcleo supraquiasmático delimitado por línea punteada, QO: Quiasma óptico, IIIIV: Tercer ventrículo.

6.1 Ganancia de peso

Con la finalidad de corroborar el estado nutricional de los conejos a partir del día 20 de edad, día en que se inició la transición a alimento sólido fue registrado el porcentaje de ganancia diaria de peso en los tres grupos bajo estudio. El análisis de varianza reveló un efecto significativo asociado a la edad como a la condición de los conejos (Grupo: $F_{(2,149)}=8.8$, $p<0.0002$; Edad: $F_{(4,149)}=20.9$, $p<0.0001$; Interacción: $F_{(18,149)}=0.3$, $p=0.9$). En donde el peso se incrementa con la edad y el grupo Con mostró una tendencia al presentar el mayor peso debido a que este reveló tener el $4\pm 0.7\%$ (13 ± 2.2 g) mientras que el grupo Sham y el grupo de Lx-NSQ tuvieron el $3.9\pm 0.6\%$ (12 ± 2 g) y el $3.1\pm 0.6\%$ (9 ± 2 g) de ganancia diaria de peso respectivamente, dichos resultados revelaron una diferencia significativa entre grupos. En el grupo Con, durante los dos primeros ciclos en los que fue administrado el alimento sólido no se observaron cambios evidentes en lo que respecta al peso de los animales. Sin embargo, a partir del día P23 se observa un incremento del peso paulatinamente, hasta alcanzar un peso corporal de 369 ± 16.1 g. Los conejos de los grupos Sham y Lx-NSQ, mostraron una tendencia similar en comparación a los Con, donde a partir del día P24 ambos grupos mostraron una ligera ganancia de peso, hasta alcanzar el grupo Sham un peso promedio de 342.5 ± 29.9 g y para el grupo Lx-NSQ de 323.6 ± 45.1 g (Fig. 10).

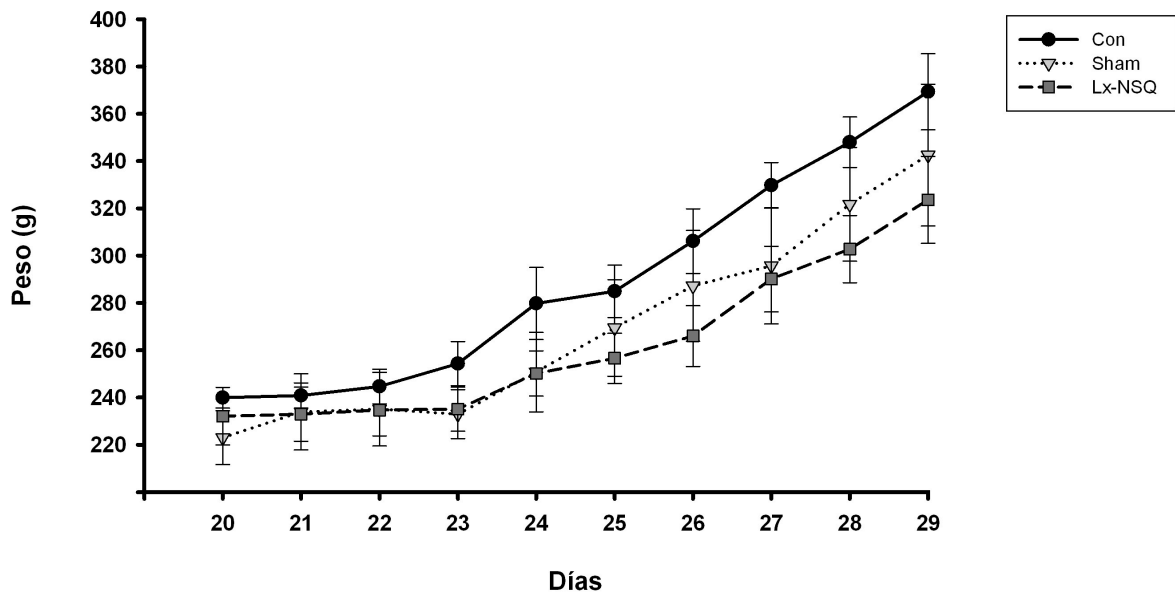


Figura 10. Ganancia diaria de peso corporal en conejos intactos (Con: círculo negro, línea continua, n=6); con lesiones falsas (Sham: triángulo gris claro, línea punteada corta, n=6) y con lesiones completas de núcleo supraquiasmático (Lx-NSQ: cuadrado gris oscuro, línea punteada larga, n=6), durante los días de edad 20-29, en los que se llevó a cabo la transición de amamantamiento a alimentación sólida.

6.2 Temperatura corporal

6.2.1 Temperatura corporal diaria

En el promedio diario de la temperatura corporal registrado del día P5 A P29 en los conejos de los tres grupos bajo estudio, el análisis de varianza reveló un efecto significativo asociado a la edad, así como al tratamiento (Edad: $F_{(24,375)}=47.2$, $p<0.0001$; Grupo: $F_{(2,375)}=12.7$, $p<0.0001$; Interacción: $F_{(48,375)}=0.7$, $p=0.95$). En los tres grupo bajo estudio se observó un incremento significativo en la temperatura conforme a la edad de los conejos (Fig. 11). Por otra parte los conejos del grupo Lx-NSQ mostraron una disminución significativa de la temperatura corporal

durante ciertos días, en comparación a los conejos de los grupos Con y Sham (Fig. 11).

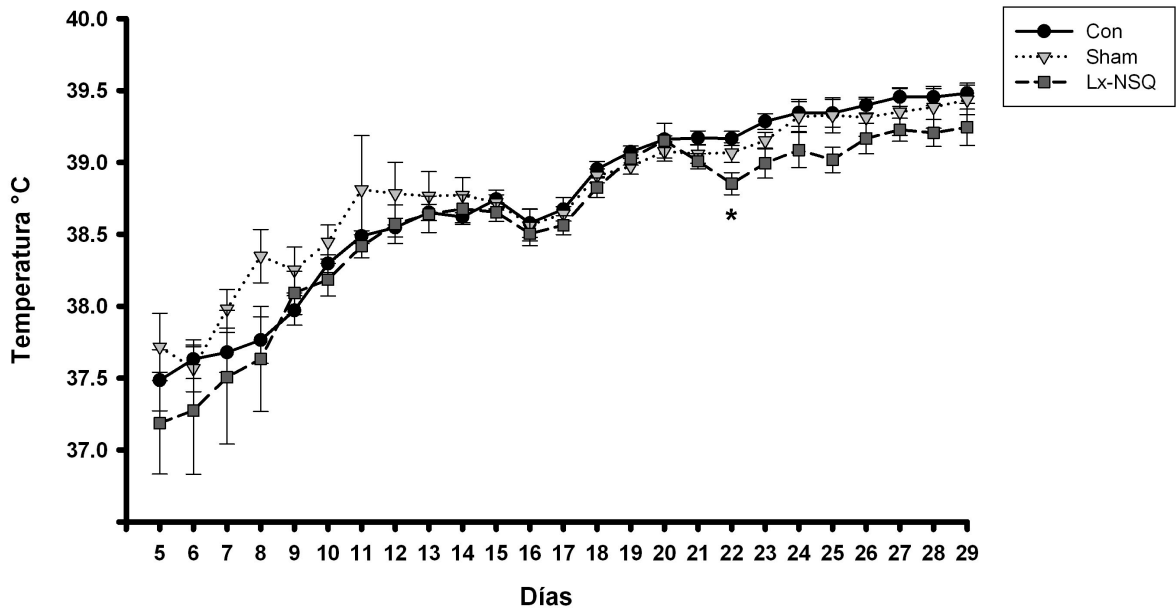


Figura 11. Promedio diario de temperatura corporal del día postnatal 5 a 29 de conejos intactos (Con, n=6); con lesiones falsas (Sham, n=6) y con lesión completa de núcleo supraquiasmático (Lx-NSQ, n=6). * Denota diferencia significativa ($p < 0.05$) contra los valores obtenidos en los grupos Con y Sham. Media \pm error estándar.

En el día P5 de edad, la temperatura corporal registrada del grupo Con fue de 37.5 ± 0.2 °C, 37.7 ± 0.2 para el grupo sham y 37.2 ± 0.3 °C para el grupo Lx-NSQ. Al final del experimento (P29) la Tc promedio mostró estrechas similitudes donde el registro de Tc de los conejos del grupo Con fue de 39.5 ± 0.1 °C, 39.4 ± 0.1 °C para el grupo Sham y 39.2 ± 0.1 °C en el grupo Lx-NSQ (Fig. 11). En promedio el incremento de temperatura fue de 1.9 °C, 1.7 °C y 2 °C. para el grupo Con, Sham y NSQ respectivamente.

Es de notar que durante el periodo en el que los conejos no tuvieron acceso a la hembra lactante (P15-16) los tres grupos mostraron una disminución en la Tc, la cual fue notoria en P16 (último día de ayuno) y en P17 (ciclo en el que tuvieron de nueva cuenta acceso a la hembra) respectivamente. Posterior al día 18, la temperatura continuó aumentando de forma progresiva hasta los días P21-22, momento en el que se inició la administración de alimento sólido. Es de notar que los conejos de los grupos Con y Sham mostraron un patrón en los valores promedio de la Tc, mientras que el grupo Lx-NSQ presentó la menor Tc a partir del día 22 de edad manteniéndose así hasta el final del experimento (Fig. 11). Finalmente, en los últimos 4 días de experimento el promedio de la Tc de los conejos mostró una asíntota y la dispersión disminuyó considerablemente en los tres grupos, en comparación a los primeros 11 días de registro (Fig. 11).

6.2.2 El patrón diario de temperatura corporal

Cabe destacar que los resultados del registro diario de la Tc en los conejos de los tres grupos bajo estudio Con, Sham y Lx-NSQ mostraron un claro patrón diario en el ritmo de la Tc desde etapas tempranas del desarrollo. En general a partir del día P9 el patrón temporal se caracterizó por exhibir un marcado incremento de temperatura momentos previos al acceso a la hembra lactante. Posteriormente se observó un decremento en la Tc (postprandio), finalmente esta se fue incrementando paulatinamente hasta alcanzar sus valores promedio (Fig. 12). En lo que se refiere al cambio de horario de acceso al amamantamiento, en los conejos de los tres grupos se observó que la fase del ritmo se ajustó al nuevo horario en el segundo segmento ciclo posterior al cambio de fase (Fig. 12). Consecutivamente el patrón diario persistió en los tres grupos bajo estudio durante los dos ciclos donde fue omitido el amamantamiento.

Consecutivamente en el segmento 4 donde los animales fueron amamantados nuevamente, el patrón diurno de la Tc presentó modificaciones en las cuales la anticipación no fue lo suficiente evidente en los conejos de los tres grupos en comparación con los segmentos anteriores. Finalmente, en el segmento 5 donde únicamente los conejos fueron alimentados con alimento sólido, el patrón de la temperatura mostró una disminución en las frecuencias rápidas, sin embargo el ritmo se ajusta al horario de administración del alimento sólido (Fig. 12).

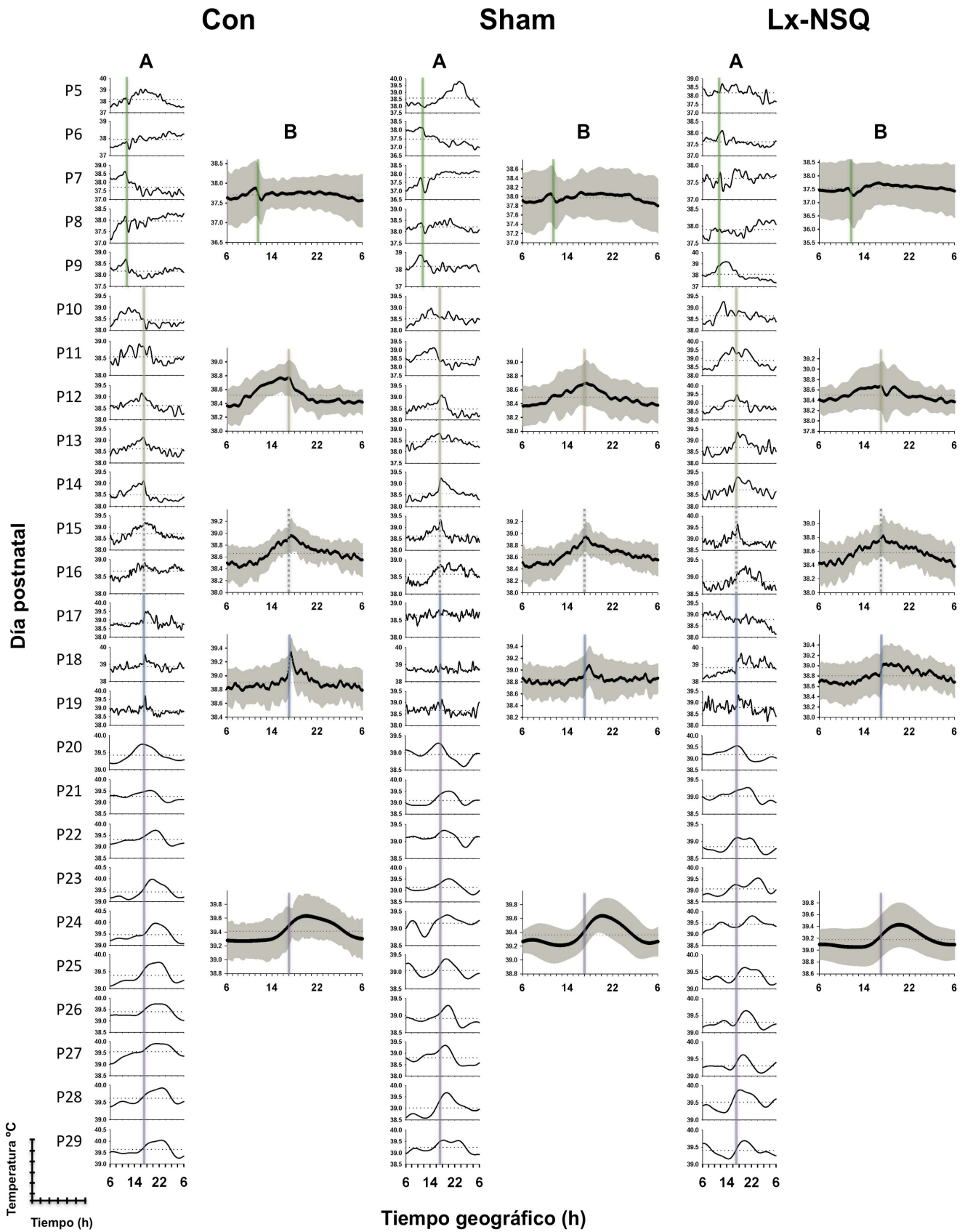


Figura 12. Patrón diario de temperatura corporal de conejos representativos (A) y su promedio por segmento (B) de los grupos intactos (Con), con lesiones falsas (Sham) y con lesiones totales de núcleo supraquiasmático (Lx-NSQ). El registro de dicho parámetro se realizó del día postnatal (P) P5 al P29 de edad. La línea transversal de color indica el segmento y el momento de acceso al amamantamiento ó alimento sólido. La línea horizontal punteada en cada gráfica indica el promedio de temperatura presente en el día. El segmento 1 está representado por la línea verde y abarca del día P5 al día P9, donde el amamantamiento sucedió a las 11:30 horas; el segmento 2 está esquematizado por la línea dorada e incluye del día P10 al día P14, donde el amamantamiento ocurrió a las 17:00 horas; el segmento 3 está representado por la línea gris punteada y comprende los días P15 y P16 donde el amamantamiento fue omitido; la línea transversal azul representa el segmento 4 y contiene del día P17 al día P19, donde el amamantamiento tuvo lugar a las 17:00 horas; por último la línea morada indica que del día P20 al día P29, los conejos tuvieron acceso a alimento sólido a las 17:00 horas.

La transformada rápida de Fourier, reveló que en todos los segmentos analizados de las series de tiempo obtenidas de los animales de los tres grupos bajo estudio, presentaron el componente de 24 horas (Tabla 1, Fig. 13) por lo que desde etapas tempranas del desarrollo los conejos exhiben ritmicidad diurna en la temperatura corporal.

Tabla 1. Posición del componente de 24 horas de acuerdo al nivel de energía obtenidos mediante la transformada rápida de Fourier de las series de tiempo de la temperatura corporal obtenidas en los conejos intactos (Con), con lesiones falsas (Sham) y con lesiones de núcleo supraquiasmático (Lx-NSQ). Se representan el número de animales que exhiben la frecuencia de 24 horas dentro los cuatro intervalos de energía de acuerdo a los diferentes segmentos en los que fue realizado el experimento, en donde el segmento 1 incluye los días 5 a 9 de edad; el segmento 2 del día 10 al 14; el segmento 3 del día 15 al 16; el segmento 4 del día 17 al 19 y el segmento 5 del día 20 al 29 postnatales.

Segmento	Posición de la frecuencia de 24 horas	Con				Sham				Lx-NSQ			
		1-3 ^a	4-6 ^a	7-9 ^a	>10 ^a	1-3 ^a	4-6 ^a	7-9 ^a	>10 ^a	1-3 ^a	4-6 ^a	7-9 ^a	>10 ^a
1		1	2	3	-	-	5	1	-	1	4	1	-
2		5	1	-	-	4	2	-	-	5	-	-	1
3		6	-	-	-	6	-	-	-	5	-	1	-
4		5	-	-	1	2	3	-	1	6	-	-	-
5		6	-	-	-	5	-	1	-	6	-	-	-

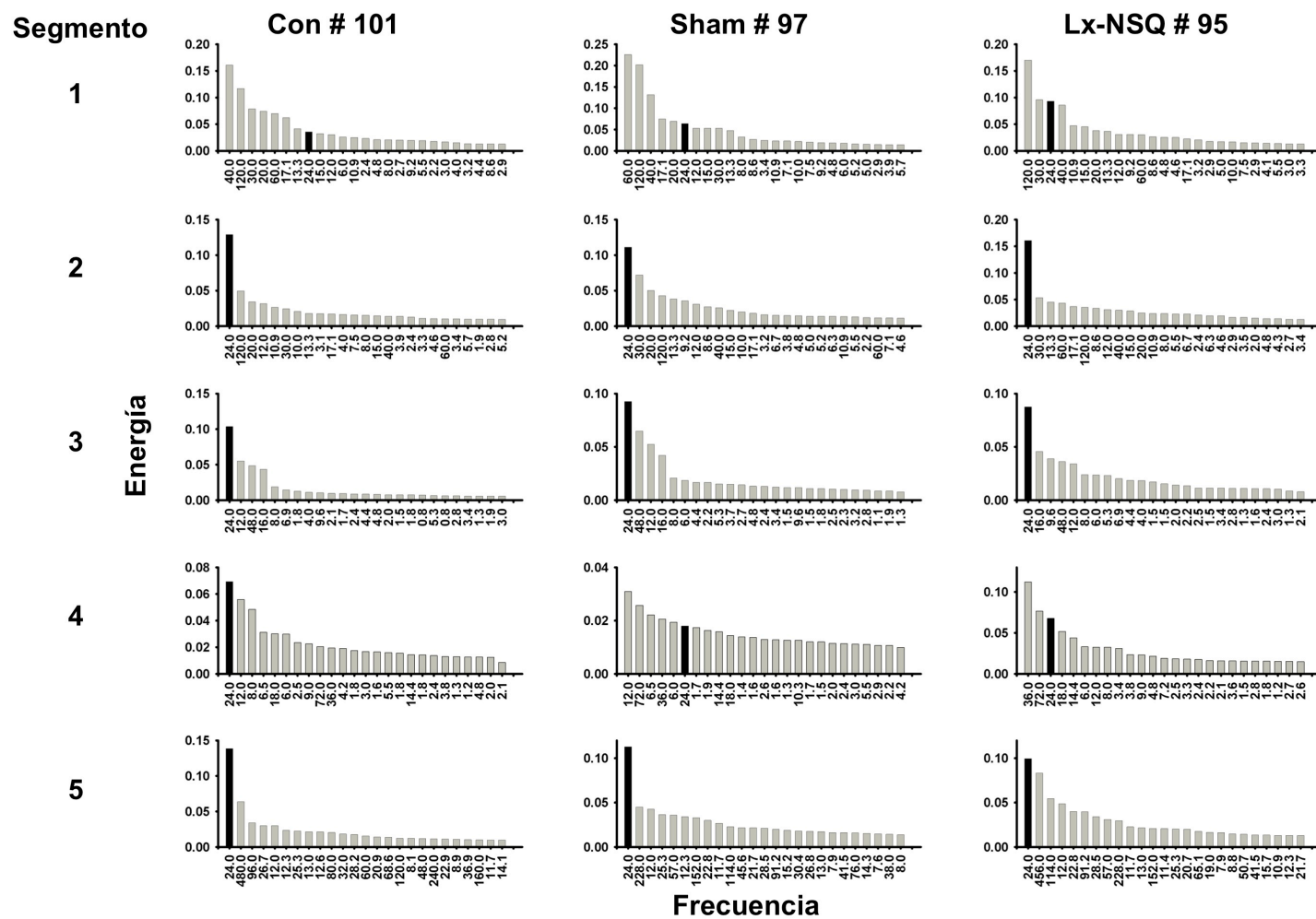


Figura 13. Gráficas representativas de las 25 frecuencias de mayor energía detectadas por la transformada rápida de Fourier en el ritmo de temperatura corporal de conejos intactos (Con, sujeto # 101), con lesiones falsas (Sham, sujeto # 97) y con lesiones de núcleo supraquiasmático (Lx-NSQ, sujeto # 95) analizados por segmento (columna izquierda). El segmento 1 representa los días postnatales (P) P5 a P9, el segmento 2 del día P10 a P14, el segmento 3 del día P15 a P16 (ayuno), el segmento 4 del día P17 a P19 y el segmento 5 del día 20 a 29. La frecuencia de 24 horas está representada por la columna negra de cada gráfica.

