



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

CAMBIOS INMEDIATOS EN EL NSQ ANTE UN AVANCE DE FASE COMBINADO CON
ALIMENTO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

PRESENTA:

JORGE MIGUEL ÁNGEL AMAYA FERNÁNDEZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA CAROLINA ESCOBAR BRIONES
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR: DRA IVETTE CALDELAS SÁNCHEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DR MANUEL MIRANDA ANAYA
FACULTAD DE CIENCIAS

MÉXICO, D.F. AGOSTO, 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

CAMBIOS INMEDIATOS EN EL NSQ ANTE UN AVANCE DE FASE COMBINADO CON
ALIMENTO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

PRESENTA:

JORGE MIGUEL ÁNGEL AMAYA FERNÁNDEZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA CAROLINA ESCOBAR BRIONES
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR: DRA IVETTE ALDELAS SÁNCHEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DR MANUEL MIRANDA ANAYA
FACULTAD DE CIENCIAS

MÉXICO, D.F. AGOSTO, 2013

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina, en su sesión ordinaria, del día 11 de marzo de 2013, se aprobó el siguiente jurado para el examen para de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del alumno **AMAYA FERNÁNDEZ JORGE MIGUEL ÁNGEL** con número de cuenta **98047060** con la tesis titulada **"CAMBIOS INMEDIATOS EN EL NSQ ANTE UN AVANCE DE FASE COMBINADO CON ALIMENTO"**, bajo la dirección de la **DRA. CAROLINA ESCOBAR BRIONES**:

Presidente: **DRA. MARÍA LUISA FANJUL PEÑA DE MOLES**
Vocal: **DR. ALBERTO MANUEL ÁNGELES CASTELLANOS**
Secretario: **DRA. IVETTE CALDELAS SÁNCHEZ**
Suplente: **DR. MAURICIO DÍAZ MUÑOZ**
Suplente: **DR. MANUEL MIRANDA ANAYA**

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 25 de junio de 2013

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México

A la beca otorgada por CONACyT con número de CVU/número de becario 370564/245778

A la Dra. Ivette Caldelas Sánchez y al Dr. Manuel Miranda Anaya, miembros del Comité Tutorial

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A los apoyos otorgados al Laboratorio de Ritmos Biológicos y Metabolismo de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México: apoyo para compra de materiales, asistencia a congresos y becas de estudiantes de CONACyT 82462, de PAPIIT-UNAM IN-203907 y IN-224911

A la Dra. Carolina Escobar Briones, Tutora Principal

Al Dr. Manuel Ángeles Castellanos y a la Dra. Laura M. Ubaldo Reyes.

ÍNDICE

I.RESUMEN.....	10
II.ABSTRACT.....	11
III.LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
IV.INTRODUCCIÓN.....	14
A. EL SISTEMA CIRCADIANO Y EL NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO COMO RELOJ MAESTRO.....	14
1.El sistema circadiano.....	14
2.Anatomía del NSQ.....	14
3.Función del NSQ como reloj biológico.....	16
4.Oscilaciones de las actividades eléctrica, metabólica, y de expresión de proteínas del NSQ.....	17
5.Oscilaciones en la expresión de la proteína c-FOS en el NSQ.....	18
6.Oscilaciones de genes reloj en el NSQ.....	18
B. SINCRONIZACIÓN FÓTICA DEL NSQ.....	21
1.Cambios en la expresión de c-FOS ante pulsos de luz.....	21
2.Cambios en la expresión de genes reloj ante pulsos de luz.....	21
C. INTERACCIÓN DEL NSQ CON SEÑALES DEL ALIMENTO.....	22
D. JETLAG.....	22
V.OBJETIVOS.....	24
VI.ANTECEDENTES.....	24
VII.HIPÓTESIS.....	25
VIII.METODOLOGÍA.....	25
A. Sujetos.....	25
B. Diseño experimental.....	25
C. Obtención de cerebros.....	25
D. Inmunohistoquímica.....	26
E. Digitalización de imágenes y conteo celular.....	26
F. Análisis de datos.....	26
IX.RESULTADOS.....	27
A. Expresión de c-FOS en la zona ventrolateral del NSQ.....	27
B. Expresión de c-FOS en la zona dorsomedial del NSQ.....	27
C. Expresión de PER1 en la zona ventrolateral del NSQ.....	31
D. Expresión circadiana de PER1 en la zona dorsomedial del NSQ.....	31
X.DISCUSIÓN.....	37
XI.CONCLUSIONES.....	40
XII.PERSPECTIVA.....	40
XIII.REFERENCIAS.....	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. El NSQ del hámster en un plano coronal. Del lado izquierdo se señalan los diferentes grupos celulares, y del lado derecho se muestra cómo son las oscilaciones en la expresión de genes reloj: rítmico endógenamente, inducido por luz, oscilación en antifase respecto de la zona dorsomedial y oscilación inducida por la administración de GRP. Abreviaturas: AVP: Avidina Vasopresina; VIP: Péptido Vasoactivo Intestinal; CalB: Calbindina; GRP: Péptido Liberador de Gastrina; Cap: células con fenotipo no identificado. Tomado de Antle y Silver, 2005.

Figura 2. El esquema muestra el NSQ en el plano coronal. En los recuadros de color se señala el fenotipo neuroquímico de las respectivas regiones las flechas entrantes simbolizan las entradas de información a las respectivas regiones, VIP: Péptido Vasoactivo Intestinal; Calb: Calbindina; GRP: Péptido Liberador de Gastrina; GABA: Ácido Gamma Amino Butírico; AVP: Avidina Vasopresina; CALR: Calretinina; mENK: Encefalina; 3V: Tercer ventrículo; VL: Ventrolateral; DM: Dorsomedial; TRH: Tracto Retinohipotalámico; HI: Hojuela Intergeniculada; PVT: Núcleo Paraventricular del Tálamo; CI: Corteza Infralímbica; NLST: Núcleo Lecho de la Stria Terminalis; OC: Quiasma Óptico. Modificado de Golombek y Rosenstein, 2010.

Figura 3. Maquinaria molecular del reloj circadiano. Las líneas continuas representan estimulación, las líneas discontinuas, inhibición. GCR's: genes controlados por el reloj. Tomado de Zanutta, et al, 2010.

Figura 4. Expresión circadiana de ARNm y de proteínas reloj, en el NSQ bajo un ciclo de luz-oscuridad. Las barras grises representan la fase de luz y las negras la fase de oscuridad. Modificada de Reppert y Weaver, 2001.

Figura 5. Actogramas representativos, y acrofases de los ritmos de actividad locomotora y temperatura en línea base y posterior a un avance de fase en el ciclo luz-oscuridad de 6 horas, bajo administración de solución salina (fila superior) o bajo restricción temporal de acceso al alimento (fila inferior). Las flechas en los actogramas representan el día del avance, los recuadros indican el tiempo de tratamiento. LB: línea base. Modificado de Ángeles Castellanos, et al, 2011.

Figura 6. Expresión de c-FOS en el NSQ en los grupos control y experimentales. En el eje de las abscisas se indica la hora geográfica, y las barras negras y blancas representan las fases de oscuridad y luz, respectivamente. En las gráficas de los grupos experimentales, los puntos correspondientes a las primeras 30 horas son valores obtenidos del grupo control, y constituyen una línea base, con el fin de apreciar los cambios en la expresión debido a las manipulaciones experimentales. En estas mismas gráficas, las flechas indican el momento en el que se realizó el avance del inicio de la oscuridad. El recuadro en la gráfica JETLAG+ALIMENTO corresponde al tiempo de acceso al alimento (2 horas al inicio de la nueva fase de oscuridad).

Tabla 1. Amplitud y acrofase de los conteos celulares para c-FOS, obtenidas por medio de análisis de cosinor. *: $p < .05$, en la prueba LSD, respecto del grupo control. Las acrofases están expresadas en horas geográficas. Los datos representan la media \pm error estándar para todas las variables y estimados.