En el grupo Con, durante los primeros días del desarrollo, es decir, del día P5-9 (Tabla 1, Fig. 13), 5 de los 6 animales mostraron el componente de 24 horas dentro de las nueve frecuencias con mayor energía, sólo una cría de conejo mostró este componente dentro de las primeras 3 primeras frecuencias de mayor energía. En el segundo segmento (P10-14) en donde se retrasó el horario de amamantamiento en 5 de los 6 conejos el componente se encontró dentro de las tres primeras frecuencias de mayor energía (Tabla 1, Fig. 13).

A partir del tercer segmento, los animales del grupo Con presentaron el componente de 24 horas dentro de las tres primeras frecuencias de mayor energía, incluyendo los ciclos en los que las crías no tuvieron acceso a la hembra lactante. Por lo que la ritmicidad diurna en los conejos del grupo Con fue evidente desde los primeros días postnatales, consolidándose dentro de los 10 primeros días (Tabla 1; Fig. 13).

En contraste, los conejos del grupo Sham mostraron diferencias importantes en cuanto a la energía del componente de 24 horas en el patrón temporal de temperatura, en comparación a los del grupo Con (Tabla 1, Fig. 13). En el primer segmento, 5 de los 6 animales del grupo Sham mostraron el componente de 24 horas dentro de las 6 frecuencias con mayor energía, con excepción de uno, que la presentó dentro de las 9 frecuencias. Cuando se retrasó el horario de amamantamiento (segmento 2), el componente de 24 horas se encontró dentro de las tres primeras frecuencias en 4 conejos, mientras que los dos animales restantes la presentaron dentro de las 6 primeras frecuencias. Durante los dos ciclos en los que las crías no tuvieron acceso a la hembra lactante (segmento 3), se encontró que el componente de 24 horas estaba presente dentro de los 3 componentes de mayor energía en todos los sujetos del grupo Sham. En la transición de la alimentación con leche materna a alimento sólido (segmento 4), la frecuencia de 24 horas se encontró entre las 10^a frecuencias de mayor energía (Tabla 3, Fig. 13). Finalmente, en los últimos nueve ciclos de registro (segmento 5), en los conejos del grupo Sham el componente de 24 horas se observó dentro de las tres frecuencias con mayor energía (Tabla 3, Fig. 13).

En lo que se refiere a los conejos del grupo Lx-NSQ mostró estrechas similitudes en la consolidación de la frecuencia de 24 horas en el patrón de la Tc (Tabla 3, Fig. 13), en relación a los conejos intactos. En el segmento 1, el componente de 24 horas fue detectado por la transformada rápida de Fourier dentro de las 9 frecuencias de mayor energía. Al retrasar el horario de acceso a la hembra lactante (segmento 2), los conejos mostraron el componente dentro de las tres frecuencias de mayor energía, con excepción de un neonato. En el segmento 3, cuando fue restringido el acceso de la hembra lactante, el componente de 24 horas persistió dentro de las 3 primeras frecuencias de mayor energía, con excepción de un sujeto de este grupo. Finalmente en los segmentos 4 y 5, todos los conejos del grupo Lx-NSQ continuaron mostrando el componente de 24 horas dentro de las tres primeras frecuencias de mayor energía, a pesar de que fueron destetados y alimentados con alimento sólido (Tabla 1, Fig. 13).

6.2.3 Acrofase y nadir de temperatura corporal

En relación al momento del ciclo en el que se detectó la máxima Tc en los conejos, el análisis de varianza (Grupo: $F_{(2,375)}=0.01$, $p<0.98$; Edad: $F_{(24,375)}=7.8$, $p<0.0001$; Interacción: $F_{(48,375)}=1.7$, $p<0.002$) reveló que los tres grupos bajo estudio mostraron una tendencia similar, sin embargo se encontró un efecto significativo asociado a la edad. En cuanto al momento en el que ocurrió la mínima Tc, se encontró un efecto similar (Grupo: $F_{(2,375)}=0.15$, $p<0.85$; Edad: $F_{(24,375)}=2.1$, $p<0.001$; Interacción: $F_{(48,375)}=1.09$, $p=0.31$) en donde sólo se encontró efecto significativo asociado a la edad de los conejos.

En el grupo de conejos intactos, se encontró tanto la acrofase, como el nadir demostraron inestabilidad en el segmento 1 (Fig. 14). En contraste, en el segmento 2 los conejos del grupo Con se observó que en el segmento 2 la acrofase se estabiliza y ocurre 47 ± 37 minutos previos al momento del amamantamiento, por el contrario el nadir mostró menor estabilidad y ocurrió en

promedio 311 ± 81 minutos posteriores al amamantamiento. Durante los ciclos en los que los conejos no tuvieron acceso a la hembra lactante (segmento 3), se observó que la acrofase se retrasa ligeramente y ocurre 108 ± 47 minutos después del momento en que previamente tuvo lugar el amamantamiento, el nadir también mostró inestabilidad durante estos ciclos (Fig. 14).

En el segmento 4, al inicio de la transición del amamantamiento a la alimentación con sólidos, la acrofase ocurrió inicialmente 197 ± 15 minutos después del acceso a la hembra, y hasta el día P19 se observó nuevamente el ajuste de fase al momento de amamantamiento. El nadir ocurrió en promedio 300 ± 106 minutos después del momento de alimentación. Finalmente, en el segmento 5 la acrofase inicialmente ocurrió 87 ± 16 minutos cercana al momento de la alimentación, sin embargo esta se desfasó paulatinamente ocurriendo a partir del día P23 aproximadamente 385 ± 35 minutos después del momento de la administración de alimento sólido. Adicionalmente, el nadir nuevamente presentó inestabilidad ocurriendo en diferentes momentos del ciclo (Fig. 14).

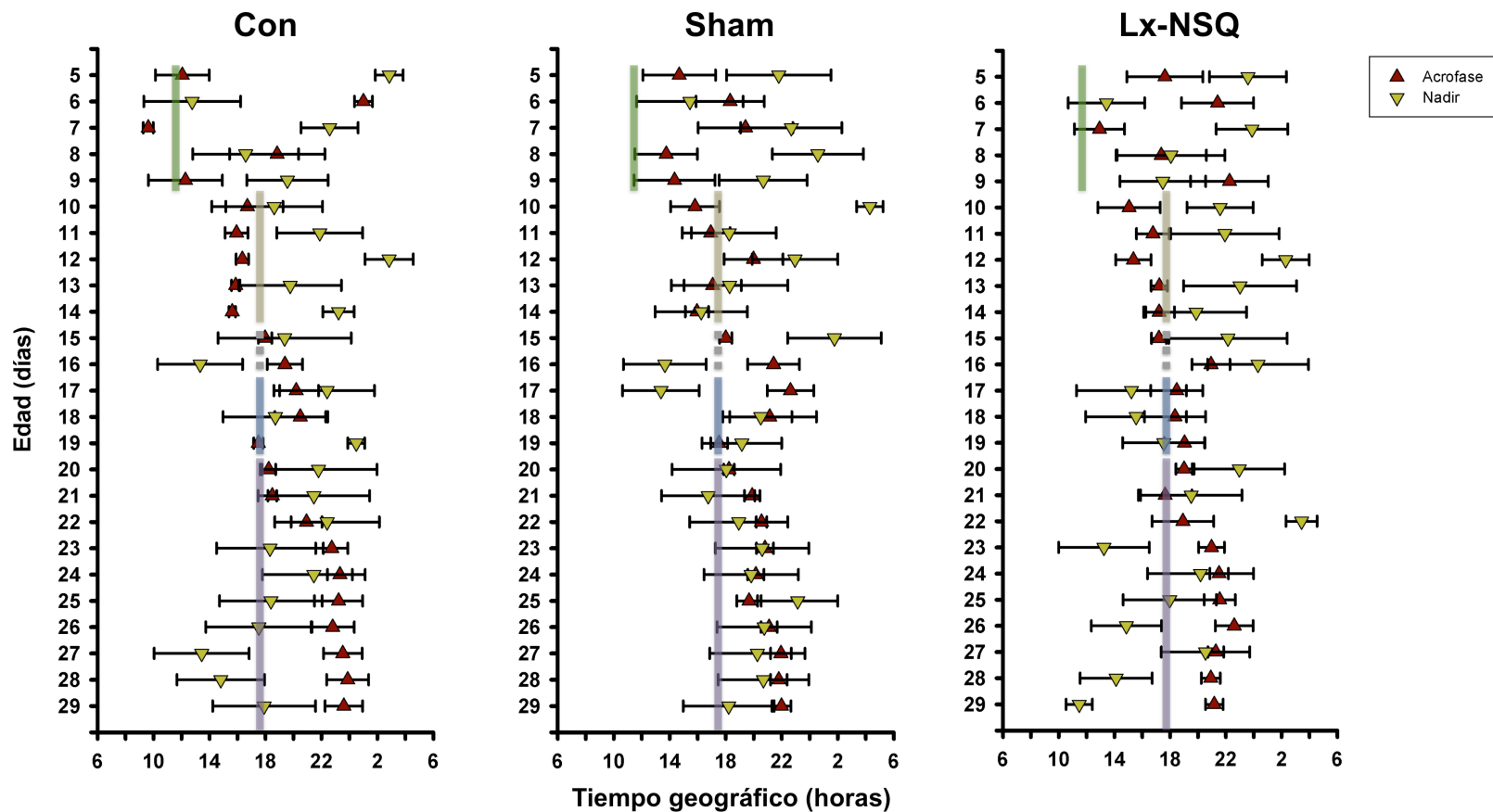


Figura 14. Promedio de la acrofase y el nadir de la temperatura corporal de los conejos de los grupos intactos (Con, n=6), con lesiones falsas (Sham, n=6) y con lesión completa de núcleo supraquiasmático (Lx-NSQ, n=6) durante los 25 días de registro. La acrofase está representada en triángulos rojos, mientras el triángulo verde invertido esquematiza el nadir. Las líneas verticales de color sobre las gráficas indican los segmentos y el horario en que los animales tuvieron acceso al amamantamiento ó alimentación controlada según el caso. El segmento 1 está indicado por la línea verde e incluye del día postnatal (P) P5 al día P9, donde el amamantamiento sucedió a las 11:30 horas; el segmento 2 está esquematizado por la línea dorada y abarca del día P10 al día P14, donde el amamantamiento ocurrió a las 17:00 horas; el segmento 3 está representado por la línea gris punteada e incluye del día P15 al día P16 y corresponde al periodo de ayuno; la línea azul representa el segmento 4 y contiene del día P17 al día P19, donde el amamantamiento tuvo lugar a las 17:00 horas; por último la línea morada indica que del día P20 al día P29, los conejos tuvieron acceso a alimento sólido a las 17:00 horas.

En lo que refiere al grupo de conejos con lesiones falsas, el segmento 1 también mostró inestabilidad en el momento en que se presentó la acrofase y el nadir, estos ocurrieron 248 ± 84 y 573 ± 94 minutos posteriores al amamantamiento, respectivamente (Fig. 14). En el segmento 2, la acrofase de los conejos Sham mostró una mayor estabilidad ocurriendo promedio 35 ± 54 minutos antes del momento del amamantamiento durante los dos últimos ciclos del segmento (P13-14). El nadir también alcanza una estabilidad en los mismos días y ocurre aproximadamente 23 ± 94 minutos después del acceso a la hembra.

Durante los ciclos en los que fue restringido el acceso a la hembra lactante, se observó que en el primer ciclo, la acrofase se mantiene muy cerca al horario en el que previamente los conejos tuvieron acceso a la hembra, es decir 60 ± 29 minutos previos al amamantamiento, en el segundo ciclo se retrasa la acrofase y esta ocurre aproximadamente 265 ± 116 minutos posteriores al momento al que inicialmente tuvieron acceso a la hembra lactante. Por su parte el nadir se presenta de manera inestable en ambos ciclos. Al tener de nueva cuenta acceso a la hembra lactante (segmento 4), los conejos del grupo Sham se observó que la acrofase y el nadir paulatinamente se volvió a ajustar al momento de acceso a la hembra, de tal forma que en el día P19 esta ocurrió 37 ± 36 y 174 ± 59 minutos después al momento del amamantamiento respectivamente (Fig. 14). Finalmente, en el segmento 5 la acrofase inicialmente ocurrió 75 ± 27 minutos posteriores al acceso al alimento sólido, sin embargo esta fue retrasándose de forma espontánea hasta estabilizarse y ocurrir aproximadamente 284 ± 32 minutos después del acceso al alimento. El nadir mostró inestabilidad en la mayoría de los ciclos, en promedio este ocurrió 164 ± 62 minutos posterior al momento de acceso al alimento (Fig. 14).

El grupo de conejos con lesiones completas de NSQ, mostraron un patrón similar a lo observado en los grupos Con y Sham, en lo que se refiere al momento en el que ocurrieran las acrofases y nadir, en las diferentes edades estudiadas.

En el segmento 1, la acrofase ocurrió de manera inestable sucediendo en promedio 409 ± 77 minutos después del acceso al alimento (Fig. 14) y el nadir

mostró también gran inestabilidad donde ocurrió en promedio 797 ± 88 minutos posterior al amamantamiento. En el segmento 2, la acrofase se ajustó cercano al momento de acceso a la hembra lactante, ocurriendo en promedio 47 ± 44 minutos antes de la llegada de la hembra lactante. El nadir ocurrió aproximadamente 333 ± 90 minutos después del acceso a la hembra lactante (Fig. 14). En el primer ciclo de ayuno los conejos del grupo Lx-NSQ se observó que la relación de fase se mantiene similar a los ciclos anteriores ocurriendo la acrofase 17 ± 39 después al amamantamiento, sin embargo en el segundo ciclo, el acrofase se retrasa aproximadamente 243 ± 86 minutos, mientras que el nadir en promedio se presenta 380 ± 168 minutos posterior al amamantamiento (Fig. 14). Durante el segmento 4, la acrofase de nueva cuenta se ajusta rápidamente al momento de acceso a la hembra, ocurriendo aproximadamente 105 ± 66 minutos después a este y el nadir muestra una inestabilidad con una gran variación entre días. Finalmente en el segmento 5 los conejos del grupo LX-NSQ en los dos primeros ciclos la acrofase mantienen valores similares al anterior segmento ocurriendo 82 ± 56 minutos, sin embargo a partir del tercer ciclo se comienza a observar un paulatino retraso en la acrofase y se ajusta aproximadamente 271 ± 36 minutos posterior al acceso al alimento. El nadir comienza a desfasarse en sentido contrario al acrofase, sin embargo no logra estabilizarse para el día 29 de registro (Fig. 14).

Cabe señalar que la principal diferencia entre los grupos Con, Sham y Lx-NSQ se observó en la acrofase del segmento 4, donde en el caso de los conejos del grupo Lx-NSQ esta se ajusta más rápido con relación al momento de amamantamiento que la acrofase del grupo Con y sham (Fig. 14).

6.2.4 Duración de la anticipación de la temperatura corporal

En lo que se refiere a la duración de la anticipación en la Tc, el análisis de varianza reveló efectos significativos asociados tanto al grupo, como a la edad de los conejos (Grupo: $F_{(2,375)}=3.4$, $p<0.03$; Edad: $F_{(24,375)}=4.4$, $p<0.0001$; Interacción: $F_{(48,375)}=1.6$, $p<0.01$). Estos cambios fueron evidentes primordialmente en el segmento 1, en donde los conejos del grupo Con mostraron una duración de 148 ± 12.2 minutos mientras que en los grupos Sham y Lx-NSQ mostraron una disminución significativa en la duración de la anticipación en relación al grupo Con, la cual fue de 110 ± 13.5 y 75 ± 13.6 minutos respectivamente, siendo los conejos del grupo Lx-NSQ los que mostraron la menor duración en la anticipación de los tres grupos (Fig. 15). En el segmento 2, los conejos de los tres grupos bajo estudio mostraron tendencias similares, en donde los conejos del grupo Con anticiparon durante 130 ± 22 minutos, los conejos de los grupos Sham y Lx-NSQ, la anticipación duró 103 ± 15 y 112 ± 15 minutos respectivamente (Fig. 15). El segmento 3, los valores obtenidos en el grupo Con y Sham mostraron similitudes en donde la anticipación duró 135 ± 21 y 131 ± 19 minutos respectivamente. El grupo Lx-NSQ expresó una tendencia en la que la anticipación fue menor a los grupos antes mencionados, ya que esta exhibió una duración de 90 ± 27 minutos en el grupo Lx-NSQ (Fig. 15). En el segmento 4, los tres grupos bajo estudio mostraron estrechas similitudes en la duración de la anticipación la cual fue de 73 ± 13 para el grupo Con, 79 ± 14 para el grupo Sham y 63 ± 13 para el grupo Lx-NSQ. De igual forma, el segmento 5 los tres grupos exhibieron estrechas similitudes en la duración de la anticipación de la Tc la cual fue de 128 ± 17 en el grupo Con, 145 ± 14 para el grupo Sham y 135 ± 11 minutos en el grupo Lx-NSQ (Fig. 15).

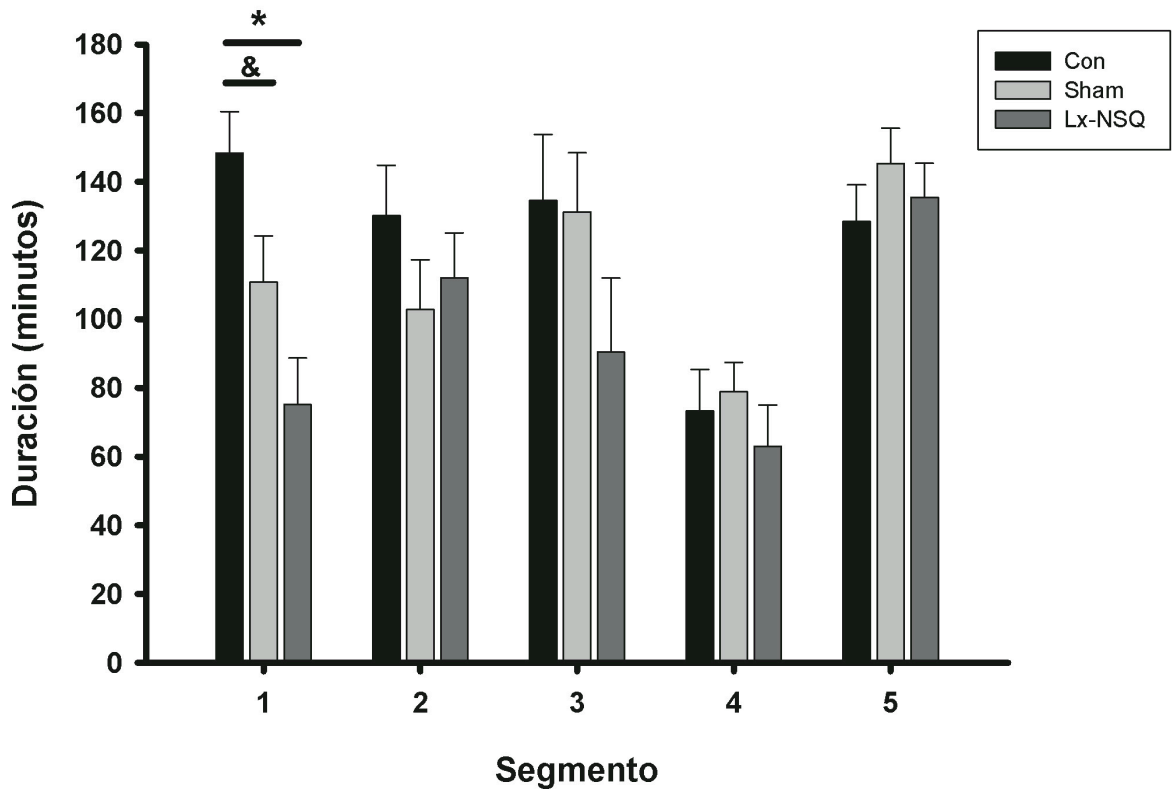


Figura 15. Duración de la anticipación de la temperatura corporal en las crías de conejo previo al amamantamiento ó acceso al alimento en los grupos intactos (Con, n=6), con lesiones falsas (Sham, n=6) y con lesiones totales de NSQ (Lx-NSQ, n=6). Los promedios fueron analizados por segmentos, en donde el segmento 1 corresponde a los días postnatales (P) P5 a P9, el segmento 2 a los días P10 a P14, el segmento 3 a los días P15 a P16, el segmento 4 a los días P17 a P19 y el segmento 5 a los días P20 a P29. Bonferroni/Dunn. & Con vs Sham $p < 0.05$; * Con vs Lx-NSQ $p < 0.0001$.

Por otra parte, la prueba post hoc, reveló que hubo una variación en la duración de la anticipación de la Tc en los segmentos de cada grupo bajo estudio. En el caso de los animales del grupo Con, el análisis evidenció que la duración de la anticipación de la Tc fue significativamente menor únicamente en el segmento 4 en relación a la duración de la anticipación del resto de los segmentos del mismo grupo (Tabla 2). En lo que respecta al grupo Sham, la duración del incremento anticipatorio de la Tc del segmento 1, 2 y 4 no exhibieron diferencias significativas entre ellos pero fueron significativamente menor con respecto a la duración del

segmento 5 (Tabla 2). Por último en el grupo Lx-NSQ, la duración de la anticipación de la Tc del segmento 1 fue significativamente menor que la duración del segmento 5, contrariamente a lo hallado en los segmentos 2 y 4 donde la duración de la anticipación del primero fue significativamente mayor que la del segundo y este último fue significativamente menor que la duración del segmento 5 (Tabla 2).

Tabla 2. Duración del incremento anticipatorio de la temperatura corporal de conejos intactos (Con), con lesiones falsas (Sham) y con lesiones totales de núcleo supraquiasmático (Lx-NSQ), previo al amamantamiento ó acceso al alimento. Los datos se presentan por segmento, donde el segmento 1 abarca del día postnatal (P) P5 al P9, el segmento 2 del día P10 al P14, el segmento 3 del día P15 al P16 (ayuno), el segmento 4 del día P17 al P19 y el segmento 5 del P20 al P29. Prueba post hoc Bonferroni/Dunn.

Grupo	Segmento	Minutos \pm E.E	Diferencia significativa vs segmento (os)	<i>p</i>
Con	1	148 \pm 12.2	4	<0.005
	2	130 \pm 14.8	4	<0.05
	3	135 \pm 19.3	4	<0.05
	4	73 \pm 12.1	5	<0.0001
	5	128 \pm 10.7		
Sham	1	110 \pm 13.5	5	<0.05
	2	103 \pm 15.0	5	<0.05
	3	131 \pm 17.2		
	4	79 \pm 8.6	5	<0.0001
	5	145 \pm 10.4		
Lx-NSQ	1	75 \pm 13.6	5	<0.0005
	2	112 \pm 13.2	4	<0.05
	3	90 \pm 21.6		
	4	63 \pm 12.1	5	<0.0005
	5	135 \pm 10.1		

6.2.5 Intensidad de anticipación de temperatura corporal

En lo que respecta a la intensidad de las anticipaciones en la Tc, el análisis estadístico reveló un efecto significativo asociado a la edad de los conejos, sin embargo no fueron detectados efectos entre los grupos bajo estudio (Grupo: $F_{(2,435)}=0.42$, $p=0.65$; Edad: $F_{(4,435)}=14.4$, $p<0.0001$; Interacción: $F_{(8,435)}=1$, $p=0.43$). En general, la intensidad del componente anticipatorio se mantuvo con valores similares en los tres grupos, durante los tres primeros segmentos de registro.

En el primer segmento el cambio en °C durante la anticipación para el grupo Con fue de 0.32 ± 0.03 , para el grupo Sham fue de 0.26 ± 0.04 y para el grupo Lx-NSQ fue de 0.27 ± 0.05 ; en el segundo segmento el incremento de la Tc fue 0.28 ± 0.03 para el grupo Con, 0.23 ± 0.03 para el grupo Sham y 0.24 ± 0.03 ; en el tercer segmento el incremento anticipatorio en la Tc para el grupo Con fue de 0.30 ± 0.05 , para el grupo Sham fue de 0.33 ± 0.04 y por último para el grupo Lx-NSQ fue de 0.23 ± 0.04 (Fig. 16). En los segmentos 4 y 5 la intensidad de la anticipación de la Tc mostró una discreta disminución en los tres grupos bajo estudio sin presentar diferencias significativas. En el cuarto segmento el cambio de Tc en el grupo Con fue de 0.18 ± 0.02 , mientras que para el grupo Sham fue de 0.16 ± 0.02 y para el grupo Lx-NSQ fue de 0.17 ± 0.02 . En el quinto segmento los valores para el grupo Con fue de 0.14 ± 0.01 , para el grupo Sham fue de 0.16 ± 0.02 y por último para el grupo Lx-NSQ fue de 0.16 ± 0.02 (Fig. 16).

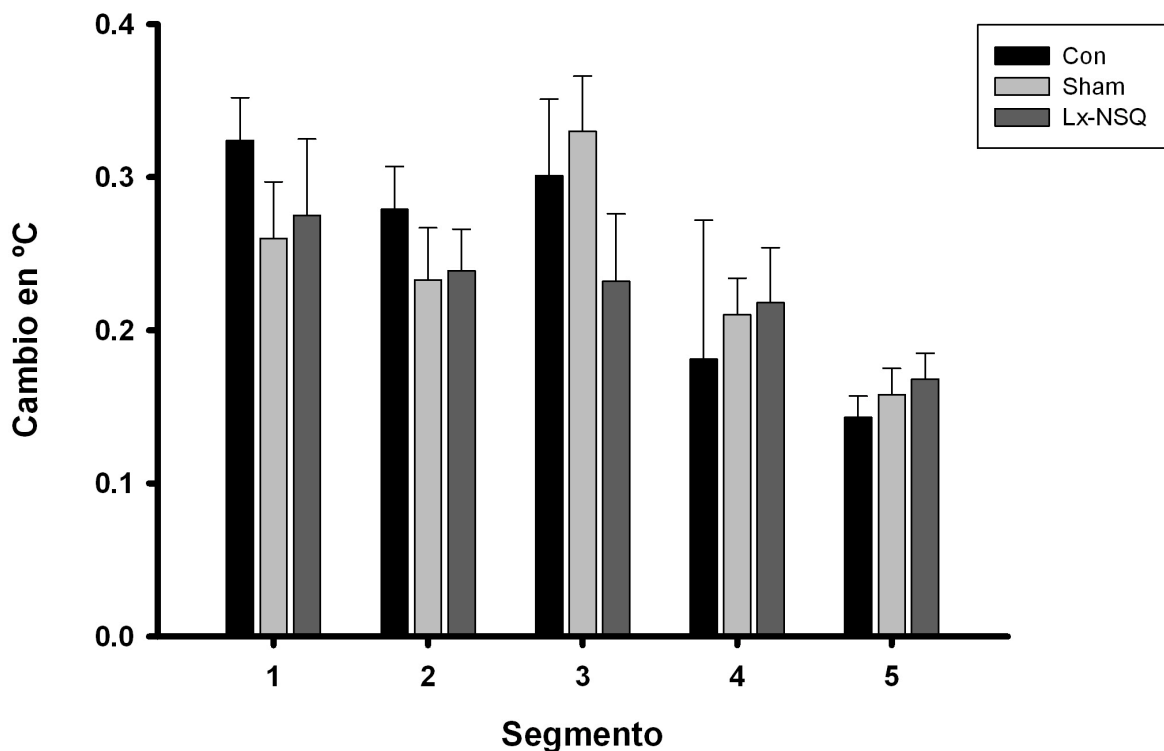


Figura 16. Gráfica del promedio de la intensidad de la anticipación de la temperatura corporal en conejos intactos (Con, n=6), con lesiones falsas (Sham, n=6) y con lesiones totales de núcleo supraquiasmático (Lx-NSQ, n=6). Los promedios fueron obtenidos por segmentos en donde el segmento 1 corresponde a los días postnatales (P) P5 a P9, el segmento 2 a los días P10 a P14, el segmento 3 a los días P15 a P16, el segmento 4 a los días P17 a P19 y el segmento 5 a los días P20 a P29. Media \pm error estándar. Prueba post hoc Bonferroni/Dunn.

De manera similar a la duración de la anticipación de la Tc, la prueba post hoc reveló que existieron diferencias significativas en la intensidad de la anticipación de la Tc en los segmentos del grupo Con, Sham y Lx-NSQ. En el grupo Con, la intensidad de la anticipación en el cambio de la temperatura fue significativamente mayor en el 1°, 2° y 3° segmento con relación al cambio de temperatura del 4° y 5° segmento (Tabla 3). En lo que refiere al grupo Sham, la intensidad del componente anticipatorio de la temperatura del 1° y 2° segmento fue significativamente mayor que el 5° segmento, mientras que el 3° segmento mostró ser diferencia significativamente mayor con relación al 4° y 5° segmento (Tabla 3).

Finalmente en el grupo Lx-NSQ, sólo la intensidad de la anticipación del 1° y 2° segmento fue significativamente mayor con respecto a la intensidad del 5° segmento (Tabla 3).

Tabla 3. Intensidad de la anticipación de la temperatura corporal de conejos intactos (Con), lesiones falsas (Sham) y lesiones totales de núcleo supraquiasmático (Lx-NSQ), previo al amamantamiento ó acceso al alimento. Los datos se presentan por segmento, en donde el 1° segmento abarca del día postnatal (P) P5 al P9, el 2° segmento del P10 al P14, el 3° segmento del P15 al P16 (ayuno), el 4° segmento del P17 al P19 y el 5° segmento del P20 al P29. Media \pm error estándar, prueba post hoc Bonferroni/Dunn.

Grupo	Segmento	Temperatura (°C)	Diferencia significativa vs segmento (os)	<i>p</i>	
Con	1	0.32 \pm 0.03	4	<0.005	
			5	<0.0001	
	2	0.28 \pm 0.03	4	<0.05	
			5	<0.0001	
	3	0.30 \pm 0.05	4	<0.05	
			5	<0.005	
	4	0.18 \pm 0.02			
	5	0.14 \pm 0.01			
	Sham	1	0.26 \pm 0.03	5	<0.005
		2	0.23 \pm 0.03	5	<0.05
3		0.33 \pm 0.04	4	<0.05	
			5	<0.0005	
4		0.21 \pm 0.02			
5		0.16 \pm 0.02			
Lx-NSQ	1	0.27 \pm 0.05	5	<0.005	
	2	0.24 \pm 0.02	5	<0.05	
	3	0.23 \pm 0.04			
	4	0.21 \pm 0.03			
	5	0.17 \pm 0.02			

6.3 Actividad locomotora

6.3.1 Promedio diario de la actividad locomotora

En el promedio diario de la AcL registrada durante los 25 días que duró el protocolo de investigación, el análisis de varianza reveló un efecto tanto de la edad, como el tratamiento (Grupo: $F_{(2,375)}=35.7$, $p<0.0001$; Edad: $F_{(24,375)}=11.3$, $p<0.001$; Interacción: $F_{(48,375)}=0.3$, $p=0.9$). En relación a la edad se observó una disminución significativa de la actividad, conforme a la edad de los animales (Fig. 17). Inicialmente, la AcL promedio para el grupo control fue de 58 ± 2.3 movimiento por cada 5 minutos (mov/5 min), para el grupo Sham fue de 66 ± 5.3 mov/5 m y en el grupo Lx-NSQ fue de 62.3 ± 5.5 mov/5 m (Fig. 17). Al finalizar el protocolo, el promedio de la AcL en los conejos del grupo Con fue de 40 ± 1.1 mov/5 min; los del grupo Sham fue de 46 ± 4.4 mov/5 min y del grupo Lx-NSQ fue de 40 ± 4.3 movimientos por cada 5 minutos. En cuanto a los grupos bajo estudio, el análisis de varianza reveló diferencias significativas en la AcL que exhibieron los grupos bajo estudio, en donde el grupo Con y Lx-NSQ mostraron estrechas similitudes, pero en el grupo Sham mostró mayores niveles de actividad en relación a los dos grupos antes mencionados, esto fue evidente a partir del día postnatal 18 al 29 (Fig. 17).

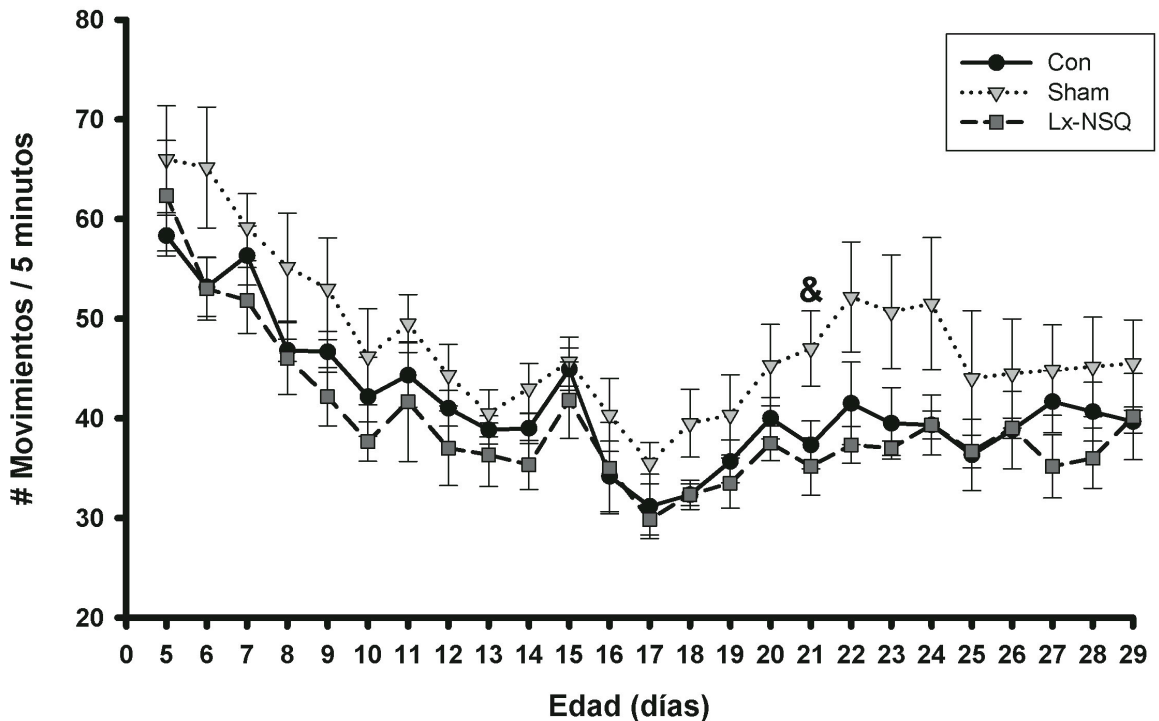


Figura 17. Promedio diario de la actividad locomotora del día postnatal 5 a 20 de conejos intactos (Con, n=6), con lesión falsa (Sham, n=6) y con lesión completa de núcleo supraquiasmático (Lx-NSQ, n=6). Media \pm error estándar, & indica diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el grupo Sham vs el grupo Lx-NSQ.

6.3.2 El patrón diurno de la actividad locomotora

En los actogramas obtenidos de los grupos Con y Sham se puede apreciar como la AcL se encuentra agrupada predominantemente cercana al momento del amamantamiento, este es evidente a partir del día P6 y perdura en los cuatro primeros segmentos además de los días en los que los conejos tuvieron acceso al alimento sólido (P20-22). Sin embargo, en los últimos siete días de registro (P23) el patrón de la AcL en estos mismo animales se presenta de manera diferente observándose un patrón de actividad bimodal (Fig. 18 y 19).

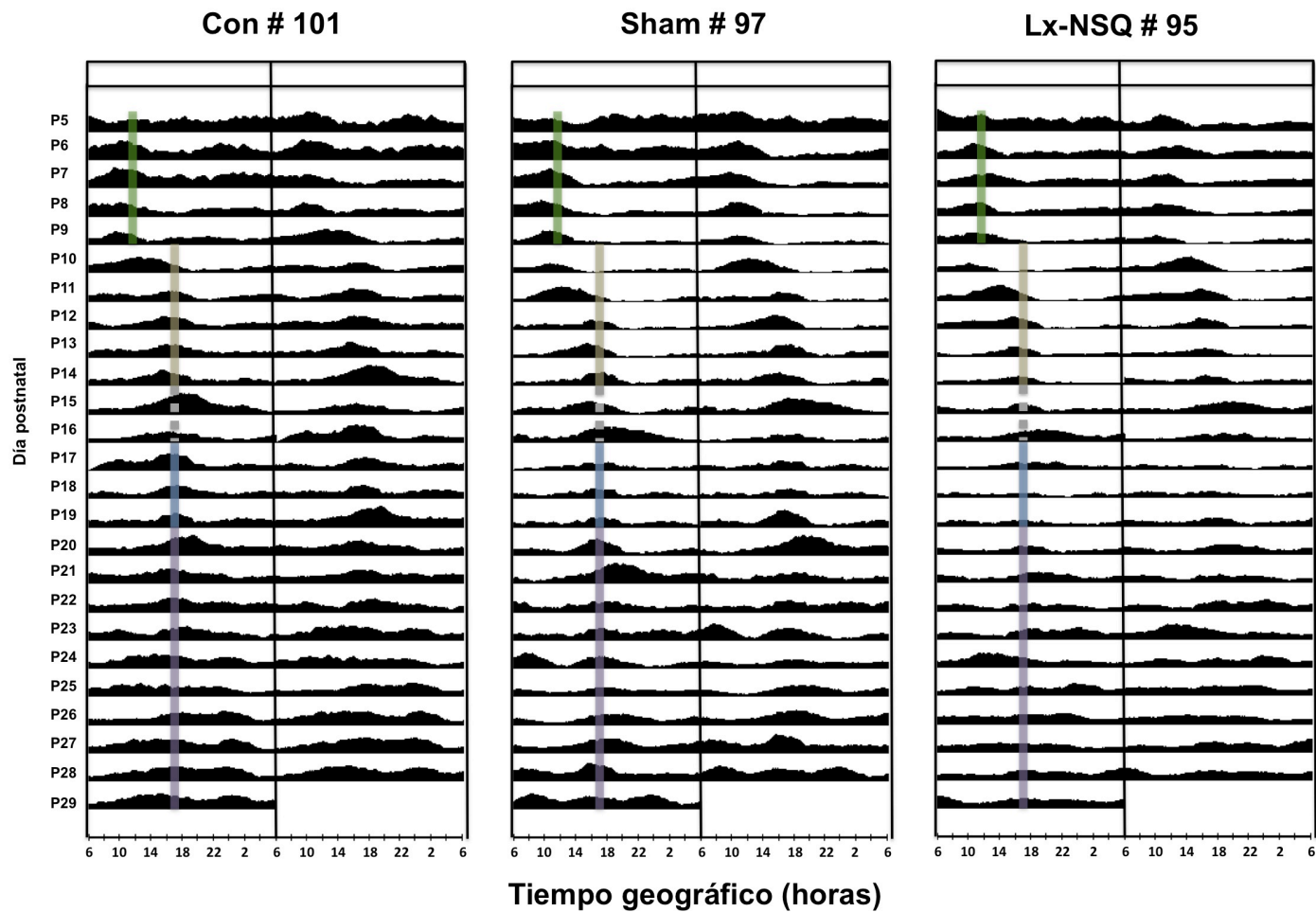


Figura 18. Actogramas representativos de actividad locomotora de los conejos intactos (Con, sujeto # 101), con lesiones falsas (Sham, sujeto # 97) y con lesiones completas de núcleo supraquiasmático (Lx-NSQ, sujeto # 95) registrados del día 5 al día 29 postnatal (P). Las barras superiores en blanco de cada actograma indican las condiciones de luz continua en dos lapsos de 24 horas. Las líneas transversales de colores representan el segmento y el momento del acceso al amamantamiento ó alimentación sólida donde el segmento 1 abarca del día P5 al día P9, donde el amamantamiento sucedió a las 11:30 horas y está representado por la línea verde; el segmento 2 incluye del día P10 al día P14 y está esquematizado por la línea dorada donde el amamantamiento ocurrió a las 17:00 horas; el segmento 3 comprende los días P15 y P16 y está representado por la línea gris punteada donde el amamantamiento fue omitido; la línea azul representa el segmento 4 y contiene del día P17 al día P19, donde el amamantamiento tuvo lugar a las 17:00 horas; por último la línea morada indica que del día P20 al día P29, los conejos tuvieron acceso a alimento sólido a las 17:00 horas.