Figura 7. Acrofase media \pm error estándar de la expresión de c-FOS en la zona ventrolateral del NSQ, obtenidas por medio del análisis de cosinor. En el eje de las abscisas se indica la hora geográfica. Las barras blancas y negras representan las fases de luz y oscuridad, respectivamente, de las condiciones control y avance de fase; *: $p < .05$, en la prueba LSD, respecto del grupo control.

Figura 8. Acrofase media \pm error estándar de la expresión de c-FOS en la zona dorsomedial del NSQ, obtenidas por medio del análisis de cosinor. En el eje de las abscisas se indica la hora geográfica. Las barras blancas y negras representan las fases de luz y oscuridad, respectivamente, de las condiciones control y posterior al avance de fase; *: $p < .05$, en la prueba LSD, respecto del grupo control.

Figura 9. Expresión de PER1 en el NSQ en los grupos control y experimentales. En el eje de las abscisas se indica la hora geográfica, y las barras negras y blancas representan las fases de oscuridad y luz, respectivamente. En las gráficas de los grupos experimentales, los puntos correspondientes a las primeras 30 horas son valores obtenidos del grupo control, y constituyen una línea base, con el fin de apreciar los cambios en la expresión debido a las manipulaciones experimentales. En estas mismas gráficas, las flechas indican el momento en el que se realizó el avance del inicio de la oscuridad. El recuadro en la gráfica JETLAG+ALIMENTO corresponde al tiempo de acceso al alimento (2 horas al inicio de la nueva fase de oscuridad).

Tabla 2. Amplitud y acrofase de los conteos celulares para PER1, obtenidas por medio de análisis de cosinor. *: $p < .05$, en la prueba LSD, respecto del grupo control. Las acrofases están expresadas en horas geográficas. Los datos representan la media \pm error estándar para todas las variables y estimados.

Figura 10. Acrofase media \pm error estándar de la expresión de PER1 en la zona ventrolateral del NSQ, obtenidas por medio del análisis de cosinor. En el eje de las abscisas se indica la hora geográfica. Las barras blancas y negras representan las fases de luz y oscuridad, respectivamente, de las condiciones control y avance de fase; *: $p < .05$, en la prueba LSD, respecto del grupo control.

Figura 11. Acrofase media \pm error estándar de la expresión de PER1 en la zona dorsomedial del NSQ, obtenidas por medio del análisis de cosinor. En el eje de las abscisas se indica la hora geográfica. Las barras blancas y negras representan las fases de luz y oscuridad, respectivamente, de las condiciones control y avance de fase; *: $p < .05$, en la prueba LSD, respecto del grupo control.

I.RESUMEN

En la actualidad es común que la gente realice viajes aéreos a través de varios husos horarios, por cuestiones laborales o de esparcimiento. Los viajeros que se someten a estos traslados refieren malestares que desaparecen después de varios días, debido a la ausencia de un ajuste rápido al horario del lugar de destino; este fenómeno se conoce como síndrome de JetLag. Diversos trabajos experimentales han replicado esta situación realizando avances o retrasos súbitos en el ciclo de luz-oscuridad, y en roedores se ha encontrado que variables rítmicas como la temperatura y la actividad locomotora tardan una serie de ciclos antes de sincronizarse al nuevo horario. Esta adaptación gradual también se ha observado en la actividad neuronal y en la expresión de genes reloj en el núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo, que es el reloj biológico que comunica las señales de tiempo al organismo. El NSQ sincroniza su actividad al ciclo de luz-oscuridad (L-O), aunque es capaz de sostener oscilaciones aun en ausencia de dicho ciclo. Ciertas variables fisiológicas pueden también sincronizarse a señales metabólicas dadas por el alimento. En el laboratorio observamos previamente que el alimento puede acelerar la resincronización de los ritmos de actividad locomotora y de temperatura en ratas sometidas a avance de fase en el ciclo L-O. En este trabajo nos propusimos determinar si esta aceleración refleja cambio en el ritmo de actividad neuronal y de expresión de proteína PER1 -un marcador de ritmicidad- en el NSQ. Para esto sometimos a ratas a avances de 6 horas en el ciclo L-O, un grupo bajo condiciones de alimentación ad-libitum, y otro con el alimento acoplado al nuevo horario, y analizamos los ritmos expresión de c-FOS y de PER1 en el NSQ. El 1er día después del avance del ciclo L-O, la nueva fase de luz provoca una respuesta de elevación de la expresión de c-FOS en la zona ventrolateral, esta respuesta fue similar en ambos grupos experimentales. Para PER1, se presentó una disminución en la amplitud y un avance de fase en el ritmo también en la zona ventral del NSQ. En la zona dorsomedial la amplitud del ritmo de expresión para c-FOS y PER1 disminuyó y no se presentaron avances de fase. Los resultados sugieren que la aceleración de la resincronización de los ritmos circadianos de temperatura y actividad locomotora por la restricción temporal de acceso al alimento no se observan en el NSQ al primer día del cambio del ciclo L-O, y que se requiere explorar los días posteriores; también sugieren que la aceleración dada por el alimento podría estar relacionada con la sincronización de otras estructuras cerebrales.

II.ABSTRACT

In modern times it is common for people to travel rapidly across several time zones, for professional and leisure purposes. Travelers complain about JetLag syndrome, which is a series of discomforts that disappear after several days; this is due to the lack of synchronization with the local time of destination. In the lab, by means of shifting the light-dark (LD) schedule, it is possible to emulate this, and it has been found that in rodents, the circadian rhythms of temperatures and locomotor activity synchronizes to the new LD schedule after an amount of days. This gradual re-entrainment has been observed also in neuronal activity and clock gene expression in the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus (SCN), which is the biological master clock in mammals. SCN is synchronized with LD cycle, and it keeps with its oscillations even in constant illumination conditions. Certain physiological variables can be temporally entrained by metabolic signals provided by food. Previously, we observed that after a phase shift in LD cycle, re-entrainment of locomotor activity and temperature rhythms in rats can be accelerated by food. In the present experiment we wanted to determine if this acceleration corresponds to a shift in the rhythms of neuronal activity and clock protein expression in the SCN. To achieve this we subjected rats to a 6 hour phase shift in the LD cycle, in two groups, one under ad libitum conditions and other under food access restricted to 2 hours at the beginning of the new dark phase; and analyzed the rhythms of c-Fos and PER1 expression in the SCN. In the first day after the LD phase shift the new light elevates c-Fos expression in the ventrolateral SCN in both groups. The phase shift also evokes a reduction in amplitude in the PER1 expression, as well as a phase advance in the ventrolateral SCN. In the dorsomedial SCN, amplitude in both rhythms of expression diminished, and no phase advance was observed. Results suggest that acceleration of re-entrainment in temperature and locomotor activity rhythms by food are not due to changes in the SCN, and that analysis of subsequent days after phase shift is required. Also they suggest that such acceleration may be related to with entrainment of other brain structures by restricted feeding schedules.