Cabe destacar que los animales que recibieron la lesión completa de NSQ, mostraron estrechas similitudes con los conejos de los grupos Con y Sham hasta el tercer segmento, en los segmentos subsecuentes el patrón de la AcL generada alrededor de amamantamiento comienza a perderse de manera considerable en comparación con los conejos de los grupos antes mencionados (Fig. 18 y 19).

Figura 19. Patrón diario de la actividad locomotora de conejos representativos del grupo de conejos intactos (Con), con lesiones falsas (Sham) y con lesiones totales de núcleo supraquiasmático (Lx-NSQ). El registro de dicho parámetro se realizó del día postnatal (P) P5 al P29 de edad. La línea transversal de color indica el segmento y el momento de acceso al amamantamiento ó alimento sólido. La línea horizontal punteada en cada gráfica indica el promedio de temperatura presente en el día. El segmento 1 está representado por la línea verde y abarca del día P5 al día P9, donde el amamantamiento sucedió a las 11:30 horas; el segmento 2 está esquematizado por la línea dorada e incluye del día P10 al día P14, donde el amamantamiento ocurrió a las 17:00 horas; el segmento 3 está representado por la línea gris punteada y comprende los días P15 y P16 donde el amamantamiento fue omitido; la línea transversal azul representa el segmento 4 y contiene del día P17 al día P19, donde el amamantamiento tuvo lugar a las 17:00 horas; por último la línea morada indica que del día P20 al día P29, los conejos tuvieron acceso a alimento sólido a las 17:00 horas.

En el análisis de las frecuencias presentes en el patrón temporal de AcL de los conejos de los tres grupos bajo estudio, la transformada rápida de Fourier revelo que todos los animales presentaron el componente de 24 horas en los diferentes segmentos bajo estudio, sin embargo la presencia de esta frecuencia se fue modificando conforme a la edad de los animales (Tabla 4, Fig. 20).

Tabla 4. Posición del componente de 24 horas de acuerdo al nivel de energía obtenidos mediante la transformada rápida de Fourier de las series de tiempo de la actividad locomotora de conejos intactos (Con), con lesiones falsas (Sham) y lesiones de núcleo supraquiasmático (Lx-NSQ). Fueron considerados intervalos de energía: 1-3^a, 4-6^a, 7-9^a y >10^a. Se cuantificó el número de animales por grupo en los que el componente de 24 horas estuvo presente de acuerdo al intervalo de energía para cada uno de los segmentos, donde el segmento 1 corresponde a los días postnatales (P) P5 a P9, el segmento 2 a los días P10 a P14, el segmento 3 de los días P15 a P16, el segmento 4 de los días P17 a P19 y el segmento 5 de los días P20 a P29.

Segmento	Posición de la frecuencia de 24 horas	Con				Sham				Lx-NSQ			
		1-3 ^a	4-6 ^a	7-9 ^a	>10 ^a	1-3 ^a	4-6 ^a	7-9 ^a	>10 ^a	1-3 ^a	4-6 ^a	7-9 ^a	>10 ^a
1		5	1	-	-	6	-	-	-	5	1	-	-
2		5	1	-	-	6	-	-	-	5	1	-	-
3		6	-	-	-	5	1	-	-	5	1	-	-
4		6	-	-	-	4	2	-	-	5	-	-	1
5		5	1	-	-	6	-	-	-	6	-	-	-

En los conejos del grupo Con, se encontró que la frecuencia de 24 horas estuvo presente dentro de las tres primeras frecuencias con mayor energía desde el segmento 1 en la mayoría de los animales, tendencia que se mantuvo durante los 25 días en los que se realizó el registro de dicho parámetro (Tabla 4, Fig. 19).

Una tendencia similar fue observada en el grupo de conejos a los que se les realizaron las lesiones falsas, en donde la frecuencia de 24 horas se encontró dentro de las tres frecuencias con mayor energía desde los primeros días de registro en la mayoría de los conejos de este grupo, tendencia que se mantuvo hasta el final del experimento (Tabla 4, Fig. 19). Finalmente, en el grupo de conejos que les fue realizada una lesión total de NSQ, se observó una tendencia similar en donde desde el segmento 1 al 5 el componente de 24 horas se encontraba dentro de las frecuencias de mayor energía en la mayoría de los animales (Tabla 4, Fig. 19).

Cabe destacar que durante los días P15-16 (segmento 3) en que los conejos no tuvieron acceso a la hembra lactante, en todos los casos la frecuencia de 24 horas persistió, indicando el origen endógeno de este ritmo a nivel conductual, en los grupos bajo estudio, incluyendo al que le fue eliminado el NSQ. (Tabla 4, Fig. 19).

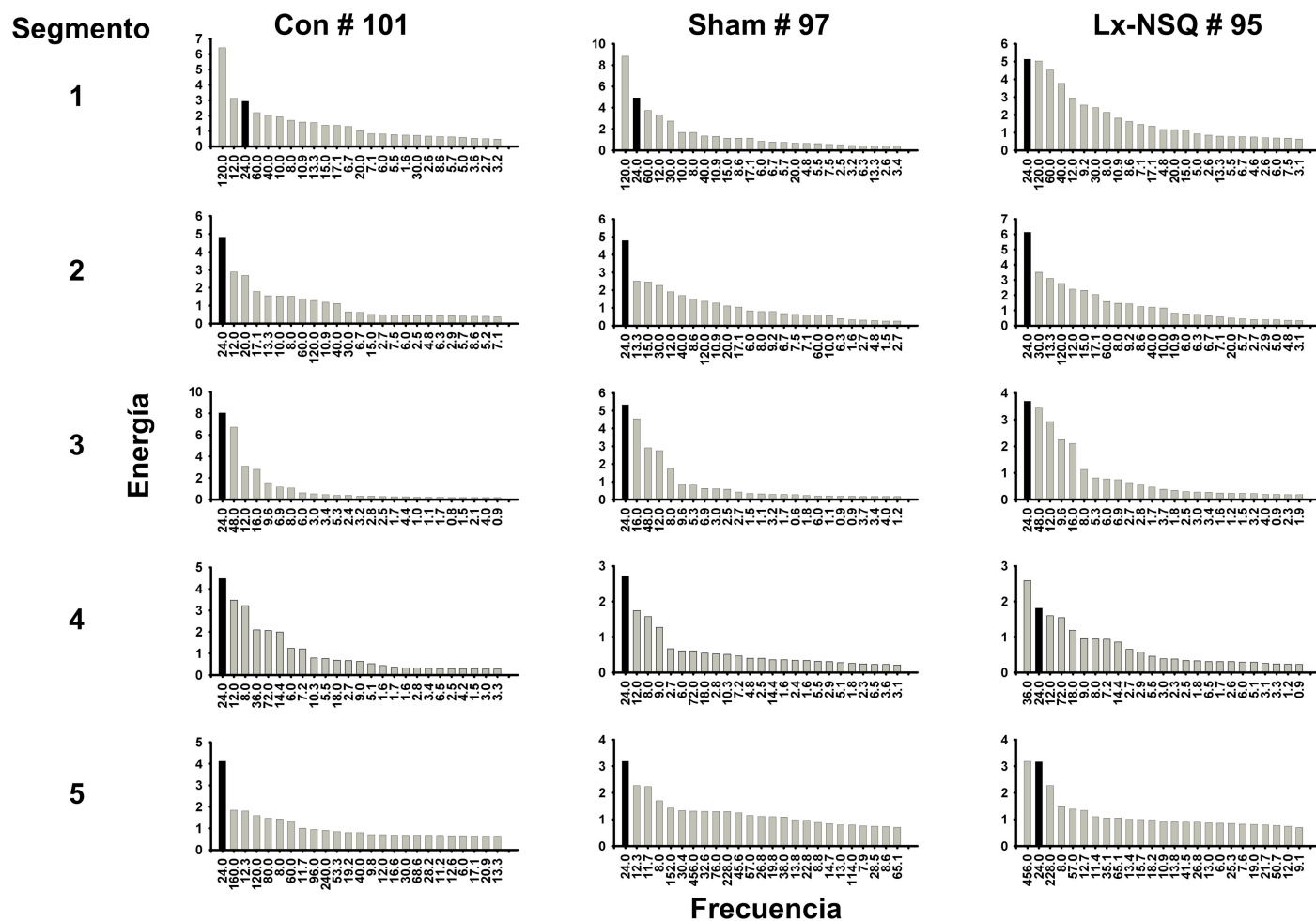


Figura 20. Gráficas representativas de las 25 frecuencias de mayor energía obtenidas por la transformada rápida de Fourier en el ritmo de la actividad locomotora de conejos intactos (Con, sujeto # 101), con lesiones falsas (Sham, sujeto # 97) y con lesiones completas de núcleo supraquiasmático (Lx-NSQ, sujeto # 95) analizados por segmento (columna izquierda). El segmento 1 se encuentra representado por los días postnatales 5 a 9, el segmento 2 por los días 10 a 14, el segmento 3 por los días 15 a 16 (ayuno), el segmento 4 por los días 17 a 19 y el segmento 5 por los días 20 a 29. La frecuencia de 24 está representada por la columna negra de cada gráfica.

6.3.3 Acrofase y nadir de la actividad locomotora

En el análisis de varianza realizado de las acrofases del ritmo diurno de la AcL revelo que la edad, tuvo un efecto significativo sobre este parámetro (Grupo: $F_{(2,435)}= 0.9$, $p= 0.4$; Edad: $F_{(4,435)}= 20.6$, $p<0.0001$; Interacción: $F_{(8,435)}= 1.3$, $p= 0.2$). De la misma forma, únicamente fue observado un efecto significativo de la edad, sobre el momento en que ocurrió el nadir del ritmo de AcL (Grupo: $F_{(2,375)}= 0.26$, $p=0.8$; Edad: $F_{(24,375)}= 1.9$, $p<0.006$; Interacción: $F_{(48,375)}= 0.6$, $p= 0.9$).

En los conejos del grupo Con durante los primeros ciclos del segmento 1, tanto el acrofase como el nadir exhibieron gran inestabilidad. Para los días P7-9 la acrofase ocurrió aproximadamente 19 ± 64 minutos previos al amamantamiento y en los mismos días el nadir sucedió aproximadamente 487 ± 91 minutos posterior a este (Fig. 21). En el segundo segmento, inicialmente la acrofase mostró algunos ciclos transitorios, esta se ajustó al nuevo horario de amamantamiento en los días P13-14 aconteciendo 45 ± 11 minutos antes del amamantamiento. Un patrón similar fue observado en el nadir el cual se ajustó a partir del día P12, ocurriendo 321 ± 48 minutos posteriores a este.

Durante los ciclos de ayuno (segmento 3) en el grupo de conejos intactos se observó que la acrofase se retrasó, esta ocurrió 120 ± 87 minutos posteriores al momento en el que originalmente fueron amamantados los conejos. En cuanto al nadir, este exhibió inestabilidad durante estos ciclos. En el segmento 4, se observó que la acrofase se reajusta al momento del amamantamiento, ocurriendo 12 ± 36 minutos previos al mismo, mientras el nadir mostro inestabilidad (Fig. 21).

Finalmente, en el segmento 5 los sujetos del grupo Con durante los cuatro primeros ciclos la acrofase sucedió 111 ± 128 minutos después del acceso al alimento, sin embargo a partir de P25 la acrofase comenzó a retrasarse de forma espontánea hasta estabilizarse en los dos últimos ciclos, ocurriendo 350 ± 38 minutos después de la administración del alimento. Por otra parte, el nadir se presenta inestable del día P20 a P26, pero a partir de P27 a P29 ajusto su fase ocurriendo 416 ± 2 minutos después del acceso al alimento (Fig. 21).

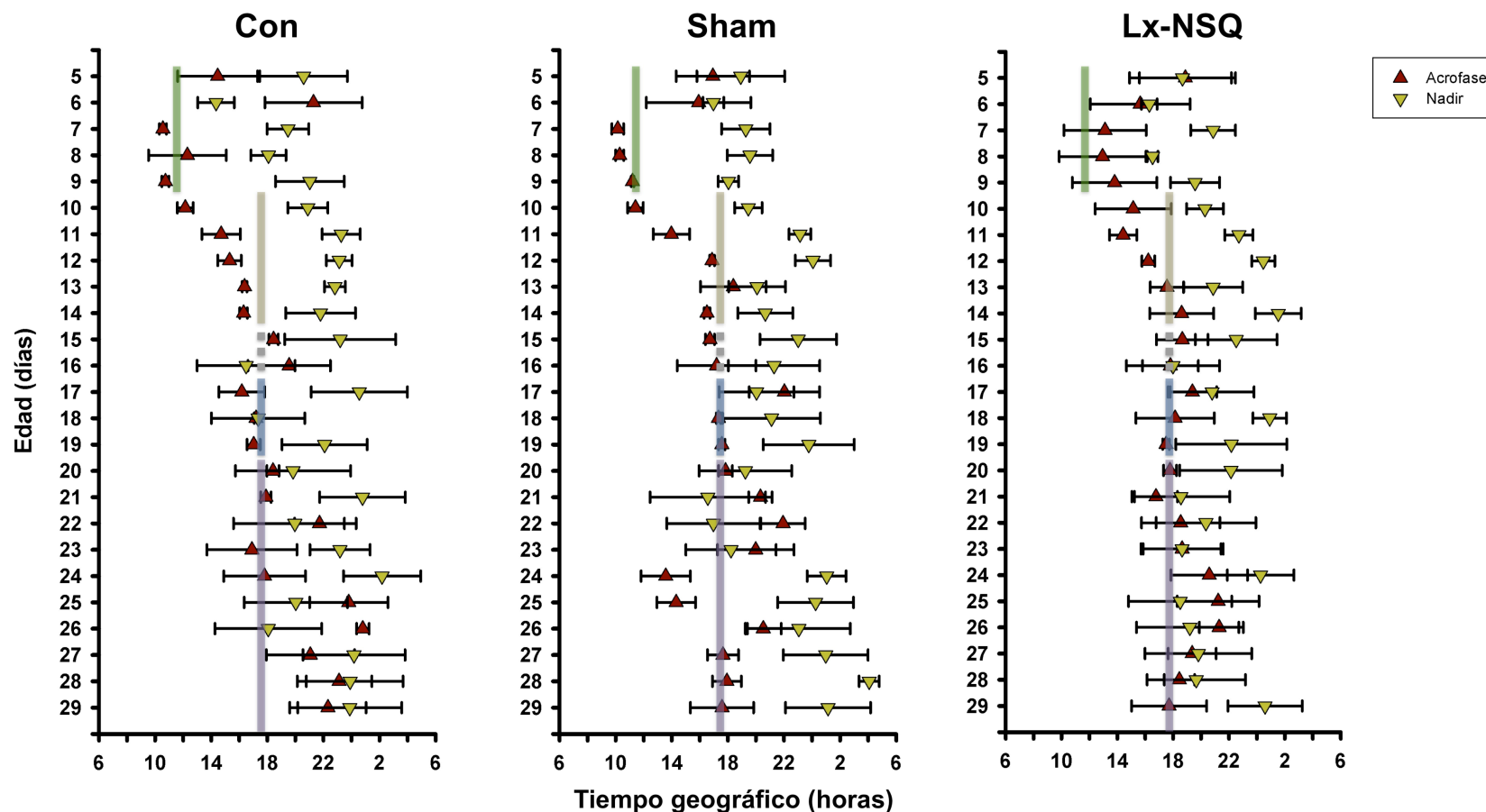


Figura 21. Promedio de la acrofase y el nadir de la actividad locomotora de los conejos de los grupos intactos (Con, n=6), con lesiones falsas (Sham, n=6) y con lesión completa de núcleo supraquiasmático (Lx-NSQ, n=6) durante los 25 días de registro. La acrofase está representada en triángulos rojos, mientras el triángulo verde invertido esquematiza el nadir. Las líneas verticales de color sobre las gráficas indican los segmentos y el horario en que los animales tuvieron acceso al amamantamiento ó alimentación controlada según el caso. El segmento 1 está indicado por la línea verde e incluye del día postnatal (P) P5 al día P9, donde el amamantamiento sucedió a las 11:30 horas; el segmento 2 abarca del día P10 al día P14 y está esquematizado por la línea dorada donde el amamantamiento ocurrió a las 17:00 horas; el segmento 3 incluye del día P15 al día P16 correspondiente al periodo de ayuno y está representado por la línea gris punteada; la línea azul representa el segmento 4 y contiene del día P17 al día P19, donde el amamantamiento sucedió a las 17:00 horas; finalmente, la línea morada indica que del día P20 al día P29, los conejos tuvieron acceso a alimento sólido a las 17:00 horas.

En los conejos del grupo Sham, se observó una relación de fase similar a lo observado en el grupo Con. En el segmento 1, inicialmente la acrofase ocurrió alrededor de 299 ± 51 minutos posteriores al amamantamiento y a partir de P7 esta se ajustó ocurriendo aproximadamente 65 ± 38 minutos antes del amamantamiento. Para el segmento 2, ante el cambio de horario de amamantamiento, la acrofase muestra dos ciclos transitorios (P10-11) y posterior a estas la fase se estabilizó sucediendo 20 ± 65 minutos posteriores al amamantamiento. El nadir presentó un patrón similar donde durante P10-11 tienen lugar los ciclos transitorios y a partir de P13-14, se ajustó la fase al nuevo horario de amantamiento ocurriendo 207 ± 31 minutos después del acceso a la hembra lactante (Fig.21). En el periodo de ayuno (segmento 3), en los conejos del grupo Sham se observó que la acrofase se mantuvo estable, de tal forma que esta sucedió 7 ± 87 minutos antes de la llegada de la hembra, mientras que el nadir ocurrió 310 ± 128 minutos después al horario previo de amamantamiento. Durante el segmento 4, la acrofase inicialmente muestra inestabilidad ocurriendo alrededor de 307 ± 154 minutos posteriores al amamantamiento, pero a partir de P18 esta se estabilizó sucediendo 27 ± 18 minutos después del amamantamiento, mientras el nadir en los tres ciclos comenzó a retrasarse progresivamente ocurriendo en 281 ± 115 minutos después de la llegada de la hembra lactante (Fig. 21). Finalmente, para el segmento 5 en los sujetos del grupo Sham se observó que la acrofase ocurrió en diferentes momentos del ciclo, es hasta P27 cuando la acrofase se estabilizó aconteciendo 46 ± 11 minutos posteriores con relación al acceso al alimento. Mientras el nadir es ligeramente estable los primeros cuatro primeros ciclos de este segmento ocurriendo 174 ± 223 minutos en relación al acceso al alimento, posteriormente a partir de P24 el nadir es inestable (Fig. 21).

En lo que se refiere al grupo de conejos con lesiones completas de NSQ, se observó una tendencia similar a la observada en los grupos Con y Sham en lo que se refiere al control de fase por el amamantamiento y/o alimento sólido (Fig. 21).

En el segmento 1, los conejos del grupo Lx-NSQ se encontró que la acrofase fue inicialmente inestable y se ajustó a partir del día P7 ocurriendo 111 ± 29 minutos

posteriores al amantamiento, mientras que el nadir en promedio ocurrió 421 ± 55 minutos después de este (Fig. 21). En respuesta al retraso en el horario de amamantamiento (segmento 2), los sujetos de este grupo exhibieron inicialmente ciclos transitorios (P10-12) tanto en la acrofase, como en el nadir; a partir de P13 la acrofase se ajustó al nuevo horario de amamantamiento ocurriendo 75 ± 51 minutos después de este y el nadir a pesar de ser más inestable sucedió en promedio 346 ± 48 minutos posterior al acceso de la hembra lactante (Fig. 21). Durante los ciclos de ayuno (segmento 3), se observó que la acrofase se mantuvo estable de tal forma que aconteció 80 ± 79 minutos posteriores al momento en el que previamente tuvieron acceso a la hembra lactante. El nadir aunque inestable siguió presentándose posterior al horario de amamantamiento ocurriendo 195 ± 135 minutos, en relación al horario de amamantamiento previo (Fig. 21). En el segmento 4, la acrofase se mantiene estable sucediendo 80 ± 65 minutos posterior a la llegada de la hembra lactante, por el contrario el nadir fue inestable sucediendo en general 342 ± 103 minutos después del amamantamiento (Fig. 21). Por último, en el segmento 5, inicialmente (P20-23) la acrofase fue estable y ocurrió 63 ± 52 minutos posterior al acceso al alimento, a partir de P24-27 la acrofase se retrasa de forma importante ocurriendo 224 ± 59 minutos después del acceso al alimento sólido, es hasta los días P28-29 que se vuelve la acrofase ocurriendo 69 ± 32 minutos después del acceso al alimento. El nadir exhibió mayor estabilidad en este segmento sucediendo aproximadamente 139 ± 36 minutos después del acceso al alimento con excepción de dos ciclos (Fig. 21).

6.3.4 Duración de la anticipación de la actividad locomotora

En relación al tiempo en que los conejos de los diferentes grupos bajo estudio mostraron el componente anticipatorio, el análisis de varianza reveló un efecto significativo asociado a la edad (Grupo: $F_{(2,375)} = 2.0$, $p=0.1$; Edad: $F_{(24,375)} = 5.7$, $p<0.0001$; Interacción: $F_{(48,375)} = 0.9$, $p=0.7$), donde el grupo Con y Sham incrementaron la duración de la anticipación en relación con el grupo Lx-NSQ.

En el primer segmento la duración del componente anticipatorio fue similar entre los conejos de los grupos Con y Sham, en donde la anticipación duró 123 ± 14.4 y 138 ± 10.6 minutos respectivamente (Fig. 22). En contraste, los conejos del grupo Lx-NSQ mostraron una disminución significativa con respecto al grupo Sham ($F_{14,345} = 2.54$; $p < 0.001$) el cual fue de 99 ± 11.4 minutos (Fig. 22). Sin embargo, para el segundo segmento, la duración de la anticipación de los tres grupos evaluados mostraron estrechas similitudes, donde los valores para el grupo Con, Sham y Lx-NSQ fueron de 91 ± 11.1 , 94 ± 11.2 y 98 ± 11.2 minutos respectivamente. Durante los ciclos de ayuno (segmento 3) de nueva cuenta los conejos de los grupos Con y Sham mostraron tendencias similares, en donde la anticipación mostró una duración de 182 ± 52.9 y 153 ± 16.3 minutos, respectivamente (Fig. 22). En contraste, los conejos del grupo Lx-NSQ mostraron una disminución significativa en la duración del componente anticipatorio con respecto al grupo Con, la cual fue $112. \pm 19.3$ minutos (Fig. 22). En el segmento 4, la duración fue de 111 ± 14.1 minutos para el grupo Con, 118 ± 2.1 minutos para el grupo Sham y 113 ± 17.7 minutos para el grupo Lx-NSQ. Finalmente la duración de la anticipación de la AcL en el segmento 5 fue similar entre los grupos bajo estudio, en donde la duración promedio fue de 91 ± 8.2 minutos para el grupo Con, 107 ± 6.6 minutos para el grupo Sham y 98 ± 9.1 para el grupo Lx-NSQ (Fig. 22).

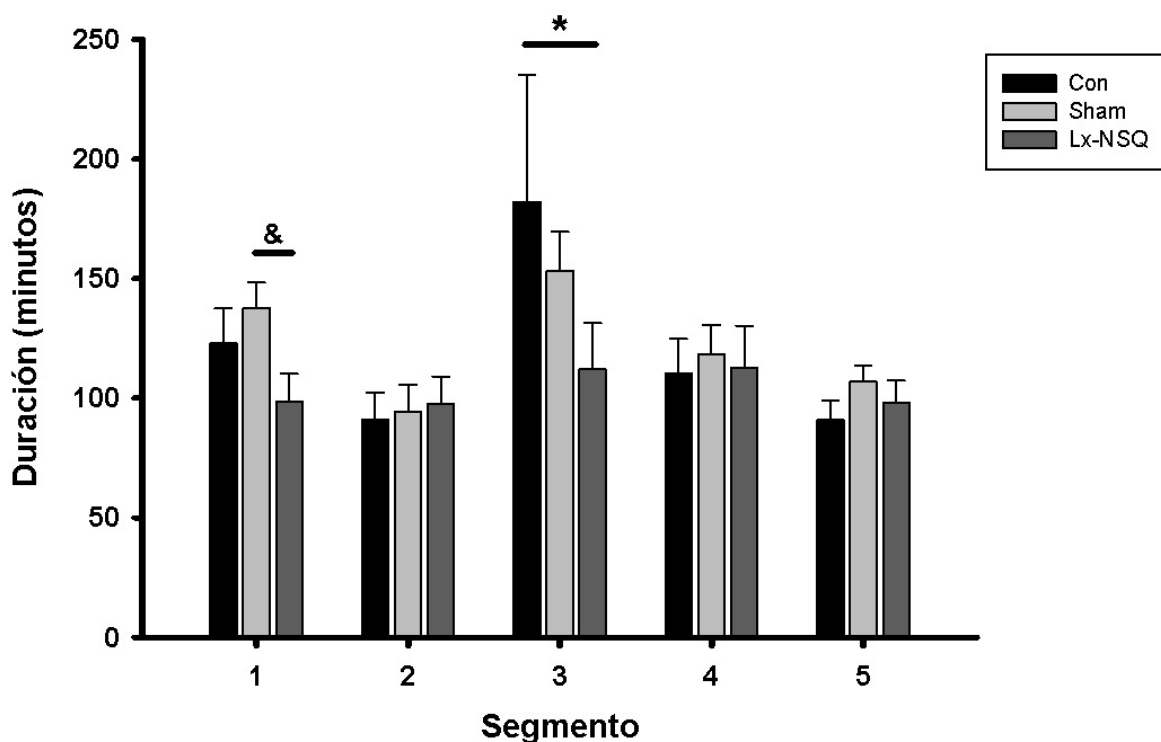


Figura 22. Duración de la anticipación de la actividad locomotora en las crías de conejo previo al amamantamiento ó acceso al alimento en los grupos intactos (Con, n=6), con lesiones falsas (Sham, n=6) y con lesiones totales de NSQ (Lx-NSQ, n=6). Los promedios fueron analizados por segmentos, en donde el segmento 1 corresponde a los días postnatales (P) P5 a P9, el segmento 2 a los días P10 a P14, el segmento 3 a los días P15 a P16, el segmento 4 a los días P17 a P19 y el segmento 5 a los días P20 a P29. Media \pm error estándar, prueba Bonferroni/Dunn. & Con vs Sham $p < 0.05$; * Con vs Lx-NSQ $p < 0.05$.

Adicionalmente, la prueba post hoc evidenció la existencia de diferencias significativas en la duración de la anticipación de la AcL en los segmentos dentro de los grupos Con y Sham. En el grupo Con, la duración de la anticipación del 1º segmento mostró tener diferencias significativas con relación al 3º y 5º segmento. Sin embargo, el 3º segmento fue el que presentó un incremento significativo en la duración de la anticipación de la AcL con respecto al 1º, 2º, 4º y 5º segmento (Tabla 5).

Tabla 5. Duración del incremento anticipatorio de la actividad locomotora de conejos intactos (Con), con lesiones falsas (Sham) y con lesiones totales de núcleo supraquiasmático (Lx-NSQ), previo al amamantamiento ó acceso al alimento. Los datos se presentan por segmento, donde el segmento 1 abarca del día postnatal (P) P5 al P9, el segmento 2 del día P10 al P14, el segmento 3 del día P15 al P16 (ayuno), el segmento 4 del día 17 al 19 y el segmento 5 del P20 al P29. Prueba post hoc Bonferroni/Dunn.

Grupo	Segmento	Minutos \pm E.E	Diferencia significativa vs segmento (os)	<i>p</i>
Con	1	123 \pm 14.4	3	<0.05
			5	<0.05
	2	91 \pm 11.1	3	<0.0001
	3	182 \pm 52.9	4	<0.0001
			5	<0.0001
	4	111 \pm 14.1		
	5	91 \pm 8.2		
Sham	1	138 \pm 10.6	2	<0.05
			5	<0.05
	2	94 \pm 11.2	3	<0.05
	3	153 \pm 16.3	5	<0.001
	4	118 \pm 12.1		
	5	107 \pm 6.6		
Lx-NSQ	1	99 \pm 11.4		
	2	98 \pm 11.2		
	3	112 \pm 19.3		
	4	113 \pm 17.7		
	5	98 \pm 9.1		

En el grupo Sham, la duración de la anticipación del 1º segmento fue significativamente mayor al 2º y 5º segmento, mientras que la duración del 2º segmento fue significativamente menor que la duración del 3º segmento pero este último fue significativamente mayor que la duración del 5º segmento (Tabla 5).

En contraste con el grupo Con y Sham, la duración de la anticipación en los segmentos del grupo Lx-NSQ no mostraron tener diferencias significativas entre los mismos donde en promedio, la duración de la anticipación de los cinco segmentos del grupo mencionado fue 111 \pm 14 minutos (Tabla 5).

6.3.5 Intensidad de anticipación de la actividad locomotora

En cuanto a la intensidad del componente anticipatorio, el análisis de varianza reveló efectos significativos tanto entre los diferentes grupos bajo estudio como asociados a la edad (Grupo: $F_{(2,435)}=6.9$, $p<0.001$; Edad: $F_{(4,435)}=4.3$, $p<0.001$; Interacción: $F_{(8,435)}=0.9$, $p=0.49$). En el primer segmento los grupos Con y Sham mostraron una tendencia similar en la intensidad de la anticipación, la cual fue de 16 ± 1.9 y 20 ± 1.5 movimientos, respectivamente. En contraste el grupo de conejos Lx-NSQ mostraron una disminución significativa en la intensidad de la anticipación con respecto al grupo Sham, la cual fue de 13 ± 1.5 movimientos (Fig. 23). En lo que respecta a los segmentos 2, 3 y 4 el análisis de varianza reveló que la intensidad de la anticipación mostraba estrechas similitudes entre los tres grupos bajo estudio. Finalmente, en el quinto segmento la intensidad de la anticipación del grupo Con y Lx-NSQ mostraron estrechas similitudes en la intensidad de la anticipación la cual fue de 11 ± 1.1 y 12 ± 1.3 movimientos, respectivamente. Fue de llamar la atención que los conejos del grupo Sham mostraron un aumento significativo en relación a los grupos Con y Lx-NSQ en este parámetro, el cual fue de 15 ± 1.0 movimientos (Fig. 23).

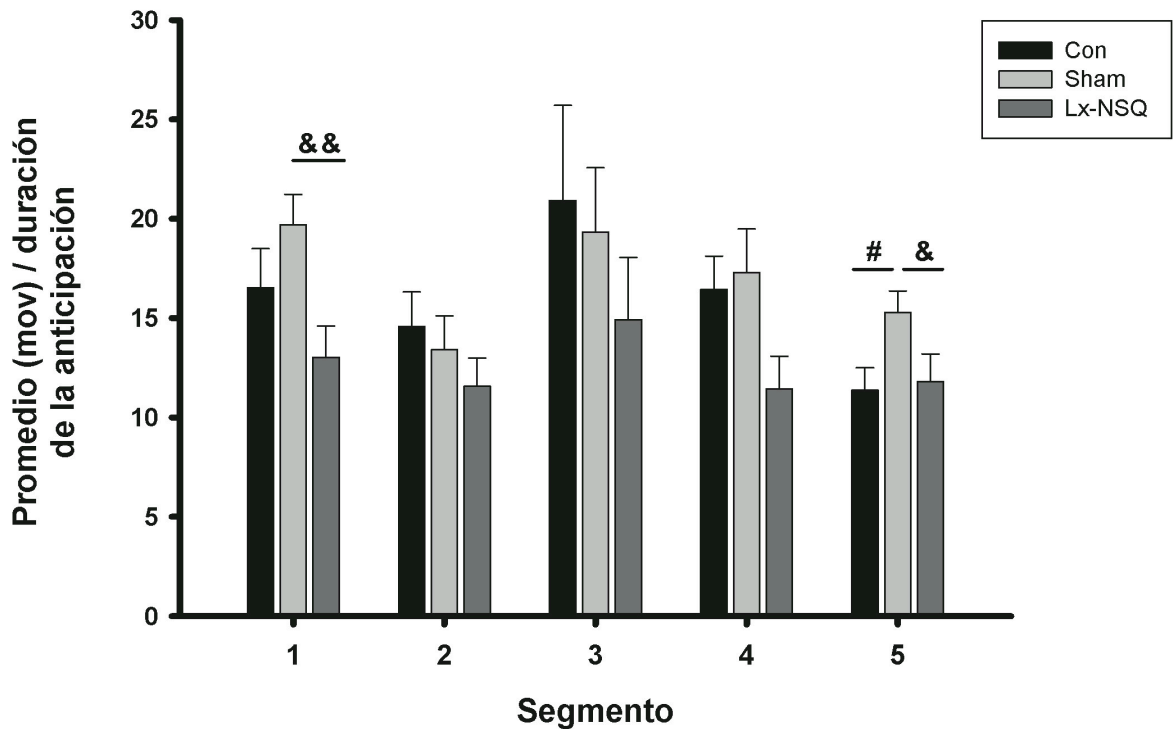


Figura 23. Promedio de la intensidad de la anticipación de la actividad locomotora en conejos intactos (Con, n=6), con lesiones falsas (Sham, n=6) y con lesiones totales de núcleo supraquiasmático (Lx-NSQ, n=6). Los promedios fueron obtenidos por segmentos en donde el segmento 1 corresponde a los días postnatales (P) P5 a P9, el segmento 2 a los días P10 a P14, el segmento 3 a los días P15 a P16, el segmento 4 a los días P17 a P19 y el segmento 5 a los días P20 a P29. Media \pm error estándar, prueba Bonferroni/Dunn. && Sham vs Lx-NSQ, $p < 0.0001$; # Con vs Sham, $p < 0.05$; & Sham vs Lx-NSQ $p < 0.05$.

Por último, el análisis post hoc mostró que existió una variación en la intensidad de la anticipación entre los segmentos del grupo Con y Sham. En el grupo Con, la intensidad de la anticipación del 1º segmento fue significativamente mayor que con relación a la intensidad del 5º segmento, mientras que la intensidad del 2º segmento es significativamente menor con respecto a la intensidad del 3º segmento, sin embargo tanto la intensidad de este último junto con la intensidad del 4º segmento son significativamente mayor con respecto a la intensidad del 5º segmento (Tabla 6).

En lo que se refiere al grupo Sham, únicamente la intensidad del 1º segmento mostró ser significativamente mayor que la intensidad del 2º y 5º segmento. De manera importante, la prueba post hoc en la intensidad de anticipación de la AcL del grupo Lx-NSQ reveló que no existieron diferencias significativas entre los segmentos de dicho grupo, por lo que a lo largo de los cinco segmentos el promedio de la intensidad de la anticipación de la AcL del grupo Lx-NSQ fue de 16 ± 1.4 (Tabla 6).

Tabla 6. Número movimientos cada 5 minutos durante la anticipación de la actividad locomotora de conejos intactos (Con), con lesiones falsas (Sham) y con lesiones totales de núcleo supraquiasmático (Lx-NSQ), previo al amamantamiento ó acceso al alimento. Los datos se presentan por segmento, donde el segmento 1 abarca del día postnatal (P) P5 al P9, el segmento 2 del día P10 al 1P4, el segmento 3 del día P15 al P16 (ayuno), el segmento 4 del día P17 al P19 y el segmento 5 del P20 al P29. Prueba post hoc Bonferroni/Dunn.

Grupo	Segmento	# mov/5 min	Diferencia significativa vs segmento (os)	<i>p</i>
Con	1	16 ± 1.9	5	<0.05
	2	14 ± 1.7	3	<0.05
	3	21 ± 4.7	5	<0.0001
	4	16 ± 1.6	5	<0.05
	5	11 ± 1.1		
Sham	1	20 ± 1.5	2 5	<0.001 <0.05
	2	13 ± 1.7		
	3	19 ± 3.2		
	4	17 ± 2.2		
	5	15 ± 1.0		
Lx-NSQ	1	13 ± 1.5		
	2	11 ± 1.4		
	3	15 ± 3.1		
	4	11 ± 1.6		
	5	12 ± 1.3		

V. DISCUSIÓN

La variación diaria de la Tc y los mecanismos de regulación de esta, forman parte de un proceso homeostático altamente eficiente y complejo, el cual además de involucrar al NSQ también colaboran otras estructuras del SNC, particularmente la participación de diferentes núcleos del hipotálamo, resaltando el área preóptica, el hipotálamo dorsomedial entre otras, así como estructuras periféricas tales como la piel, el tejido adiposo, el pelaje por mencionar algunas, las cuales permiten al organismo controlar y modificar su temperatura corporal con relación a la temperatura externa (Clapham, 2011; Morrison y Nakamura, 2011; Morrison *et al.*, 2008).

Actualmente, existen diversos estudios donde se ha analizado el efecto de las lesiones bilaterales en el patrón de expresión de la Tc (Abe *et al.*, 1979; Challet *et al.*, 1997b; Eastman *et al.*, 1984; Fuller *et al.*, 1981; Krieger *et al.*, 1977; Refinetti, 1995; Refinetti *et al.*, 1994; Satinoff y Prosser, 1988) y AcL (Refinetti *et al.*, 1994; Schwartz y Zimmerman, 1991; Stephan y Zucker, 1972), sin embargo, la gran mayoría de estos se han realizado en animales adultos eludiendo la importancia del sistema circadiano en la presentación del fenómeno anticipatorio de mamíferos altriciales en edades postnatales. Así, este es el primer estudio realizado en mamíferos en edades tempranas del desarrollo en los cuales se analizó el efecto de las lesiones bilaterales del NSQ sobre el fenómeno anticipatorio de la Tc y la AcL.

Con respecto a verificaciones histológicas de la lesiones electrolíticas realizadas en el NSQ, fue evidente que la tinción de Nissl fue la más adecuada para la identificación y delimitación de la extensión de la lesión del NSQ; esta técnica ha sido aplicada en diversos trabajos para identificar el NSQ de diversas especies, principalmente en ratas (Granados-Fuentes *et al.*, 2004a; Moore *et al.*, 2002; Van den Pol, 1980), ratones (Marchant y Mistlberger, 1997), hámsters (Refinetti, 1995; Silver *et al.*, 1990) y conejo (Caba *et al.*, 2008; Caldelas *et al.*, 2007).

Otra de las estrategias comúnmente empleada con este mismo fin, es la detección de neuronas inmuno-positivas para los péptidos que se encuentran comúnmente a lo largo del NSQ tales como los péptidos VIP y VP (Aguilar-Roblero *et al.*, 1992; Moore *et al.*, 2002; Palm *et al.*, 1999).