III.LISTA DE ABREVIATURAS

AA: actividad anticipatoria
AMPc: adenosín-monofosfato cíclico
AP1: proteína activadora 1
AVP: avidina vasopresina
Calb: Calbindina
CALR: calretinina
CI: corteza infralímbica
CRE: elemento de respuesta a AMPc
CREB: proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc
CREM: modulador del elemento de respuesta a AMPc
DMH: núcleo dorsomedial del hipotálamo
ERK: cinasa regulada extracelularmente
GABA: ácido gamma amino butírico
GAD: glutamato descarboxilasa
GMPc: guanosín-monofosfato cíclico
GRP: péptido liberador de gastrina
ICER: represor temprano inducible por AMPc
LH: hipotálamo lateral
LSD: mínimas diferencias significativas.
MAPK: proteína cinasa activada por mitógeno
mENK: encefalina
NArc: núcleo arqueado
NLST: núcleo lecho de la stria terminalis
NMDA: n-metil-d-aspartato
NPY: neuropéptido Y
NSQ: núcleo supraquiasmático
PDE: fosfodiesterasa
PeF: área perifornical del hipotálamo
PKG: proteína-cinasa dependiente de GMPc
PVN: núcleo paraventricular del hipotálamo
PVT: núcleo paraventricular del tálamo

RAFK: cinasa raf

SPVZ: zona subparaventricular

TMN: núcleo tuberomamilar

TRH: tracto retinohipotalámico

VMH: núcleo ventromedial del hipotálamo

VIP: péptido vasoactivo intestinal

IV. INTRODUCCIÓN

A. EL SISTEMA CIRCADIANO Y EL NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO COMO RELOJ MAESTRO

1. El sistema circadiano

El movimiento de rotación de la Tierra provoca condiciones cambiantes de iluminación esto es, día y noche, o luz y obscuridad, que se suceden en un periodo de 24 horas. Para los organismos, este ciclo de luz-obscuridad es la señal temporal más importante para el ajuste de los ritmos circadianos (Challet, 2007). Los ritmos circadianos son ciclos fisiológicos, metabólicos y conductuales que persisten aún en aislamiento de señales temporales externas, y que tienen un periodo cercano a 24 horas. El hecho de que persistan en condiciones constantes indica que están dirigidos por osciladores biológicos con periodos intrínsecos (Maywood, et al, 2007), que en conjunto forman el sistema circadiano. El sistema circadiano requiere de una señal de entrada, un reloj marcapasos, y salidas del reloj que transmiten la señal de tiempo a los demás osciladores del cuerpo. En los mamíferos el ciclo de luz / oscuridad constituye la señal de sincronización, y es procesada por la retina, la cual transmite esta información a través del Tracto RetinoHipotalámico (TRH) al Núcleo Supraquiasmático del hipotálamo (NSQ), que es el reloj y es donde las señales de luz se integran y regulan los ciclos de conducta y actividad de los tejidos periféricos. Las salidas del reloj están constituidas por señales neurales y humorales que marcan esta temporalidad hacia otros núcleos cerebrales y hacia el resto del cuerpo. Los órganos como el hígado, el pulmón, el riñón, el tejido adiposo y el músculo esquelético son capaces de generar oscilaciones en sus funciones fisiológicas y en la expresión de genes reloj, estas no son tan robustas, y requieren de las señales provenientes del NSQ para su coordinación (Albrecht, 2012; Diebner, et al, 2010). A estos órganos se les conoce como osciladores periféricos.

2. Anatomía del NSQ

El NSQ se localiza dorsal al quiasma óptico. Anatómicamente se divide en dos zonas, ventrolateral, que es la zona directamente en contacto con el quiasma óptico, y dorsomedial, que se localiza dorsal a la primera y lateral al tercer ventrículo. En la zona ventrolateral se encuentran cuerpos celulares inmunopositivos para péptido vasoactivo intestinal (VIP; Figura 1) (Card, et al 1981). Algunas células del NSQ en rata que expresan Péptido Vasoactivo Intestinal (VIP) coexpresan Péptido Liberador de Gastrina (GRP) (Albers, et al, 1991). En esta zona se localizan además células productoras de somatostatina, sustancia P, angiotensina II, neurotensina, encefalina (mENK), calretinina (CALR) y calbindina (Calb) (Moore, et al, 2002). En la zona dorsomedial del NSQ se localizan principalmente neuronas positivas para arginina vasopresina (AVP; Figura 1), en el límite entre las zonas dorsomedial y ventrolateral, se encuentran células positivas para somatostatina, aunque algunas de éstas últimas también se encuentran en la zona dorsomedial (Card et al, 1988). Además, en ratas, la mayoría de las células del NSQ expresan ARNm para GAD (Glutamato decarboxilasa), enzima productora de ácido gamma aminobutírico-GABA. (Okamura et al, 1989, François-Bellan, et al, 1990). En general, dentro del supraquiasmático, se localizan axones inmunorreactivos para AVP en las porciones medial y dorsal; para VIP se distribuyen en todo el núcleo (Moore et al, 2002; Okamura e Ibata, 1994, Antle y Silver, 2005).

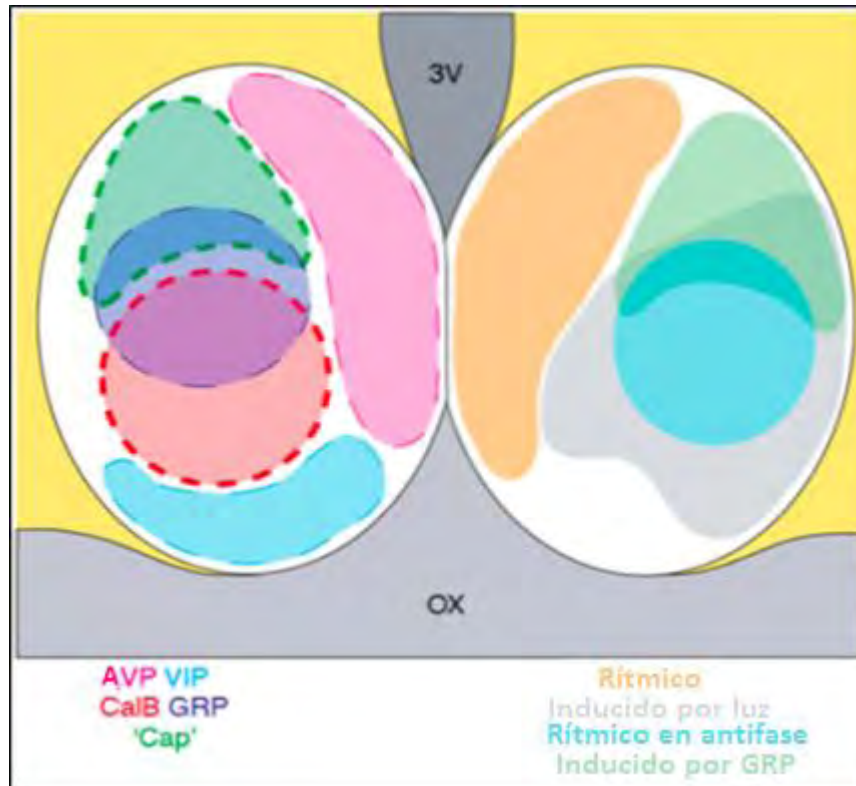


Figura 1. El NSQ del hámster en un plano coronal. Del lado izquierdo se señalan los diferentes grupos celulares, y del lado derecho se muestra cómo son las oscilaciones en la expresión de genes reloj: rítmico endógenamente, inducido por luz, oscilación en antifase respecto de la zona dorsomedial y oscilación inducida por la administración de GRP. Abreviaturas: AVP: Avidina Vasopresina; VIP: Péptido Vasoactivo Intestinal; CalB: Calbindina; GRP: Péptido Liberador de Gastrina; Cap: células con fenotipo no identificado. Tomado de Antle y Silver, 2005.

La región ventrolateral del NSQ recibe información luminosa del tracto retinohipotalámico, cuyos neurotransmisores son glutamato principalmente, sustancia P y de péptido activador de adenilatociclasa pituitaria. Otra vía que transmite información luminosa es la hojuela intergeniculada del núcleo geniculado lateral, que envía proyecciones de GABA, NPY, mENK y neurotensina a la misma región (Morin y Blanchard, 2001).