En el presente estudio adicionalmente utilizamos la detección de la proteína neuronal intranuclear NeuN como una estrategia para delimitar este núcleo hipotalámico, sin embargo, fue evidente que esta fue inadecuada para la corroboración de la presencia ó ausencia del NSQ de los conejos. Observaciones realizadas por Morin y colaboradores (2011), indican que la distribución de las neuronas inmuno-positivas a la proteína NeuN a lo largo del NSQ de ratones y hámsters adultos no es uniforme, éstas se encuentran densamente distribuidas en una alta proporción en las zonas centro-lateral y central del NSQ, extendiéndose dorsalmente hasta la región dorso-lateral del núcleo. De igual forma, esta distribución ha sido hallada en el NSQ de la rata (Geoghegan y Carter, 2008).

Cabe señalar que la síntesis de péptidos, organización y distribución celular a lo largo del NSQ varía entre especies (Morin, 2007), por lo que no se descarta que algunos tipos de neuronas del NSQ no expresen esta proteína de la misma manera que lo hacen otras áreas cerebrales tales como la corteza cerebral, tálamo, cerebelo entre otras (Mullen *et al.*, 1992), esta puede ser una razón por la que el anticuerpo contra la proteína NeuN en el NSQ de los conejos no resultó ser el mejor marcador neuronal, sin embargo, como ya se mencionó la tinción de Nissl evidenció la presencia o ausencia del NSQ en el grupo de conejos con lesión completa.

En relación a la ganancia diaria de peso, la lesión completa del NSQ realizada en los conejos neonatos no mostró tener algún efecto el peso registrado debido a que el peso corporal de los conejos del grupo Lx-NSQ mostró una tendencia similar a los animales del grupo Con y Sham. La ganancia de peso observada en los conejos chinchilla bajo estudio difirió con los resultados de los trabajos publicados por Gidenne y Fortun-Lamothe (2002), donde conejos menores de 25 días de edad consumen individualmente alrededor de 25-30 gramos de alimento

procesado por día. De acuerdo con las observaciones de Piattoni y colaboradores (1999) (revisado en Pascual, 2001), las crías que muestran un ligero consumo de alimento sólido no ingieren alimento procesado durante uno ó dos días cuando se realiza el cambio de alimentación exclusivamente a alimento sólido, esto afecta ligeramente su crecimiento sin ser un factor que ponga en riesgo la vida de los mismos. La diferencia entre el consumo de alimento encontrado en el estudio de Gidenne y Fortun-Lamothe (2002) y nuestros resultados pueden explicarse por la metodología empleada en el presente trabajo. El protocolo de destete temprano, el alimento empleado en la transición de amamantamiento a alimento sólido (Pascual, 2001) y el acceso controlado del mismo son los principales factores por los cuales probablemente los conejos de los grupos Con, Sham y Lx-NSQ tuvieron una mínima ó nula ganancia de peso entre los días 20 a 23.

Con respecto a la Tc promedio del grupo de conejos Lx-NSQ, Con y Sham registrada a lo largo de los 25 días en los que se llevó a cabo el protocolo, muestran estrechas similitudes entre los grupos bajo estudio por lo que la lesión completa de NSQ no tuvo efecto sobre la termo-regulación de conejos a edades tempranas del desarrollo, por lo que la Tc observada en los conejos chinchilla de los tres grupos coinciden a los publicados por Jilge (2000, 2001), además de los resultados en dicho parámetro en el reciente trabajo publicado por Trejo-Muñoz y colaboradores (2012), en estos, el rango de Tc promedio entre los días P2 a P4 fue menor a los 38°C. Adicionalmente, la lesión realizada en el NSQ de los conejos del presente experimento se efectuó a manera de dañar lo menos posible áreas hipotalámicas colindantes a dicho núcleo. La baja Tc de los neonatos al inicio del registro se explica en la escasa eficiencia que estos tienen para termorregular debido a las características con las que nacen tales como carencia de pelo, párpados y pabellones auriculares cerrados, motilidad reducida, además de contar con un SNC aún inmaduro (Bautista *et al.*, 2003; Hudson y Distel, 1982; Jilge y Hudson, 2001). En las primeras dos semanas, la Tc de los tres grupos experimenta un incremento gradual similar al reportado en las crías de conejos Nueva Zelanda y chinchilla (Jilge *et al.*, 2000, 2001; Trejo-Muñoz *et al.*, 2012).

Este mismo patrón se ha reportado en diferentes especies de mamíferos altriciales como la rata (Spiers y Adair, 1986), el hámster enano (Newkirk *et al.*, 1995) y primates (Mirmiran *et al.*, 2001), donde la temperatura incrementa significativamente durante las primeras etapas del desarrollo. De acuerdo a diversas observaciones, la estabilidad e incremento de temperatura en mamíferos altriciales está relacionado con un mayor aislamiento térmico del organismo, un aumento del volumen corporal con relación a la superficie y con el mejoramiento de la capacidad metabólica del individuo (Alberts, 1978; Bautista *et al.*, 2003; Jeddi, 1971; Spiers y Adair, 1986). La lesión completa de NSQ es posiblemente el motivo por el cual existió una ligera disminución en la Tc del grupo de conejos con Lx-NSQ aunque esta no fue significativa con respecto a los grupo Con y Sham, así lo sugiere investigaciones realizadas por Satinoff y Prosser (1988) donde lesiones electrolíticas bilaterales de NSQ de ratas modificaron la amplitud, la fase y la oscilación espontánea de la Tc. Sin embargo, esta disminución no es significativa lo cual concuerda con lo reportado en hámsters (Refinetti, 1995), ratas (Baker *et al.*, 2005) y mono ardilla (Fuller *et al.*, 1981), donde la lesión bilateral del NSQ no modificó significativamente en el promedio de la Tc con respecto a los animales control, lo cual indica que la lesión bilateral del NSQ no afecta a la respuesta termorregulatoria en conejos en desarrollo similar a lo ocurrido en la ratas adultas con lesión completa de NSQ (Wachulec *et al.*, 1997). Durante los ciclos en los que los conejos no tuvieron acceso a la hembra lactante. Se observó una disminución significativa en la Tc en los tres grupos de conejos bajo estudio, resultados que concuerdan con los trabajos realizados en conejos (Jilge *et al.*, 2000, 2001) y ratas (Challet *et al.*, 1997a) donde la disminución de la Tc fue más evidente después del primer ciclo de ayuno. La disminución de la Tc en los grupos bajo estudio se explica como un componente metabólico exógeno el cual es inducido por la ingesta de la leche de la hembra por parte de las crías (Jilge *et al.*, 2000, 2001), sin embargo, está documentado que el fenómeno anticipatorio por parte de la Tc en las crías de conejo persiste incluso durante 72 horas en ausencia de la señal sincronizadora (amamantamiento) (Jilge *et al.*, 2001).

Por otra parte, el análisis de Fourier determinó que el componente de 24 horas de la Tc de los conejos neonatos de cada grupo está presente a partir del 5 día de edad y que la lesión del NSQ no tiene efecto sobre la consolidación del componente del ritmo de 24 horas, siendo este similar al presentado con los grupos Con y Sham. Experimentos realizados por nuestro grupo de investigación (Trejo-Muñoz *et al.*, 2012) indican que conejos neonatos de la misma raza presentan el componente de 24 horas dentro de los primeros 5 días, sin embargo, tanto en dicho trabajo y los resultados aquí mostrados el componente de 24 horas se encuentra en las tres primeras frecuencias de mayor energía entre los días postnatales 9-10, otros estudios realizados únicamente con observaciones de los registros diarios del patrón de Tc, mostraron que dicho ritmo en conejos neonatos Nueva Zelanda está presente desde los primeros 4-5 días e incluso en algunos sujetos a los 2 días postnatales (Jilge *et al.*, 2000, 2001). De manera importante, el análisis de Fourier del grupo Lx-NSQ indica que el componente rítmico de 24 horas está presente durante el periodo de ayuno dentro de las tres primeras frecuencias de mayor energía (exceptuando un sujeto), estos resultados indican que los conejos neonatos con lesión completa de NSQ bajo condiciones constantes y con ausencia de la señal sincronizadora son capaces de generar de manera endógena el componente rítmico de 24 horas de la Tc. Adicionalmente, el componente de 24 horas es evidente en segmentos previos y posterior al ayuno donde la señal sincronizadora influye diariamente en la expresión rítmica de la Tc. En ambos casos, los resultados del presente experimento se suman a los trabajos publicados en ratas y monos ardillas adultos en los cuales lesiones bilaterales de NSQ no afectan el ritmo de Tc ya sea en ciclos de iluminación constante (Fuller *et al.*, 1981; Satinoff y Prosser, 1988) así como en un ciclo de L:O (Dunn *et al.*, 1977; Powell *et al.*, 1980). Sin embargo, existen reportes en la literatura en los que se abole la ritmicidad en la Tc por la lesión completa de NSQ (Abe *et al.*, 1979; Eastman *et al.*, 1984; Refinetti, 1995). Por otra parte, el análisis matemático empleado en el presente trabajo permitió establecer con mayor precisión la fase (acrofase y nadir), la duración e intensidad de anticipación del ritmo de Tc y AcL.

En lo que respecta a la acrofase y nadir del patrón diurno de Tc, la acrofase de los animales de los tres grupos fue la que tuvo una mejor respuesta ante el cambio de la fase del amamantamiento, lo cual coincidió con los trabajos realizados por Jilge y colaboradores (2000, 2001), en los cuales las crías de conejo amamantados originalmente a un horario ya establecido cambiaron su fase cuando este les fue modificado con una diferencia de 2 horas de retraso.

Actualmente no existen otros estudios de el efecto de las lesiones bilaterales del NSQ en la Tc en mamíferos en desarrollo, bajo un régimen de acceso a alimento sólido controlado. Sin embargo, observaciones en ratas adultas con lesión completa de NSQ bajo un régimen de restricción de alimento (Krieger *et al.*, 1977) asemejan el incremento anticipatorio hallado en nuestros conejos horas previas a la llegada de la hembra lactante. Los efectos observados tanto en la sincronización entre el amamantamiento y el alimento sólido, así como la duración de la anticipación e intensidad pueden estar relacionadas principalmente a la ontogenia así como a las características físicas y químicas de cada señal sincronizadora además de la relevancia que cada una de estas señales posee para los conejos. Por ejemplo, el amamantamiento implica para los conejos neonatos una serie de estímulos sensoriales que involucra el olfato (Coureaud *et al.*, 2008), la temperatura, el tacto, la presión (Pacheco-Cobos *et al.*, 2003), el gusto (Bautista *et al.*, 2008) entre otros, además del aporte nutricional que involucra la ingesta de la leche (Anderson *et al.*, 1975). Por otra parte, el alimento sólido también juega un papel importante en el crecimiento del animal debido a que la etapa posterior al destete es la principal fuente de nutrientes (Scapinello *et al.*, 1999). Esto demuestra que el sistema circadiano de los conejos en desarrollo responde de manera eficiente ante las señales maternas como las que engloba el amamantamiento y al alimento sólido; la primera y posiblemente la más importante para el sistema circadiano, involucra el amantamiento el cual significa en gran medida la supervivencia y desarrollo de los conejos en etapas pre-visuales (Coureaud *et al.*, 2000).

Nuestros datos sugieren que el proceso de ontogenia juega un papel de adaptación muy importante dentro de la etapa de desarrollo tanto de los osciladores y órganos centrales como de los periféricos (Weinert, 2005). Así mismo, la ingesta restringida de alimento involucra un mecanismo metabólico complejo el cual repercute sobre el sistema circadiano modificando la variación diaria de temperatura evidenciando que el NSQ no es la única estructura que puede generar la fluctuación rítmica de la Tc (Krieger *et al.*, 1977).

En relación a la actividad locomotora, nuestros conejos evidenciaron una considerable disminución en el promedio de AcL durante las primeras dos semanas de desarrollo, posteriormente los niveles de AcL se estabilizaron; en conejos Nueva Zelanda se ha reportado un patrón similar donde alrededor del día 5 la AcL comienza a disminuir paulatinamente hasta mostrar una estabilidad en los últimos tres días de registro (Oakley y Plotkin, 1975). Por otra parte, se observó un marcado incremento en la actividad de los tres grupos de conejos en el día P15, el cual correspondió al primer ciclo donde el amamantamiento fue omitido. Estudios realizados en ratas de 9, 18 y 33 semanas de edad bajo un ciclo L:O (Koubi *et al.*, 1991), y en O:O (Challet *et al.*, 1997a) confirman que el ayuno modifica el patrón de la AcL incrementando la tasa de movimiento, observaciones que sugieren que el organismo sufre diversos cambios metabólicos, como la movilización y uso de lípidos, así como la uso de nitrógeno el cual coincide con el incremento de la AcL (Koubi *et al.*, 1991). Esta evidencia indica que probablemente los cambios metabólicos inducidos por el ayuno, modifican el patrón de la AcL de los conejos en desarrollo causando una hiperactividad.

Con respecto a la presentación del componente de 24 horas de la AcL, los resultados del análisis de Fourier demuestran que la lesión completa del NSQ no tiene ningún efecto sobre el patrón diurno observado en los animales de los tres grupos. En la mayoría de los animales el componente de 24 horas se presentó entre las tres primeras frecuencias de mayor energía a partir del segundo segmento, es decir a partir del día 10 de edad.

Estos resultados concuerdan con lo previamente descrito en conejos Himalaya (Jilge, 1993b) donde el ritmo de la AcL es evidente a partir del día P5. En comparación con el desarrollo de otros mamíferos tales como los roedores, la presencia del ritmo de la AcL difiere ampliamente entre especie. En ratas Sprague-Dawley la ritmicidad es evidente hasta el día P15, mientras en ratas Long Evans esta se establece entre los días P5 a P10 (Anderson y Smith, 1987; Smith y Anderson, 1984) y en crías de hámsters fue evidente entre los días P18 a P20 (Davis y Gorski, 1985). Ante lo descrito, la expresión del ritmo de 24 horas de la AcL se presenta en diferentes etapas del desarrollo con respecto a cada especie. En comparación, los conejos en desarrollo presentan de manera más temprana el componente rítmico de 24 horas en comparación a las otras especies. Con respecto a la acrofase y nadir de los animales del grupo Lx-NSQ la lesión no tuvo efecto sobre ambas fases durante los cuatro primeros segmentos, por lo que principalmente la acrofase de los tres grupos fue la que mejor se ajustó ante los cambios de fase durante el breve lapso del amamantamiento y esta respondió similar a lo que ocurre en ratas adultas con lesiones completas de NSQ sometidas a una restricción de alimento de 4 horas (Stephan y Becker, 1989).

Durante los ciclos en los que los conejos tuvieron acceso al alimento sólido la acrofase de la AcL de los animales de los grupos Con y Sham mostró inestabilidad lo cual puede deberse al efecto de enmascaramiento originado por el acceso restringido de 4 horas al alimento observado en algunos conejos adultos (Jilge, 1993a; Jilge *et al.*, 1987). Esta diversidad en la respuesta a la restricción del alimento también ha sido observada en monos ardilla adultos donde la AcL no logra sincronizarse al horario de acceso al alimento (Boulos *et al.*, 1989). Hörnicke y colaboradores (1984) concluyen que durante el acceso *ad libitum*, los ritmos circadianos de ingesta de comida, la excreción de heces duras y blandas, y la motilidad cecal es gobernada por un marcapaso en común, mientras que durante la restricción de alimento el patrón de excreción de heces duras es modificado en consecuencia de los efectos mecánicos y metabólicos de la digestión de la comida.

Un estudio realizado en ratas adultas determinó que el NSQ participa activamente en la sincronización por alimentación restringida, modulando la respuesta de estructuras corticolímbicas e hipotalámicas resultando en un incremento en la respuesta de la AcL, proceso que no sucede cuando el NSQ es eliminado (Angeles-Castellanos *et al.*, 2010). Por estas razones posiblemente la duración e intensidad de la anticipación de la AcL del los conejos Lx-NSQ exhibe diferencias significativas en comparación a los animales del grupo Con y Sham, independientemente de la señal sincronizadora (amamantamiento ó alimento sólido). Por lo que la lesión completa del tiene un efecto en la duración e intensidad de la AcL.

Adicionalmente, el componente circadiano persistió cuando el amamantamiento fue omitido, indicando que dicho componente es de origen endógeno.

Los resultados obtenidos durante el ayuno, coinciden con las observaciones realizadas precisamente en nuestro grupo de investigación donde el componente rítmico de la AcL persiste dos ciclos bajo condiciones constantes en ausencia de la señal sincronizadora (Trejo-Muñoz *et al.*, 2012). Hallazgos similares se encontraron en la AcL, ghrelina, ácidos grasos libres y corticosterona de conejos Nueva Zelanda de 7 días de edad, los cuales fueron expuestos a dos días de ayuno (Morgado *et al.*, 2010).

La presencia del componente de 24 horas y la persistencia del ritmo circadiano a nivel fisiológico y conductual en condiciones de ausencia de la señal cíclica ambiental en los conejos con lesión de NSQ indica la participación de uno ó más osciladores en la generación y modulación la expresión de diversos fenómenos rítmicos (Abe *et al.*, 2002; Dibner *et al.*, 2010; Herzog, 2007).

La identificación de oscilaciones de genes reloj en diversos tejidos extra-NSQ en particular en el bulbo olfatorio (Abe *et al.*, 2002; Granados-Fuentes *et al.*, 2004b), el núcleo dorsomedial del hipotálamo (Guilding *et al.*, 2009) y el hígado (Damiola *et al.*, 2000; Yamazaki *et al.*, 2000) sugieren ser algunos de los tejidos en participar en la expresión de diversos ritmos internos. Con respecto al BO, estudios recientes realizados en ratas proponen a esta área cerebral, como un

posible marcapaso funcional debido a que la expresión rítmica de los gen *Per1* no depende de la integridad del NSQ (Granados-Fuentes *et al.*, 2004a), adicionalmente trabajos realizados en nuestro grupo de investigación demuestran que el BO expresa ritmicidad en los genes *Per1*, *Cry1* y *Bmal1* mucho antes que el NSQ (Montúfar-Chaveznava *et al.*, 2012), de manera significativa la participación de la feromona 2-metilbut-2-enal presente en la leche materna tiene un papel importante en el la integración, procesamiento (Charra *et al.*, 2012) y respuesta conductual del conejo lactante (Montigny *et al.*, 2006), debido a esto, la interacción madre-cría tiene una relevancia fundamental en los conejos en desarrollo, por lo que es necesario establecer cual o cuales son las señales provenientes de la hembra así como identificar las vías aferentes y los osciladores extra-NSQ que participan en el procesamiento y generación de los fenómenos rítmicos de los conejos en edades tempranas del desarrollo.

En lo que se refiere al núcleo dorsomedial del hipotálamo, ya se ha establecido que este participa en la AAA (Chou *et al.*, 2003). Estudios realizados en ratas adultas mencionan que esta área hipotalámica está relacionada con la expresión de genes reloj asociados al momento de acceso de alimento restringido (Mieda *et al.*, 2006), un patrón similar ocurre en la expresión de *Per1* en el núcleo dorsomedial de los conejos Nueva Zelanda de 7 días de edad (Caba *et al.*, 2008). Adicionalmente, un reciente experimento realizado en ratas adultas revela que la intensidad de la AAA inducida por restricción de alimento está dada entre la interacción del NSQ con el núcleo dorsomedial del hipotálamo, en este experimento se observó que la AAA de la AcL incrementa por la activación de neuronas que contienen GABA provenientes del núcleo dorsomedial del hipotálamo las cuales inhiben la actividad eléctrica del NSQ, permitiendo así un incremento en la actividad locomotora (Acosta-Galvan *et al.*, 2011).

VIII. CONCLUSIONES

- Nuestros resultados indican que el NSQ no es esencial para la expresión rítmica de la temperatura corporal y actividad locomotora, debido a que los conejos en desarrollo mantenidos en condiciones constantes y con lesión completa de dicho núcleo hipotalámico presentaron un patrón circadiano en dichos parámetros, similar a lo observado en los animales intactos.
- Las respuestas de fase no se vieron afectadas por las lesiones bilaterales de NSQ, ya que conejos con lesiones completas fueron capaces de ajustar la fase ante cambios en el horario de acceso a la hembra lactante, similar a lo observado en los conejos intactos.
- La ritmicidad circadiana en la temperatura y la actividad locomotora persistió en ausencia de la señal sincronizadora (amamantamiento) en los animales del grupo con lesiones completas. Lo cual indica por una parte que la integridad del NSQ no es indispensable en la generación de la ritmicidad de dichos parámetros y que otros osciladores están involucrados en el mantenimiento de la ritmicidad, en conejos en desarrollo.
- La lesiones completas del NSQ no tuvieron efecto en la ocurrencia del fenómeno anticipatorio al amamantamiento. Sin embargo, se observaron cambios en la duración e intensidad de la anticipación a nivel de la actividad locomotora lo cual sugiere que el NSQ participa en la modulación de estos parámetros.
- Durante el periodo de destete y alimentación sólida parece ocurrir una reorganización importante en la organización de la temperatura y la actividad locomotora, la cual posiblemente esté asociada a un cambio reostático a nivel fisiológico en los tres grupos bajo estudio, por lo que no se observaron efectos asociados a la lesión del NSQ.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Abe, K., Kroning, J., Greer, M.A., Critchlow, V., 1979, Effects of destruction of the suprachiasmatic nuclei on the circadian rhythms in plasma corticosterone, body temperature, feeding and plasma thyrotropin. *Neuroendocrinology* 29, 119-131.
- Abe, M., Herzog, E.D., Yamazaki, S., Straume, M., Tei, H., Sakaki, Y., Menaker, M., Block, G.D., 2002, Circadian rhythms in isolated brain regions. *J Neurosci* 22, 350-356.
- Acosta-Galvan, G., Yi, C.X., van der Vliet, J., Jhamandas, J.H., Panula, P., Angeles-Castellanos, M., Del Carmen Basualdo, M., Escobar, C., Buijs, R.M., 2011, Interaction between hypothalamic dorsomedial nucleus and the suprachiasmatic nucleus determines intensity of food anticipatory behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 5813-5818.
- Aguilar-Roblero, R., Drucker-Colin, R., Moore, R.Y., 1992, Behavioral and morphological studies of fetal neural transplants into SCN-lesioned rats. *Chronobiol Int* 9, 278-296.
- Aguilar-Roblero, R., Guadarrama, P., Mercado, C., Chavez, J., 2004, El núcleo supraquiasmático y la glándula pineal en la regulación de los ritmos circadianos en roedores, In: J., V.z.M. (Ed.) *Temas selectos de neurociencias III*. Universidad Autónoma Metropolitana, México, pp. 321-330.
- Aguilar-Roblero, R., Toledo, R., 2004, Tracto retinohipotalámico en el conejo. *Universidad y Ciencia* 20, 50-60.
- Alberts, J.R., 1978, Huddling by rat pups: group behavioral mechanisms of temperature regulation and energy conservation. *J Comp Physiol Psychol* 92, 231-245.
- Altman, J., Bayer, S.A., 1978, Development of the diencephalon in the rat. I. Autoradiographic study of the time of origin and settling patterns of neurons of the hypothalamus. *J Comp Neurol* 182, 945-971.

- Alvarez, P., Cardinali, D., Cano, P., Rebollar, P., Esquifino, A., 2005, Prolactin daily rhythm in suckling male rabbits. *J Circadian Rhythms* 3, 1.
- Anderson, R.R., Sadler, K.C., Knauer, M.W., Wippler, J.P., Marshall, R.T., 1975, Composition of cottontail rabbit milk from stomachs of young and directly from gland. *J Dairy Sci* 58, 1449-1452.
- Anderson, V.N., Smith, G.K., 1987, Effects of feeding and light cycles on activity rhythms of maternally isolated rat pups. *Physiol Behav* 39, 169-181.
- Angeles-Castellanos, M., Mendoza, J., Escobar, C., 2007, Restricted feeding schedules phase shift daily rhythms of c-Fos and protein Per1 immunoreactivity in corticolimbic regions in rats. *Neuroscience* 144, 344-355.
- Angeles-Castellanos, M., Salgado-Delgado, R., Rodriguez, K., Buijs, R.M., Escobar, C., 2010, The suprachiasmatic nucleus participates in food entrainment: a lesion study. *Neuroscience* 165, 1115-1126.
- Antle, M.C., Silver, R., 2009, Neural basis of timing and anticipatory behaviors. *Eur J Neurosci* 30, 1643-1649.
- Aton, S.J., Colwell, C.S., Harmar, A.J., Waschek, J., Herzog, E.D., 2005, Vasoactive intestinal polypeptide mediates circadian rhythmicity and synchrony in mammalian clock neurons. *Nat Neurosci* 8, 476-483.
- Bae, K., Jin, X., Maywood, E.S., Hastings, M.H., Reppert, S.M., Weaver, D.R., 2001, Differential functions of mPer1, mPer2, and mPer3 in the SCN circadian clock. *Neuron* 30, 525-536.
- Baker, F.C., Angara, C., Szymusiak, R., McGinty, D., 2005, Persistence of sleep-temperature coupling after suprachiasmatic nuclei lesions in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289, R827-838.
- Balsalobre, A., 2002, Clock genes in mammalian peripheral tissues. *Cell Tissue Res* 309, 193-199.
- Balsalobre, A., Brown, S.A., Marcacci, L., Tronche, F., Kellendonk, C., Reichardt, H.M., Schutz, G., Schibler, U., 2000a, Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science* 289, 2344-2347.

- Balsalobre, A., Damiola, F., Schibler, U., 1998, A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* 93, 929-937.
- Balsalobre, A., Marcacci, L., Schibler, U., 2000b, Multiple signaling pathways elicit circadian gene expression in cultured Rat-1 fibroblasts. *Curr Biol* 10, 1291-1294.
- Bartell, P.A., Miranda-Anaya, M., Menaker, M., 2004, Period and phase control in a multioscillatory circadian system (Iguana iguana). *J Biol Rhythms* 19, 47-57.
- Bass, J., 2011, Physiology: On time metabolism. *Nature* 480, 466-467.
- Bautista, A., Drummond, H., Martínez-Gomez, M., Hudson, R., 2003, Thermal benefit of sibling presence in the newborn rabbit. *Dev Psychobiol* 43, 208-215.
- Bautista, A., Martínez-Gómez, M., Hudson, R., 2008, Mother-young and within-litter relations in the european rabbit *Oryctolagus cuniculus*. *Lagomorph Biology* 3, 211-223.
- Berson, D.M., Dunn, F.A., Takao, M., 2002, Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* 295, 1070-1073.
- Bobrzynska, K.J., Mrosovsky, N., 1998, Phase shifting by novelty-induced running: activity dose-response curves at different circadian times. *J Comp Physiol A* 182, 251-258.
- Borgs, L., Beukelaers, P., Vandenbosch, R., Belachew, S., Nguyen, L., Malgrange, B., 2009, Cell "circadian" cycle: new role for mammalian core clock genes. *Cell Cycle* 8, 832-837.
- Boulamery-Velly, A., Simon, N., Vidal, J., Mouchet, J., Bruguierolle, B., 2005, Effects of three-hour restricted food access during the light period on circadian rhythms of temperature, locomotor activity, and heart rate in rats. *Chronobiol Int* 22, 489-498.
- Boulos, Z., Frim, D.M., Dewey, L.K., Moore-Ede, M.C., 1989, Effects of restricted feeding schedules on circadian organization in squirrel monkeys. *Physiol Behav* 45, 507-515.

- Boulos, Z., Terman, M., 1980, Food availability and daily biological rhythms. *Neurosci Biobehav Rev* 4, 119-131.
- Buhr, E.D., Yoo, S.H., Takahashi, J.S., 2010, Temperature as a universal resetting cue for mammalian circadian oscillators. *Science* 330, 379-385.
- Buijs, R.M., Kalsbeek, A., van der Woude, T.P., van Heerikhuize, J.J., Shinn, S., 1993, Suprachiasmatic nucleus lesion increases corticosterone secretion. *Am J Physiol* 264, 1186-1192.
- Buijs, R.M., Scheer, F.A., Kreier, F., Yi, C., Bos, N., Goncharuk, V.D., Kalsbeek, A., 2006, Organization of circadian functions: interaction with the body. *Prog Brain Res* 153, 341-360.
- Caba, M., Tovar, A., Silver, R., Mogado, E., Meza, E., Zavaleta, Y., Juárez, C., 2008, Nature's food anticipatory experiment: entrainment of locomotor behavior, suprachiasmatic and dorsomedial hypothalamic nuclei by suckling in rabbit pups. *Eur J Neurosci* 27, 432-443.
- Caldelas, I., 2000. Mecanismos implicados en el acoplamiento de los osciladores circadianos. Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal.
- Caldelas, I., Chimal-Monroy, J., Martínez-Gómez, M., Hudson, R., 2005, Non-photic circadian entrainment in mammals: A brief review and proposal for study during development. *Biol Rhythm Res* 36, 23-37.
- Caldelas, I., Gonzalez, B., Montúfar-Chaveznavá, R., Hudson, R., 2009, Endogenous clock gene expression in the suprachiasmatic nuclei of previsual newborn rabbits is entrained by nursing. *Dev Neurobiol* 69, 47-59.
- Caldelas, I., Tejadilla, D., Gonzalez, B., Montúfar, R., Hudson, R., 2007, Diurnal pattern of clock gene expression in the hypothalamus of the newborn rabbit. *Neuroscience* 144, 395-401.
- Cassone, V.M., Chesworth, M.J., Armstrong, S.M., 1986, Entrainment of rat circadian rhythms by daily injection of melatonin depends upon the hypothalamic suprachiasmatic nuclei. *Physiol Behav* 36, 1111-1121.

- Castillo, M.R., Hochstetler, K.J., Greene, D.M., Firmin, S.I., Tavernier, R.J., Raap, D.K., Bult-Ito, A., 2005, Circadian rhythm of core body temperature in two laboratory mouse lines. *Physiol Behav* 86, 538-545.
- Challet, E., Pevet, P., Malan, A., 1997a, Effect of prolonged fasting and subsequent refeeding on free-running rhythms of temperature and locomotor activity in rats. *Behav Brain Res* 84, 275-284.
- Challet, E., Pevet, P., Malan, A., 1997b, Lesion of the serotonergic terminals in the suprachiasmatic nuclei limits the phase advance of body temperature rhythm in food-restricted rats fed during daytime. *J Biol Rhythms* 12, 235-244.
- Charra, R., Datiche, F., Casthano, A., Gigot, V., Schaal, B., Coureaud, G., 2012, Brain processing of the mammary pheromone in newborn rabbits. *Behav Brain Res* 226, 179-188.
- Chou, T.C., Scammell, T.E., Gooley, J.J., Gaus, S.E., Saper, C.B., Lu, J., 2003, Critical role of dorsomedial hypothalamic nucleus in a wide range of behavioral circadian rhythms. *J Neurosci* 23, 10691-10702.
- Choudhury, B.P., 1978, Visual field representation in the newborn rabbit's cortex. *Brain Res* 153, 27-37.
- Clapham, J.C., 2011, Central control of thermogenesis. *Neuropharmacology*.
- Clarke, J.D., Coleman, G.J., 1986, Persistent meal-associated rhythms in SCN-lesioned rats. *Physiol Behav* 36, 105-113.
- Coureaud, G., Schaal, B., Coudert, P., Rideaud, P., Fortun-Lamothe, L., Hudson, R., Orgeur, P., 2000, Immediate postnatal sucking in the rabbit: its influence on pup survival and growth. *Reprod Nutr Dev* 40, 19-32.
- Coureaud, G., Thomas-Danguin, T., Le Berre, E., Schaal, B., 2008, Perception of odor blending mixtures in the newborn rabbit. *Physiol Behav* 95, 194-199.
- Daan, S., Aschoff, J., 2001, The Entrainment of Circadian Systems, In: Takahashi, J.S., Turek, F.W., Moore, R.Y. (Eds.) *Handbook of Behavioral Neurobiology. Circadian Clocks*. Kluwer Academic/Plenum., New York, pp. 7-43.

- Damiola, F., Le Minh, N., Preitner, N., Kornmann, B., Fleury-Olela, F., Schibler, U., 2000, Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev* 14, 2950-2961.
- Davidson, A.J., Menaker, M., 2003, Birds of a feather clock together-sometimes: social synchronization of circadian rhythms. *Curr Opin Neurobiol* 13, 765-769.
- Davidson, A.J., Yamazaki, S., Arble, D.M., Menaker, M., Block, G.D., 2008, Resetting of central and peripheral circadian oscillators in aged rats. *Neurobiol Aging* 29, 471-477.
- Davis, F.C., Gorski, R.A., 1985, Development of hamster circadian rhythms. I. Within-litter synchrony of mother and pup activity rhythms at weaning. *Biol Reprod* 33, 353-362.
- Davis, F.C., Mannion, J., 1988, Entrainment of hamster pup circadian rhythms by prenatal melatonin injections to the mother. *Am J Physiol* 255, 439-448.
- Díaz-Muñoz, M., Vazquez-Martínez, O., Aguilar-Roblero, R., Escobar, C., 2000, Anticipatory changes in liver metabolism and entrainment of insulin, glucagon, and corticosterone in food-restricted rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279, R2048-2056.
- Dibner, C., Schibler, U., Albrecht, U., 2010, The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annu Rev Physiol* 72, 517-549.
- Díez-Noguera, A., Cambras, T., Ribot, M., Torralba, A., 1989, Hereditary nature of the pattern of the motor activity circadian rhythm in mice. *Physiol Behav* 45, 307-311.
- Drucker-Colin, R., Aguilar-Roblero, R., Garcia-Hernández, F., Fernandez-Cancino, F., Bermudez Rattoni, F., 1984, Fetal suprachiasmatic nucleus transplants: diurnal rhythm recovery of lesioned rats. *Brain Res* 311, 353-357.
- Dunn, J.D., Castro, A.J., McNulty, J.A., 1977, Effect of suprachiasmatic ablation on the daily temperature rhythm. *Neuroscience Letters* 6, 345-348.

- Eastman, C.I., Mistlberger, R.E., Rechtschaffen, A., 1984, Suprachiasmatic nuclei lesions eliminate circadian temperature and sleep rhythms in the rat. *Physiol Behav* 32, 357-368.
- Escobar, C., Cailotto, C., Angeles-Castellanos, M., Delgado, R.S., Buijs, R.M., 2009, Peripheral oscillators: the driving force for food-anticipatory activity. *Eur J Neurosci* 30, 1665-1675.
- Escobar, C., Díaz-Muñoz, M., Encinas, F., Aguilar-Roblero, R., 1998, Persistence of metabolic rhythmicity during fasting and its entrainment by restricted feeding schedules in rats. *Am J Physiol* 274, R1309-1316.
- Escobar, C., Hudson, R., Martínez-Gomez, M., Aguilar-Roblero, R., 2000, Metabolic correlates of the circadian pattern of suckling-associated arousal in young rabbits. *J Comp Physiol A* 186, 33-38.
- Fanjul-Moles, M.L., Marcia, H., 2009, *Biología funcional de los animales. Aspectos neurofisiológicos*, Vol 2, 2 Edition México, 1-366 pp.
- Freedman, M.S., Lucas, R.J., Soni, B., von Schantz, M., Munoz, M., David-Gray, Z., Foster, R., 1999, Regulation of mammalian circadian behavior by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science* 284, 502-504.
- Fuller, C.A., Lydic, R., Sulzman, F.M., Albers, H.E., Tepper, B., Moore-Ede, M.C., 1981, Circadian rhythm of body temperature persists after suprachiasmatic lesions in the squirrel monkey. *Am J Physiol* 241, R385-391.
- Geoghegan, D., Carter, D.A., 2008, A novel site of adult doublecortin expression: neuropeptide neurons within the suprachiasmatic nucleus circadian clock. *BMC Neurosci* 9, 2.
- Gidenne, T., Fortun-Lamothe, L., 2002, Feeding strategy for young rabbits around weaning: a review of digestive capacity and nutritional needs. *Animal science (Penicuik, Scotland)* 75, 169-184.
- Gilbert, C., Blanc, S., Giroud, S., Trabalon, M., Le Maho, Y., Perret, M., Ancel, A., 2007, Role of huddling on the energetic of growth in a newborn altricial mammal. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293, R867-876.

- Gillette, M.U., Reppert, S.M., 1987, The hypothalamic suprachiasmatic nuclei: circadian patterns of vasopressin secretion and neuronal activity in vitro. *Brain Res Bull* 19, 135-139.
- Granados-Fuentes, D., Ben-Josef, G., Perry, G., Wilson, D.A., Sullivan-Wilson, A., Herzog, E.D., 2011, Daily rhythms in olfactory discrimination depend on clock genes but not the suprachiasmatic nucleus. *J Biol Rhythms* 26, 552-560.
- Granados-Fuentes, D., Prolo, L.M., Abraham, U., Herzog, E.D., 2004a, The suprachiasmatic nucleus entrains, but does not sustain, circadian rhythmicity in the olfactory bulb. *J Neurosci* 24, 615-619.
- Granados-Fuentes, D., Saxena, M.T., Prolo, L.M., Aton, S.J., Herzog, E.D., 2004b, Olfactory bulb neurons express functional, entrainable circadian rhythms. *Eur J Neurosci* 19, 898-906.
- Gruart, A., M., D.J., Escobar, C., Aguilar-Roblero, R., 2002, Los relojes que gobiernan la vida. Colección Ciencia para todos. México.
- Guilding, C., Hughes, A.T., Brown, T.M., Namvar, S., Piggins, H.D., 2009, A riot of rhythms: neuronal and glial circadian oscillators in the mediobasal hypothalamus. *Mol Brain* 2, 28.
- Guillaumond, F., Dardente, H., Giguere, V., Cermakian, N., 2005, Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *J Biol Rhythms* 20, 391-403.
- Guo, H., Brewer, J.M., Lehman, M.N., Bittman, E.L., 2006, Suprachiasmatic regulation of circadian rhythms of gene expression in hamster peripheral organs: effects of transplanting the pacemaker. *J Neurosci* 26, 6406-6412.
- Gwinner, E., Brandstätter, R., 2001, Complex bird clocks. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 356, 1801-1810.
- Hannibal, J., 2002, Neurotransmitters of the retino-hypothalamic tract. *Cell Tissue Res* 309, 73-88.

- Hastings, M., O'Neill, J.S., Maywood, E.S., 2007, Circadian clocks: regulators of endocrine and metabolic rhythms. *J Endocrinol* 195, 187-198.
- Hastings, M.H., Mead, S.M., Vindlacheruvu, R.R., Ebling, F.J., Maywood, E.S., Grosse, J., 1992, Non-photic phase shifting of the circadian activity rhythm of Syrian hamsters: the relative potency of arousal and melatonin. *Brain Res* 591, 20-26.
- Herzog, E.D., 2007, Neurons and networks in daily rhythms. *Nat Rev Neurosci* 8, 790-802.
- Honma, S., Ikeda, M., Abe, H., Tanahashi, Y., Namihira, M., Honma, K., Nomura, M., 1998, Circadian oscillation of BMAL1, a partner of a mammalian clock gene Clock, in rat suprachiasmatic nucleus. *Biochem Biophys Res Commun* 250, 83-87.
- Hörnigke, H., Ruoff, G., Vogt, B., Clauss, W., Ehrlein, H.J., 1984, Phase relationship of the circadian rhythms of feed intake, caecal motility and production of soft and hard faeces in domestic rabbits. *Lab Anim* 18, 169-172.
- Hsu, S.M., 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 Histochem Cytochem* 29, 577-580.
- Hudson, R., Distel, H. 1982. The pattern of behaviour of rabbit pups in the nest. In *Behaviour*, pp. 255-271.
- Hull, D., 1965, Oxygen consumption and body temperature of new-born rabbits and kittens exposed to cold. *J Physiol* 177, 192-202.
- Jeddi, E., 1971, Thermoregulatory efficiency of neonatal rabbit search for fur comfort contact. *Int J Biometeorol* 15, 337-341.
- Jilge, B., 1993a, A feeding-entrainable circadian oscillator system in the rabbit. *Ann Ist Super Sanita* 29, 511-520.
- Jilge, B., 1993b, The ontogeny of circadian rhythms in the rabbit. *J Biol Rhythms* 8, 247-260.