Otras vías con información no-fótica que proyectan al NSQ ventrolateral provienen del núcleo del rafé, principalmente del núcleo mediano mesencefálico (serotoninérgica); del núcleo paraventricular del tálamo (PVT, porciones rostral y dorsal; glutamatérgica). En menor medida, también recibe proyecciones glutamatérgicas provenientes del núcleo lecho de la stria terminalis (NLST). Desde el hipotálamo también se envían proyecciones hacia el NSQ, de los núcleos preópticos medial y mediano, del núcleo periventricular, del núcleo ventromedial (VMH), del núcleo dorsomedial (DMH), del núcleo arqueado (NArc), del núcleo tuberomamilar (TMN), de la zona subparaventricular (SPVZ), del hipotálamo lateral (LH), y de las áreas hipotalámicas posteriores. Las proyecciones de estas áreas se localizan en la zona dorsomedial del NSQ. En esta misma región también se localizan proyecciones provenientes

de la corteza infralímbica (CI), el núcleo septal lateral y el subículo ventral (Moga y Moore, 1996; 1997) (Figura 2).

El NSQ envía proyecciones hacia los núcleos hipotalámicos SPVZ (SubparaVentricular Zone, Zona SubParaVentricular), al núcleo paraventricular (PVN) región parvocelular, al VMH, al DMH, al área hipotalámica lateral, al área retroquiasmática, y al área preóptica. Fuera del hipotálamo, el NSQ envía proyecciones hacia el NLST, hacia el séptum lateral, y hacia los núcleos paratenial y PVT. Las aferencias del NSQ provienen de su zona dorsomedial (Leak y Moore, 2001).

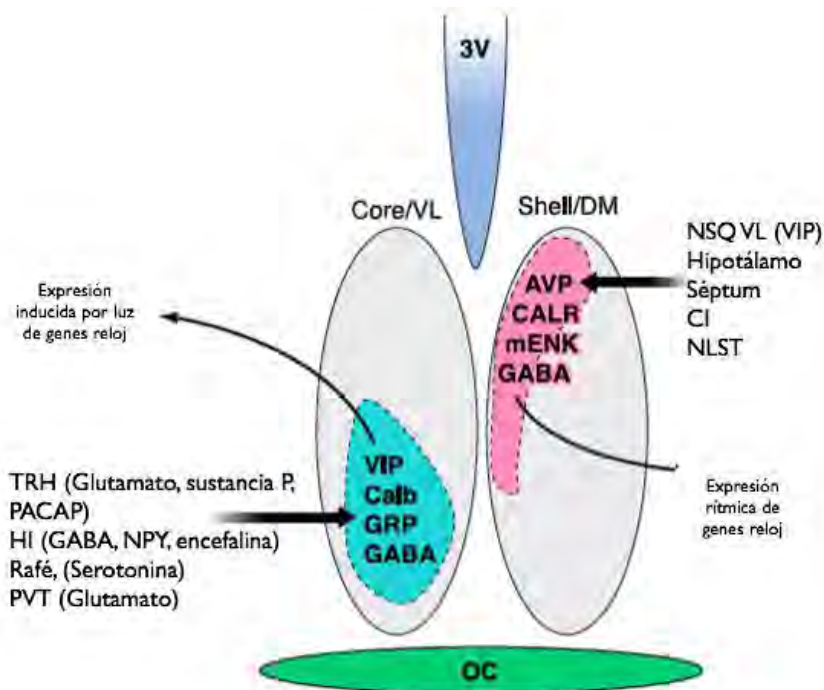


Figura 2. El esquema muestra el NSQ en el plano coronal y su división anatómica. En los recuadros de color se señala el fenotipo neuroquímico de las respectivas regiones y las flechas muestran las entradas de información a las respectivas regiones. En los recuadros de color se señala el fenotipo neuroquímico de las respectivas regiones las flechas entrantes simbolizan las entradas de información a las respectivas regiones. VIP: Péptido Vasoactivo Intestinal; Calb: Calbindina; GRP: Péptido Liberador de Gastrina; GABA: ácido gamma amino butírico; AVP: avidina vasopresina; CALR: calretinina; mENK: encefalina; 3V: tercer ventrículo; VL: Ventrolateral; DM: Dorsomedial; TRH: Tracto Retinohipotalámico; HI: Hojuela Intergeniculada; PVT: Núcleo Paraventricular del Tálamo; CI: Corteza Infralímbica; NLST: Núcleo Lecho de la Stria Terminalis; OC: quiasma óptico. Modificado de Golombek y Rosenstein, 2010.

3. Función del NSQ como reloj biológico

Muchos estudios han demostrado el papel del NSQ como reloj biológico. Las lesiones del NSQ provocan la pérdida los ritmos circadianos de ingestión de agua, de actividad locomotora, de liberación de corticosterona en la glándula adrenal, del ciclo sueño-vigilia, y de temperatura (Stephan y Zucker, 1972; Moore y Eichler, 1972; Schwartz y Zimmerman,

1991; Ibuka y Kawamura, 1975; Eastman, et al, 1984). Los ritmos circadianos de actividad locomotora y de actividad eléctrica en zonas cerebrales fuera del hipotálamo se pierden cuando se aísla al NSQ del resto del cerebro, sin embargo, la ritmicidad de la actividad eléctrica en aquél se conserva (Inouye y Kawamura, 1979).

Los estudios con trasplantes de NSQ fetal han reforzado la concepción del NSQ como el reloj biológico en los mamíferos. Los ritmos circadianos de actividad locomotora, de ingestión de agua, y de concentración de AVP en el líquido cefalorraquídeo se recuperan con trasplantes de NSQ fetal en ratas arrítmicas por lesiones del NSQ. Este efecto es específico. (Sawaki, et al, 1984; Saitoh, et al, 1990; Drucker-Colín, et al, 1984; Earnest, et al, 1989; DeCoursey y Buggy, 1989).

4. Oscilaciones de las actividades eléctrica, metabólica, y de expresión de proteínas del NSQ

Al identificar al NSQ como el reloj maestro del sistema nervioso central, se han analizado sus propiedades como un oscilador autónomo, encontrándose que la actividad eléctrica de las células del NSQ es rítmica, con frecuencias altas en la fase de luz y bajas en la de oscuridad (Vanderleest, et al, 2009; Atkinson, et al, 2011; Lucassen, et al, 2012). La utilización de glucosa en el NSQ también presenta un ritmo circadiano con niveles máximos en la fase de luz, tanto en especies diurnas, como crepusculares y nocturnas (Shibata, et al, 1982; Schwartz, et al, 1980; Schwartz, 1987; Schwartz, et al, 1983a). Existe una relación entre la actividad eléctrica de las neuronas del NSQ y la utilización de la glucosa, ya que la administración de tetrodotoxina, un bloqueador de canales de sodio, que bloquea la actividad eléctrica de las células, disminuye consecuentemente la utilización de glucosa (Newman, et al, 1992).

Se ha propuesto que las células individuales son osciladores autónomos, ya que la actividad eléctrica de células individuales del NSQ de rata registrada por más de 36 horas muestra *in vitro* un periodo circadiano (Bos y Mirmiran, 1990, Kononenko, et al, 2008a, Kononenko, et al, 2008b), con acrofases en la mitad del día subjetivo, aunque la variabilidad del periodo endógeno en las células individuales dispersas se incrementa, y su acrofase cambia (Welsh, et al, 1995; Herzog, et al, 2004, Aton, et al, 2006). En roedores mutantes con periodos de actividad locomotora más cortos, el ritmo circadiano de disparo neuronal de células individuales de NSQ en cultivo presenta periodos cortos (Liu, et al, 1997 Granados Fuentes et al, 2012).

Las células del NSQ también presentan ritmos circadianos en la expresión de ARN Mensajero (ARNm) y de proteínas. Bajo condiciones de luz-oscuridad, como de oscuridad constante la expresión de AVP y somatostatina en el NSQ es rítmica, con una expresión alta en la fase de luz y baja en la fase de oscuridad (Carter y Murphy, 1992; Earnest y Sladek, 1986; Earnest y Sladek, 1987; Prosser y Gillette, 1989, Earnest, et al, 1991; Murakami, et al, 1991; Takeuchi, et al, 1992). También se ha observado que la expresión de ARNm y proteína de VIP y GRP es rítmica sólo bajo un ciclo de luz-oscuridad, con niveles altos en la fase de oscuridad y bajos en la fase de luz para la primera, y lo contrario para la segunda (Okamoto, et al, 1991; Okamura e Ibata, 1994; Yang, et al, 1993). En el NSQ también se presentan oscilaciones diarias en las concentraciones de los mensajeros intracelulares Adenosín-Monofosfato cíclico y Guanosín-Monofosfato cíclico (AMPc, y GMPc, respectivamente); de

actividad de fosfodiesterasa (PDE, enzima degradadora de AMPc), de Proteín-Cinasa dependiente de GMPc (PKG), y de incorporación de leucina (un indicador de síntesis de proteínas) (Prosser y Gillette, 1991; Yamazaki, et al, 1994; Ferreyra y Golombek, 2001; Shibata, et al, 1992c).

5. Oscilaciones en la expresión de la proteína c-FOS en el NSQ

El gen c-Fos es un proto-oncogén que codifica para una proteína componente de la proteína activadora del factor de transcripción 1 (AP1). Esta proteína regula la transcripción de otros genes, por medio de su unión al ADN. La expresión de esta proteína es disparada por la despolarización de la membrana celular, por lo que se le considera un marcador de actividad neuronal (Curran y Morgan, 1995).

En el NSQ se ha estudiado la expresión de c-FOS considerándola una aproximación no invasiva que permite medir la actividad neuronal reciente. En ratas y ratones bajo un ciclo de luz-oscuridad, y en condiciones *in vitro*, se observa en el NSQ un ritmo diario en la expresión de ARNm y proteína c-FOS, con máxima expresión en la primera mitad de la fase de luz (Kononen, et al, 1990; Prosser, et al, 1994 Colwell y Foster, 1992; Liu, et al, 2002). La expresión endógena de c-FOS en el NSQ es mayor en el día subjetivo que en la noche subjetiva, con máximos en la primera mitad del día subjetivo (Sumová, et al, 1998). Este patrón circadiano de expresión es independiente de si la especie es diurna o nocturna, dado que en *Arvicanthis niloticus*, *Rabidhomys pumilio*, y *Microtus arvalis* (roedores diurnos) la expresión de proteína c-FOS en el NSQ tiene un ritmo circadiano, en el que el máximo de expresión también se presenta en el inicio de la fase de luz, y niveles mínimos en la fase de oscuridad (Katona, et al, 1998, Schwartz, et al, 2004, Schumann, et al, 2006, van der Veen, et al, 2008), similar a los roedores nocturnos.

Dentro del NSQ, las zonas dorsolateral y ventromedial muestran distintos patrones en la expresión de c-FOS. En primer lugar, resalta el hecho que bajo condiciones de oscuridad constante la expresión de ARNm para *c-Fos* es alta en la mitad del día subjetivo y baja en la mitad de la noche subjetiva, en la zona dorsomedial. (Prosser, et al, 1994, Beaulé y Amir, 2003). A diferencia de la zona dorsomedial, en la zona ventrolateral la expresión es baja en todos los puntos temporales. (Sumová, et al, 1998 Schwartz, et al, 2000). Estas observaciones sugieren que la zona dorsomedial constituye el reloj endógeno, dado que *in vivo*, y aun en ausencia de señales fóticas, presenta un ritmo circadiano en la expresión de c-Fos, mientras que la zona ventrolateral constituye una interfaz que procesa la información proveniente de la retina, dado que su expresión se presenta en respuesta al ciclo de luz-oscuridad (Beaule, et al 2001).

6. Oscilaciones de genes reloj en el NSQ

En el NSQ se expresa un grupo de genes conocidos como “genes reloj”, cuyos productos constituyen asas moleculares de retroalimentación. El mecanismo de expresión es el siguiente: los factores de transcripción CLOCK y BMAL1 se dimerizan en el citoplasma, y se translocan hacia el núcleo para unirse a cajas E de los genes *Per1*, *2* y *3*; *Cry1* y *2*, *Rev-Erb- α* , y *Dec1* y *2* (Gekakis, et al, 1998, Honma, et al, 2002), potenciando su transcripción (Matsui, et al, 2005). Los transcritos se traducen a proteínas en el citoplasma, se acumulan, se dimerizan, y se translocan al núcleo, donde inhiben la actividad de CLOCK-BMAL1,

inhibiendo su propia transcripción (Hirayama, et al, 2003), los factores DEC1 y DEC2 también suprimen la activación de la transcripción de *Per1*; REV-ERB- α , por su parte inhibe la transcripción de *Bmal1*, mientras que ROR la promueve. La inhibición que ejercen PER-CRY sobre la transcripción de Rev-Erb- α , suprime la inhibición que REV-ERB- α ejerce sobre la transcripción de *Bmal1*, propiciando el reinicio del ciclo (Ver Figura 3). El ciclo está influenciado por factores postranscripcionales: LARK1 contribuye a la traducción de *Per1*, hnRNP contribuye a la translocación nuclear, hnRPN1 promueve la degradación de ARNm *Per2* y activa la traducción de Rev-Erb- α , hnRNPd estimula la degradación de *Cry1* (Kojima, et al, 2011); y por factores postraduccionales: las casequinasas δ/ϵ (CK δ/ϵ) y FBXL3 provocan el reconocimiento de las proteínas PER y CRY para su degradación proteasomal; las proteínas PER reclutan a las proteínas NONO y SFPQ, que tienen efectos opuestos sobre la transcripción (Brown, et al, 2012), la translocación nuclear de CLOCK-BMAL1 y su proteólisis dependen de su ubiquitinación (Kwon, et al, 2006) misma que a su vez depende de su previa poliSUMOilación (Lee, et al, 2008). En el NSQ el dímero CLOCK-BMAL1 también promueve la transcripción de otros genes no esenciales para el mecanismo de reloj, pero que tienen una expresión rítmica y son cruciales para la transmisión de las señales temporales al resto del cerebro, como AVP y DBP (Reppert y Weaver, 2001).