- Jilge, B., 1995, Ontogeny of the rabbit's circadian rhythms without an external zeitgeber. *Physiol Behav* 58, 131-140.
- Jilge, B., Hornicke, H., Stahle, H., 1987, Circadian rhythms of rabbits during restrictive feeding. *Am J Physiol* 253, R46-54.
- Jilge, B., Hudson, R., 2001, Diversity and development of circadian rhythms in the European rabbit. *Chronobiol Int* 18, 1-26.
- Jilge, B., Kuhnt, B., Landerer, W., Rest, S., 2000, Circadian thermoregulation in suckling rabbit pups. *J Biol Rhythms* 15, 329-335.
- Jilge, B., Kuhnt, B., Landerer, W., Rest, S., 2001, Circadian temperature rhythms in rabbit pups and in their does. *Lab Anim* 35, 364-373.
- Jud, C., Albrecht, U., 2006, Circadian rhythms in murine pups develop in absence of a functional maternal circadian clock. *J Biol Rhythms* 21, 149-154.
- Kalsbeek, A., Fliers, E., Hofman, M.A., Swaab, D.F., Buijs, R.M., 2010, Vasopressin and the output of the hypothalamic biological clock. *J Neuroendocrinol* 22, 362-372.
- Kalsbeek, A., Kreier, F., Fliers, E., Sauerwein, H.P., Romijn, J.A., Buijs, R.M., 2007, Minireview: Circadian control of metabolism by the suprachiasmatic nuclei. *Endocrinology* 148, 5635-5639.
- Ko, C.H., Takahashi, J.S., 2006, Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum Mol Genet* 15 Spec No 2, R271-277.
- Kohsaka, A., Bass, J., 2007, A sense of time: how molecular clocks organize metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 18, 4-11.
- Koubi, H.E., Robin, J.P., Dewasmes, G., Le Maho, Y., Frutoso, J., Minaire, Y., 1991, Fasting-induced rise in locomotor activity in rats coincides with increased protein utilization. *Physiol Behav* 50, 337-343.
- Krieger, D.T., Hauser, H., 1978, Comparison of Synchronization of Circadian Corticosteroid Rhythms by Photoperiod and Food. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 1577-1581.

- Krieger, D.T., Hauser, H., Krey, L.C., 1977, Suprachiasmatic nuclear lesions do not abolish food-shifted circadian adrenal and temperature rhythmicity. *Science* 197, 398-399.
- Kuhlman, S.J., Mackey, S.R., Duffy, J.F., 2007, Biological Rhythms Workshop I: introduction to chronobiology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 72, 1-6.
- Landry, G.J., Simon, M.M., Webb, I.C., Mistlberger, R.E., 2006, Persistence of a behavioral food-anticipatory circadian rhythm following dorsomedial hypothalamic ablation in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290, R1527-1534.
- Landry, G.J., Yamakawa, G.R., Mistlberger, R.E., 2007, Robust food anticipatory circadian rhythms in rats with complete ablation of the thalamic paraventricular nucleus. *Brain Res* 1141, 108-118.
- LeSauter, J., Hoque, N., Weintraub, M., Pfaff, D.W., Silver, R., 2009, Stomach ghrelin-secreting cells as food-entrainable circadian clocks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 13582-13587.
- Li, N., Cai, Y., Zuo, X., Xu, S., Zhang, Y., Chan, P., Zhang, Y.A., 2008, Suprachiasmatic nucleus slices induce molecular oscillations in fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 377, 1179-1184.
- Marchant, E.G., Mistlberger, R.E., 1997, Anticipation and entrainment to feeding time in intact and SCN-ablated C57BL/6j mice. *Brain Res* 765, 273-282.
- Meza, E., Juarez, C., Morgado, E., Zavaleta, Y., Caba, M., 2008, Brief daily suckling shifts locomotor behavior and induces PER1 protein in paraventricular and supraoptic nuclei, but not in the suprachiasmatic nucleus, of rabbit does. *Eur J Neurosci* 28, 1394-1403.
- Mieda, M., Williams, S.C., Richardson, J.A., Tanaka, K., Yanagisawa, M., 2006, The dorsomedial hypothalamic nucleus as a putative food-entrainable circadian pacemaker. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 12150-12155.
- Mirmiran, M., Bernardo, L., Jenkins, S.L., Ma, X.H., Brenna, J.T., Nathanielsz, P.W., 2001, Growth, neurobehavioral and circadian rhythm development in newborn baboons. *Pediatr Res* 49, 673-677.

- Mistlberger, R.E., 1994, Circadian food-anticipatory activity: formal models and physiological mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev* 18, 171-195.
- Mistlberger, R.E., 2009, Food-anticipatory circadian rhythms: concepts and methods. *Eur J Neurosci* 30, 1718-1729.
- Mistlberger, R.E., 2011, Neurobiology of food anticipatory circadian rhythms. *Physiol Behav* 104, 535-545.
- Mistlberger, R.E., Rechtschaffen, A., 1984, Recovery of anticipatory activity to restricted feeding in rats with ventromedial hypothalamic lesions. *Physiol Behav* 33, 227-235.
- Montigny, D., Coureaud, G.r., Schaal, B., 2006, Rabbit pup response to the mammary pheromone: From automatism to prandial control. *Physiol Behav* 89, 742-749.
- Montúfar-Chaveznava, R., Hernández-Campos, O., Hudson, R., Caldelas, I., 2012, Differential maturation of the molecular clockwork in the olfactory bulb and suprachiasmatic nucleus of the rabbit. *Neuroscience*.
- Moore, R., Speh, J., Leak, R., 2002, Suprachiasmatic nucleus organization. 89-98.
- Moore, R.Y., Bernstein, M.E., 1989, Synaptogenesis in the rat suprachiasmatic nucleus demonstrated by electron microscopy and synapsin I immunoreactivity. *J Neurosci* 9, 2151-2162.
- Moore, R.Y., Eichler, V.B., 1972, Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res* 42, 201-206.
- Moore, R.Y., Leak, R.K., 2001, Suprachiasmatic nucleus, In: Takahashi, J.S., Turek, F.W., Moore, R.Y. (Eds.) *Handbook of Behavioral Neurobiology. Circadian Clocks*. Kluwer Academic/Plenum., New York, pp. 141-179.
- Moore, R.Y., Speh, J.C., Card, J.P., 1995, The retinohypothalamic tract originates from a distinct subset of retinal ganglion cells. *J Comp Neurol* 352, 351-366.
- Moore-Ede, M.C., Sulzman, F.M., Fuller, C.A., 1982, *The Clocks That Time Us: Physiology of the Circadian Timing System*. Harvard University Press, Cambridge MA, 1-448 pp.

- Morgado, E., Meza, E., Gordon, M.K., Pau, F.K., Juarez, C., Caba, M., 2010, Persistence of hormonal and metabolic rhythms during fasting in 7- to 9-day-old rabbits entrained by nursing during the night. *Horm Behav* 58, 465-472.
- Morin, L.P., 2007, SCN organization reconsidered. *J Biol Rhythms* 22, 3-13.
- Morin, L.P., Hefton, S., Studholme, K.M., 2011, Neurons identified by NeuN/Fox-3 immunoreactivity have a novel distribution in the hamster and mouse suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 1421, 44-51.
- Moriya, T., Aida, R., Kudo, T., Akiyama, M., Doi, M., Hayasaka, N., Nakahata, N., Mistleberger, R., Okamura, H., Shibata, S., 2009, The dorsomedial hypothalamic nucleus is not necessary for food-anticipatory circadian rhythms of behavior, temperature or clock gene expression in mice. *Eur J Neurosci* 29, 1447-1460.
- Morrison, S.F., Nakamura, K., 2011, Central neural pathways for thermoregulation. *Front Biosci* 16, 74-104.
- Morrison, S.F., Nakamura, K., Madden, C.J., 2008, Central control of thermogenesis in mammals. *Exp Physiol* 93, 773-797.
- Mosko, S., Moore, R.Y., 1978, Neonatal suprachiasmatic nucleus ablation: absence of functional and morphological plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 6243-6246.
- Mosko, S., Moore, R.Y., 1979a, Neonatal Ablation of the Suprachiasmatic Nucleus. Effects on the Development of the Pituitary-Gonadal Axis in the Female Rat. *Neuroendocrinology* 29, 350-361.
- Mosko, S., Moore, R.Y., 1979b, Neonatal suprachiasmatic nucleus lesions: effects on the development of circadian rhythms in the rat. *Brain Res* 164, 17-38.
- Mosko, S., Moore, R.Y., 1979c, Retinohypothalamic tract development: Alteration by suprachiasmatic lesions in the neonatal rat. *Brain Research* 164, 1-15.
- Mrosovsky, N., 1995, A non-photoc gateway to the circadian clock of hamsters. *Ciba Found Symp* 183, 154-167; discussion 167-174.

- Mullen, R.J., Buck, C.R., Smith, A.M., 1992, NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116, 201-211.
- Munch, M.Y., Cain, S.W., Duffy, J.F., 2007, Biological Rhythms Workshop IC: sleep and rhythms. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 72, 35-46.
- Newkirk, K.D., Silverman, D.A., Wynne-Edwards, K.E., 1995, Ontogeny of thermoregulation in the Djungarian hamster (*Phodopus campbelli*). *Physiol Behav* 57, 117-124.
- Nishide, S.Y., Honma, S., Nakajima, Y., Ikeda, M., Baba, K., Ohmiya, Y., Honma, K., 2006, New reporter system for *Per1* and *Bmal1* expressions revealed self-sustained circadian rhythms in peripheral tissues. *Genes Cells* 11, 1173-1182.
- Oakley, D.A., Plotkin, H.C., 1975, Ontogeny of spontaneous locomotor activity in rabbit, rat, and guinea pig. *J Comp Physiol Psychol* 89, 267-273.
- Ohta, H., Honma, S., Abe, H., Honma, K., 2003, Periodic absence of nursing mothers phase-shifts circadian rhythms of clock genes in the suprachiasmatic nucleus of rat pups. *Eur J Neurosci* 17, 1628-1634.
- Ohta, H., Xu, S., Moriya, T., Iigo, M., Watanabe, T., Nakahata, N., Chisaka, H., Hanita, T., Matsuda, T., Ohura, T., Kimura, Y., Yaegashi, N., Tsuchiya, S., Tei, H., Okamura, K., 2008, Maternal feeding controls fetal biological clock. *PLoS One* 3, e2601.
- Pacheco-Cobos, L., Rosetti, M., Distel, H., Hudson, R., 2003, To stay or not to stay: the contribution of tactile and thermal cues to coming to rest in newborn rabbits. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 189, 383-389.
- Palm, I.F., Van Der Beek, E.M., Wiegant, V.M., Buijs, R.M., Kalsbeek, A., 1999, Vasopressin induces a luteinizing hormone surge in ovariectomized, estradiol-treated rats with lesions of the suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* 93, 659-666.
- Pascual, J., 2001, Early weaning of young rabbits: a review. *World Rabbit Sci.* 9, 165-170.

- Pegoraro, M., Tauber, E., 2011, Animal clocks: a multitude of molecular mechanisms for circadian timekeeping. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2, 312-320.
- Pittendrigh, C.S., 1960, On temporal organization in living systems. *Harvey Lect* 56, 93-125.
- Pittendrigh, C.S. 1965. Biological clocks. The functions, ancient and modern, of circadian oscillations. In *Science in the Sixties, Proceedings of the Cloudcroft Symposium, Air Force Office of Scientific Research (University of New Mexico Office of Publications, Albuquerque USA)*, pp. 96-111.
- Powell, E.W., Halberg, F., Pasley, J.N., Lubanovic, W., Ernsberger, P., Scheving, L.E., 1980, Suprachiasmatic nucleus and circadian core temperature rhythm in the rat. *Journal of Thermal Biology* 5, 189-196.
- Ralph, M.R., Foster, R.G., Davis, F.C., Menaker, M., 1990, Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* 247, 975-978.
- Refinetti, R., 1995, Effects of suprachiasmatic lesions on temperature regulation in the golden hamster. *Brain Res Bull* 36, 81-84.
- Refinetti, R., Kaufman, C.M., Menaker, M., 1994, Complete suprachiasmatic lesions eliminate circadian rhythmicity of body temperature and locomotor activity in golden hamsters. *J Comp Physiol A* 175, 223-232.
- Refinetti, R., Menaker, M., 1992, The circadian rhythm of body temperature. *Physiol Behav* 51, 613-637.
- Reppert, S.M., Schwartz, W.J., 1984, The suprachiasmatic nuclei of the fetal rat: characterization of a functional circadian clock using ¹⁴C-labeled deoxyglucose. *J Neurosci* 4, 1677-1682.
- Reppert, S.M., Schwartz, W.J., 1986, Maternal suprachiasmatic nuclei are necessary for maternal coordination of the developing circadian system. *J Neurosci* 6, 2724-2729.
- Roenneberg, T., Mellow, M., 2005, Circadian clocks - the fall and rise of physiology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 965-971.

- Rosenwasser, A.M., Boulos, Z., Terman, M., 1981, Circadian organization of food intake and meal patterns in the rat. *Physiol Behav* 27, 33-39.
- Rovirosa, M.J., Levine, S., Gordon, M.K., Caba, M., 2005, Circadian rhythm of corticosterone secretion in the neonatal rabbit. *Brain Res Dev Brain Res* 158, 92-96.
- Saper, C.B., Lu, J., Chou, T.C., Gooley, J., 2005, The hypothalamic integrator for circadian rhythms. *Trends Neurosci* 28, 152-157.
- Satinoff, E., Prosser, R.A., 1988, Suprachiasmatic nuclear lesions eliminate circadian rhythms of drinking and activity, but not of body temperature, in male rats. *J Biol Rhythms* 3, 1-22.
- Sawaki, Y., Nihonmatsu, I., Kawamura, H., 1984, Transplantation of the neonatal suprachiasmatic nuclei into rats with complete bilateral suprachiasmatic lesions. *Neurosci Res* 1, 67-72.
- Scapinello, C., Gidenne, T., Fortun-Lamothe, L., 1999, Digestive capacity of the rabbit during the post-weaning period, according to the milk/solid feed intake pattern before weaning. *Reprod Nutr Dev* 39, 423-432.
- Schaal, B., Coureaud, G., Langlois, D., Ginies, C., Semon, E., Perrier, G., 2003, Chemical and behavioural characterization of the rabbit mammary pheromone. *Nature* 424, 68-72.
- Schwartz, W.J., Reppert, S.M., Eagan, S.M., Moore-Ede, M.C., 1983, In vivo metabolic activity of the suprachiasmatic nuclei: a comparative study. *Brain Res* 274, 184-187.
- Schwartz, W.J., Zimmerman, P., 1991, Lesions of the suprachiasmatic nucleus disrupt circadian locomotor rhythms in the mouse. *Physiol Behav* 49, 1283-1287.
- Shibata, S., Moore, R.Y., 1987, Development of neuronal activity in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 431, 311-315.
- Shibata, S., Moore, R.Y., 1988a, Development of a fetal circadian rhythm after disruption of the maternal circadian system. *Brain Res* 469, 313-317.

- Shibata, S., Moore, R.Y., 1988b, Electrical and metabolic activity of suprachiasmatic nucleus neurons in hamster hypothalamic slices. *Brain Res* 438, 374-378.
- Shibata, S., Oomura, Y., Kita, H., Hattori, K., 1982, Circadian rhythmic changes of neuronal activity in the suprachiasmatic nucleus of the rat hypothalamic slice. *Brain Res* 247, 154-158.
- Silver, R., Lehman, M.N., Gibson, M., Gladstone, W.R., Bittman, E.L., 1990, Dispersed cell suspensions of fetal SCN restore circadian rhythmicity in SCN-lesioned adult hamsters. *Brain Res* 525, 45-58.
- Sládek, M., Sumová, A., Kovacikova, Z., Bendova, Z., Laurinova, K., Illnerova, H., 2004, Insight into molecular core clock mechanism of embryonic and early postnatal rat suprachiasmatic nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 6231-6236.
- Smith, G.K., Anderson, V., 1984, Effects of maternal isolation on the development of activity rhythms in infant rats. *Physiol Behav* 33, 751-756.
- Spiers, D.E., Adair, E.R., 1986, Ontogeny of homeothermy in the immature rat: metabolic and thermal responses. *J Appl Physiol* 60, 1190-1197.
- Stephan, F.K., 1992, Resetting of a circadian clock by food pulses. *Physiol Behav* 52, 997-1008.
- Stephan, F.K., 2002, The "other" circadian system: food as a Zeitgeber. *J Biol Rhythms* 17, 284-292.
- Stephan, F.K., Becker, G., 1989, Entrainment of anticipatory activity to various durations of food access. *Physiol Behav* 46, 731-741.
- Stephan, F.K., Zucker, I., 1972, Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69, 1583-1586.
- Stokkan, K.-A., Yamazaki, S., Tei, H., Sakaki, Y., Menaker, M., 2001, Entrainment of the Circadian Clock in the Liver by Feeding. *Science* 291, 490-493.

- Sumová, A., Bendová, Z., Sládek, M., El-Hennamy, R., Matějů, K., Polidarová, L., Sosniyenko, S., Illnerová, H., 2008, Circadian molecular clocks tick along ontogenesis. *Physiol Res* 57 Suppl 3, S139-148.
- Takahashi, J.S., 1991, Circadian rhythms: from gene expression to behavior. *Curr Opin Neurobiol* 1, 556-561.
- Tosini, G., Menaker, M., 1996, Circadian rhythms in cultured mammalian retina. *Science* 272, 419-421.
- Trejo-Muñoz, L., Navarrete, E., Montúfar-Chaveznavá, R., Caldelas, I., 2012, Determining the period, phase and anticipatory component of activity and temperature patterns in newborn rabbits that were maintained under a daily nursing schedule and fasting conditions. *Physiol Behav* 106, 587-596.
- Van den Pol, A.N., 1980, The hypothalamic suprachiasmatic nucleus of rat: intrinsic anatomy. *J Comp Neurol* 191, 661-702.
- van der Horst, G.T., Muijtjens, M., Kobayashi, K., Takano, R., Kanno, S., Takao, M., de Wit, J., Verkerk, A., Eker, A.P., van Leenen, D., Buijs, R., Bootsma, D., Hoeijmakers, J.H., Yasui, A., 1999, Mammalian *Cry1* and *Cry2* are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature* 398, 627-630.
- van Esseveldt, K.E., Lehman, M.N., Boer, G.J., 2000, The suprachiasmatic nucleus and the circadian time-keeping system revisited. *Brain Res Brain Res Rev* 33, 34-77.
- Vitaterna, M.H., King, D.P., Chang, A.M., Kornhauser, J.M., Lowrey, P.L., McDonald, J.D., Dove, W.F., Pinto, L.H., Turek, F.W., Takahashi, J.S., 1994, Mutagenesis and mapping of a mouse gene, *Clock*, essential for circadian behavior. *Science* 264, 719-725.
- Wachulec, M., Li, H., Tanaka, H., Peloso, E., Satinoff, E., 1997, Suprachiasmatic nuclei lesions do not eliminate homeostatic thermoregulatory responses in rats. *J Biol Rhythms* 12, 226-234.
- Wakamatsu, H., Yoshinobu, Y., Aida, R., Moriya, T., Akiyama, M., Shibata, S., 2001, Restricted-feeding-induced anticipatory activity rhythm is associated with a phase-shift of the expression of *mPer1* and *mPer2* mRNA in the

- cerebral cortex and hippocampus but not in the suprachiasmatic nucleus of mice. *Eur J Neurosci* 13, 1190-1196.
- Weaver, D.R., 1998, The suprachiasmatic nucleus: a 25-year retrospective. *J Biol Rhythms* 13, 100-112.
- Weinert, D., 2005, Ontogenetic development of the mammalian circadian system. *Chronobiol Int* 22, 179-205.
- Welsh, D.K., Logothetis, D.E., Meister, M., Reppert, S.M., 1995, Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* 14, 697-706.
- Xu, Y., Padiath, Q.S., Shapiro, R.E., Jones, C.R., Wu, S.C., Saigoh, N., Saigoh, K., Ptacek, L.J., Fu, Y.H., 2005, Functional consequences of a CK1delta mutation causing familial advanced sleep phase syndrome. *Nature* 434, 640-644.
- Yamazaki, S., Numano, R., Abe, M., Hida, A., Takahashi, R., Ueda, M., Block, G.D., Sakaki, Y., Menaker, M., Tei, H., 2000, Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* 288, 682-685.
- Zarrow, M.X., Denenberg, V.H., Anderson, C.O., 1965, Rabbit: frequency of suckling in the pup. *Science* 150, 1835-1836.