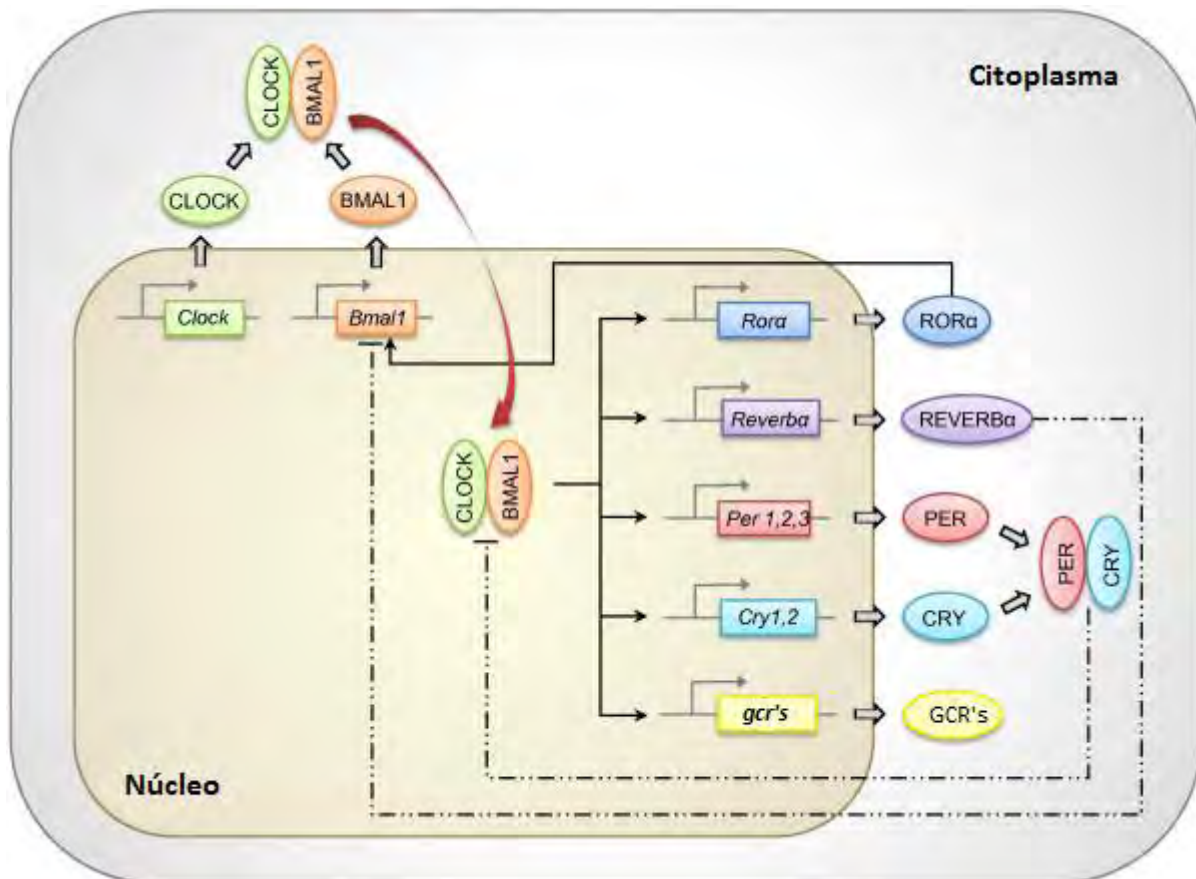


Figura 3. Maquinaria molecular del reloj circadiano. Las líneas continuas representan estimulación, las líneas discontinuas, inhibición. GCR's: genes controlados por el reloj. Tomado de Zanutta, et al, 2010.

En ratones y en ratas, la expresión de ARNm para *Cry1* muestra una variación circadiana en el NSQ tanto en condiciones de luz-oscuridad como bajo oscuridad constante, con un máximo de expresión en la fase de luz, o el día subjetivo y niveles bajos en la fase de oscuridad y noche subjetiva (Asai, et al, 2001; Miyamoto y Sancar, 1998). La expresión de ARNm de *Per1*, *Per2*, y *Per3* en el NSQ del ratón tiene un ritmo circadiano, tanto en condiciones de luz-oscuridad, como en condiciones de oscuridad constante, con máximos en la fase de luz y el día subjetivo (Ver Figura 4); la expresión de los genes *Per* y *Cry* se da tanto en la zona dorsomedial como en la zona ventrolateral. La expresión de las proteínas se aprecia 4-6 horas después de la de ARNm (ver Figura 4; Jin, et al, 1999; Vitaterna, et al, 1999; Miyake, et al, 2000; Yan, et al, 1999; Takumi, et al, 1998; Field, et al, 2000). Las expresiones rítmicas de los productos de transcripción se acompañan de expresiones rítmicas en las proteínas que codifican (Reppert y Weaver, 2001) La expresión de *Per1* y *Per2* sigue un gradiente de distribución temporal y espacial en el que se aprecia primero en la zona dorsomedial próxima al tercer ventrículo, y se va desplazando en sentido lateral y ventral conforme avanza el tiempo, hasta decrecer en el final del día subjetivo (Yan y Okamura, 2002). Las células que expresan ARNm para *Per1* y para *Per2* coexpresan ARNm para AVP, en la zona dorsomedial, en la zona ventrolateral por su parte no hay coexpresión de *Per1* y VIP (Dardente, et al, 2002a;b). En la región retinorecipiente en condiciones de luz-oscuridad hay un ritmo de expresión de ARNm para *Per1* y *Per2* en el NSQ, no así en oscuridad constante (Maywood, et al, 1999; Hamada, et al, 2001). En oscuridad constante, el gen *Bmal1* también tiene un ritmo de expresión, con valores en antifase respecto a los de *Per1* y *Per2* (Caldelas, et al, 2003).

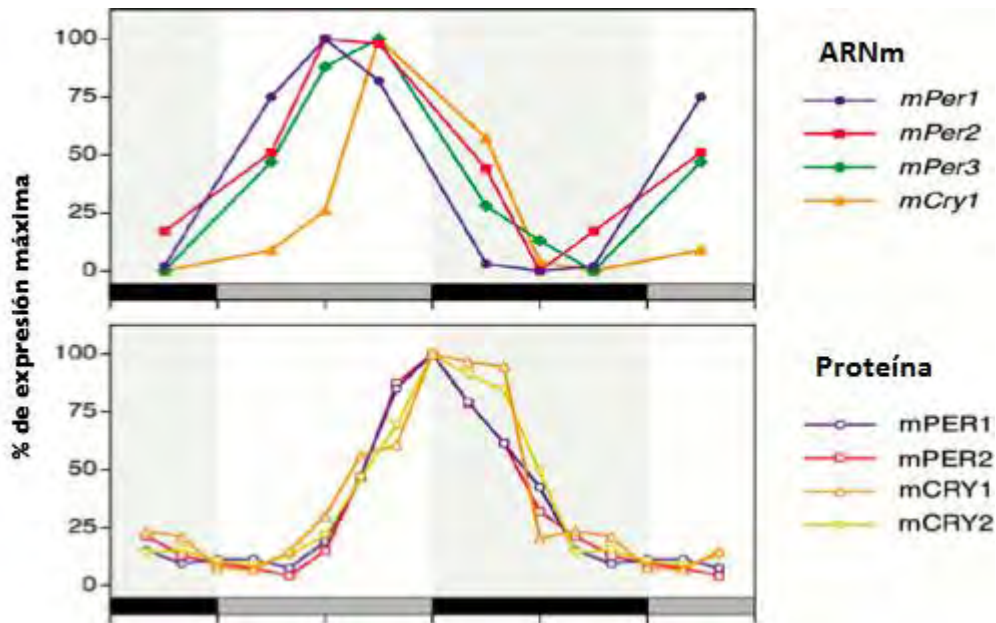


Figura 4. Expresión circadiana de ARNm y de proteínas reloj, en el NSQ bajo un ciclo de luz-oscuridad. Las barras grises representan la fase de luz y las negras la fase de oscuridad. Modificada de Reppert y Weaver, 2001.

B. SINCRONIZACIÓN FÓTICA DEL NSQ

La sincronización fótica consiste en el ajuste de la fase y la frecuencia de un ritmo al ciclo de rotación de la tierra (Daan y Aschoff, 2001). La luz es el sincronizador más poderoso del NSQ (Challet, 2007). La sincronización fótica del NSQ se ha estudiado por medio de la administración de pulsos de luz a diferentes tiempos en una ventana temporal de 24 horas, y midiendo los cambios en las variables circadianas endógenas en respuesta a dichos pulsos.

1. Cambios en la expresión de c-FOS ante pulsos de luz

En roedores bajo oscuridad constante, la administración de pulsos de luz en el día subjetivo no produce cambios de fase en el ritmo de actividad locomotora, y provocan ligeramente la expresión de c-FOS en el NSQ; en la noche subjetiva en cambio, pulsos de luz al inicio de la noche subjetiva provocan retrasos de fase en el ritmo de actividad locomotora, e incrementan la expresión de c-FOS en la zona ventral del NSQ; pulsos de luz al final de la noche subjetiva provocan avances de fase, y también expresión de c-FOS en la zona ventral (Rea, 1989; Rea, 1992; Colwell y Foster, 1992; Chambille, et al, 1993). Esta expresión se presenta en 40% de las células productoras de GRP; y en células productoras de VIP (Earnest, et al, 1993; Romijn, et al, 1996). La magnitud del avance de fase en el ritmo de actividad locomotora y de la expresión de ARNm para *c-Fos* evocada es proporcional a la intensidad luminosa del pulso (Kornhauser, et al, 1990). Esta inducción puede estar mediada por transmisión glutamatérgica, ya que la administración de un antagonistas glutamatérgicos reduce la inducción de c-FOS en el NSQ ventrolateral, ante pulsos de luz administrados en la fase de oscuridad, y reduce también los cambios de fase en el ritmo de actividad locomotora (Abe, et al, 1991; Vindlacheruvu, et al, 1992; Abe, et al, 1992).

2. Cambios en la expresión de genes reloj ante pulsos de luz

Los pulsos de luz en condiciones de oscuridad constante también tienen efectos sobre la expresión de genes reloj en el NSQ. En la rata la exposición a la luz en el día subjetivo no tiene efectos sobre la expresión de ARNm del gen *Per*; en cambio, en la noche subjetiva, incrementa la expresión, con una correlación positiva con el tiempo de exposición, y es similar a la expresión de ARNm para *Fos*. (Matsui, et al, 1993). En ratones, ratas y *Arvicanthis ansorgei*, pulsos de luz en la noche subjetiva incrementan la expresión de ARNm para *Per1* y *Per2* en el NSQ en la zona ventrolateral del NSQ, más prominentemente en su porción lateral en el caso de ; también disminuyen la expresión de *Cry2*, pero no tienen efecto sobre *Bmal1* ni *Cry1* (Takumi, et al, 1998; Zylka, et al, 1998; Yan, et al, 1999; Miyake, et al, 2000; Yan y Okamura, 2002; Dardente, et al, 2002a; Caldelas, et al, 2003; Miyamoto y Sancar, 1999). La inducción de la expresión de los genes *Per* está modulada por los genes *Cry*. En los ratones *knockout* del gen *Cry1* la expresión de ARNm para *Per1* y *Per2* en el NSQ es alta en la fase de luz y baja en la fase de oscuridad, un pulso de luz en la fase de oscuridad induce la expresión de ARNm para *Per1* y *Per2*, en los ratones *knockout* de los genes *Cry1* y *Cry2*, la expresión de ARNm para *Per1* es arrítmica y no cambia ante un pulso de luz en la fase de oscuridad; el ritmo y la respuesta a la luz de *Per2* sin embargo es normal (Vitaterna, et al, 1999).

En ratones, la administración de pulsos de luz en el inicio de la noche subjetiva inducen 9 horas después la expresión de proteína PER1, ésta última se aprecia en la zona ventrolateral del NSQ; algo similar parece suceder con la proteína PER2, pero el efecto no es significativo. En el caso de un pulso de luz en el final de la noche subjetiva la inducción de

PER1 se aprecia hasta 4 horas después. En el caso de PER2, no hay inducción (Field, et al, 2000).

La relevancia del gen *Per1* para que se lleven a cabo los cambios de fase por pulsos de luz se ha hecho evidente porque el bloqueo de la actividad de CREB inhibe los avances de fase en la actividad eléctrica inducidos por la aplicación de glutamato al NSQ de rata *in vitro*, así como el incremento en la expresión de ARNm para *Per1*. El tratamiento con sondas antisentido para el gen *Per1* impide los avances de fase en el ritmo de actividad eléctrica inducidos por glutamato en el NSQ de ratas *in vitro*. (Tischkau, et al, 2003).

C. INTERACCIÓN DEL NSQ CON SEÑALES DEL ALIMENTO

Estímulos periódicos distintos a la luz también tienen la capacidad de sincronizar variables rítmicas en los organismos. Por ejemplo, en hámsters con lesiones del NSQ el ritmo de actividad locomotora se puede sincronizar a un horario restringido de acceso al agua (Mistlberger, 1993). La estrategia experimental más utilizada para el estudio de la sincronización no fótica ha sido la restricción temporal de acceso al alimento, y la presencia de actividad previa (Actividad Anticipatoria, AA) a la presentación del alimento es indicativa de sincronización (Stephan, 2001). Este fenómeno es independiente del NSQ, ya que, por un lado, ratas y ratones con lesiones del NSQ desarrollan AA a un horario restringido de alimentación (Stephan, 1984, Marchant y Mistlberger, 1997); y por el otro que dicho paradigma no cambia la fase de los ritmos de expresión de c-FOS y de ARNm para *Per1* y *Per2* en el NSQ (Ángeles-Castellanos, et al, 2004; Damiola, et al, 2000; Hara, et al, 2001, Stokkan, et al, 2001; Mieda, et al, 2006)

Bajo ciertas condiciones, el NSQ puede ser afectado por señales temporales de alimento; por ejemplo, en condiciones de luz constante, el ritmo de expresión de proteína PER2 se abole en el NSQ, pero la restricción temporal de acceso al alimento sincroniza la actividad locomotora y provoca la reaparición de dicho ritmo de expresión de PER2 (Lamont, et al, 2005). También se ha observado que sin restringir el acceso al alimento, una entrega periódica de un alimento palatable provoca la aparición de AA, así como cambios de fase en la expresión de c-FOS en el NSQ, aunque la expresión de proteína PER1 no es influenciada por el tratamiento (Mendoza, et al, 2005a). Otra estrategia que se ha probado es la restricción temporal de acceso a un alimento hipocalórico. Los ratones bajo dicha restricción muestran mayor AA; y cambios de fase en la expresión de ARNm para *Per1*, *Cry2*, y *AVP* y de proteína PER1 en el NSQ, y también presentan un incremento en la expresión de PER1, PER2, y AVP ante pulsos de luz en la noche (Mendoza, et al, 2005b; Mendoza, et al, 2007). Estas estrategias sugieren que la actividad celular, medida por c-FOS y la expresión de genes reloj en el NSQ sí responden a señales generadas por el alimento.

D. JETLAG

Actualmente es común para mucha gente hacer viajes que implican trasladarse por varios husos horarios, por cuestiones laborales o de esparcimiento. El transporte aéreo hace posible que estos desplazamientos se realicen relativamente en poco tiempo, esto es, en menos de 24 horas. Cuando se someten a estos traslados, las personas suelen referir múltiples alteraciones, como cansancio y dificultad para concentrarse, insomnio, dificultad para realizar tareas físicas y cognitivas, y problemas gastrointestinales. Estas alteraciones tardan en desaparecer un número de días equivalente a dos tercios de la cantidad de husos horarios atravesados. Aunque la explicación completa de estas

alteraciones implicaría múltiples y complejas causas, el aspecto fundamental es la ausencia de un ajuste rápido al horario del lugar de destino por parte del NSQ, el reloj biológico (Waterhouse, 1999, Waterhouse, et al, 2007).

Una serie de trabajos se ha dedicado a abordar el problema del cambio súbito del horario de iluminación, y sus efectos sobre el NSQ. En roedores modelos experimentales han explorado el efecto de avances o retrasos súbitos en el ciclo de luz-oscuridad que emularían la situación que enfrentan los viajeros en viajes transmeridiales. Una observación común en todos los estudios es que la cantidad de ciclos transitorios para la resincronización del ritmo de actividad locomotora (un ritmo dependiente del NSQ) es menor cuando se realizan retrasos de fase que avances en el ciclo de luz-oscuridad (Satoh, et al, 2006; Murphy, et al, 2007, Mendoza, et al, 2008, Ángeles-Castellanos, et al, 2011). Con relación a los ritmos de actividad eléctrica y de expresión de genes reloj en el NSQ, las observaciones son discordantes. En un primer trabajo se encontró que en el día 1 posterior tanto a un retraso como a un avance de fase en el ciclo de luz oscuridad, el ritmo de expresión de Per1-Luc en el NSQ se encuentra resincronizado (Yamazaki, et al, 2000). Nakamura et al (2005) han encontrado que ante los retrasos de fase la resincronización de Per1-Luc también se logra en el primer ciclo, mientras que ante avances de fase hay un efecto de "overshoot", esto es, la magnitud del avance de fase en el ritmo de luminiscencia es mayor a la del avance de fase en el ciclo de iluminación; y al día 6, la resincronización es completa. El efecto "overshoot" se localiza en la zona ventrolateral, mientras que en la zona dorsomedial el cambio es de la misma magnitud del cambio de horario; en ambas zonas, la amplitud del ritmo se encuentra decrementada. En otro estudio se encontró que en el día 1 posterior al avance de fase la variabilidad interindividual en el ritmo de expresión de Per2-Luc en el NSQ se incrementa y la proporción de células rítmicas disminuye, y hasta el día 3 se encuentra resincronizado; las regiones dorsal y ventral muestran una desincronización entre ellas (Davidson, et al, 2009).

Reddy et al (2002) por su parte, mostraron que en el primer día después del avance de fase, hay una inducción de la expresión de ARNm para Per1 y Per2 en el NSQ, coincidente con la presencia de luz en el nuevo horario, pero que el máximo de expresión no se sincroniza sino hasta el tercer ciclo, y en el caso de Cry1, hasta el octavo. Nagano et al(2003), de manera similar, han reportado que la expresión de ARNm para Per1 en las zonas ventrolateral y dorsomedial del NSQ están sincronizadas una con la otra, y a su vez con el ciclo de luz-oscuridad, y que al realizar el avance de fase, ambas zonas se desincronizan una de la otra: mientras que en la zona ventrolateral la expresión de ARNm Per1 presenta un efecto "overshoot", y se resincroniza al nuevo horario de iluminación 3 días después del cambio, la zona dorsomedial lo hace hasta el día 13. una discordancia importante entre estos estudios es la variable considerada, mientras que los trabajos que refieren la resincronización instantánea miden bioluminiscencia *in vitro* de constructos Per-Luc, los trabajos que describen resincronización gradual miden expresión de ARNm Per. Esta diferencia es importante cuando se consideran los resultados de otro estudio, en el que después de realizar avances de fase en el ciclo de luz oscuridad, mientras que en las mediciones *in vitro* de Per1-Luc y de actividad eléctrica del NSQ, la resincronización se aprecia en el primer ciclo, en las mediciones *in vivo* de la actividad eléctrica, tal resincronización no se aprecia incluso en el día 6 (Vansteensel, et al, 2003)

V. OBJETIVOS

1. Confirmar los efectos de un avance de fase de 6 horas en el ciclo de luz-oscuridad en la expresión circadiana de c-FOS y PER1 en el NSQ de la rata.

2. Determinar si la restricción temporal de acceso al alimento contribuye a la resincronización de la expresión circadiana de c-FOS y PER1 en el NSQ de la rata.

VI. ANTECEDENTES

En el laboratorio también observamos que al someter a ratas a un avance de fase de 6 horas en el horario de iluminación, sus ritmos de actividad locomotora y de temperatura (dos ritmos circadianos controlados por el NSQ) no se sincronizan instantáneamente al nuevo horario, sino que se ajustan después de 10 ciclos transitorios. La cantidad de ciclos transitorios se pudo reducir combinando el cambio del ciclo de luz a un cambio simultáneo del horario de alimentación, que consistió en recorrer el acceso al alimento a la nueva fase de oscuridad por los primeros 5 días posteriores al cambio. Con esta manipulación, la resincronización de las variables se aceleró, acortándose a 3 días de ciclos transitorios (Ángeles Castellanos, et al, 2011; Figura 5). Este trabajo se propuso determinar si la restricción temporal de acceso al alimento había afectado directamente al NSQ, ejerciendo efectos sobre los ritmos de expresión de las proteínas c-FOS y PER1 en el NSQ bajo un avance de fase del ciclo de luz oscuridad de 6 horas. También se propuso averiguar cómo es dicha afectación en las zonas ventrolateral y dorsomedial del NSQ.

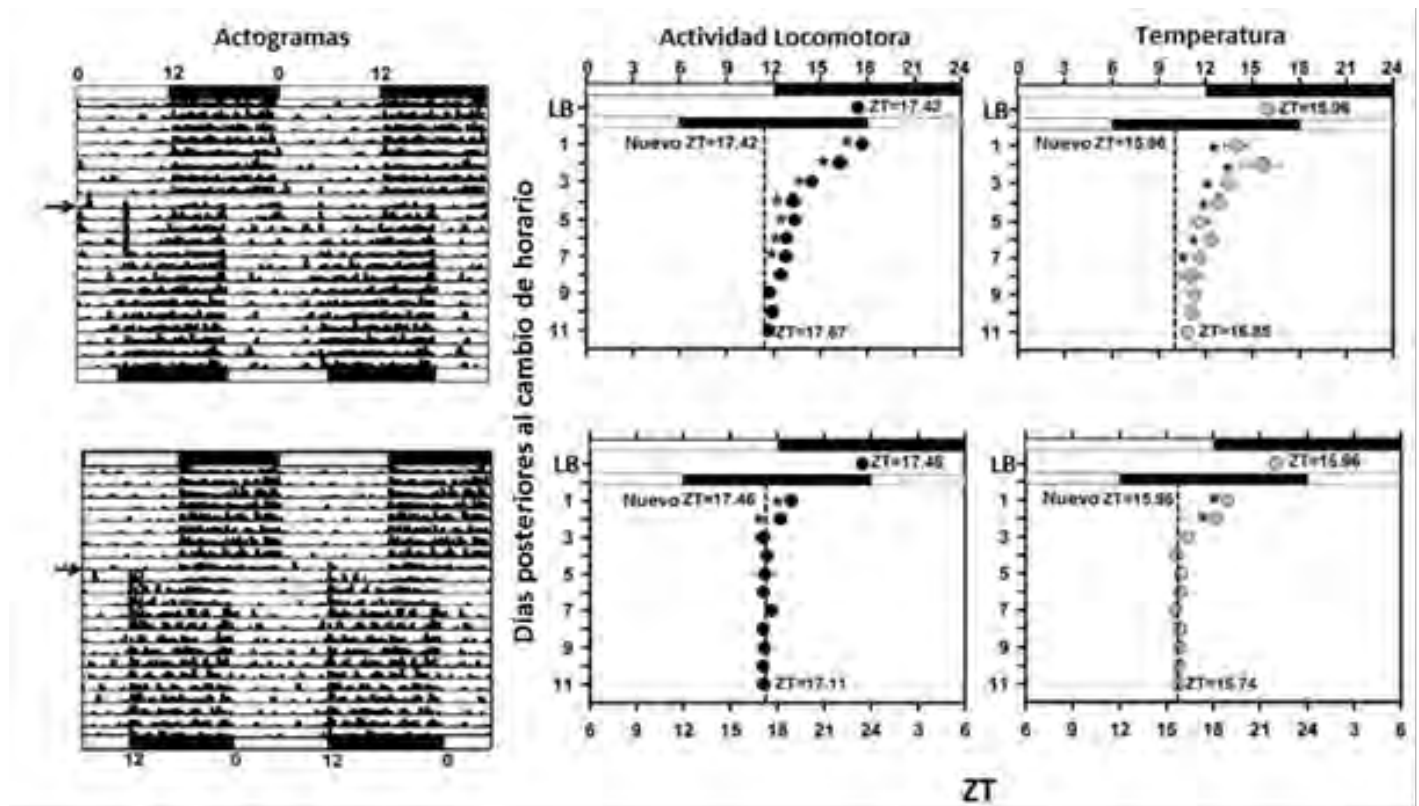


Figura 5. Actogramas representativos, y acrofases de los ritmos de actividad locomotora y temperatura en línea base y posterior a un avance de fase en el ciclo luz-oscuridad de 6 horas, bajo administración de solución salina (fila superior) o bajo restricción temporal de acceso al alimento (fila inferior). Las flechas en los actogramas representan el día del

avance, los recuadros indican el tiempo de tratamiento. LB: línea base. Modificado de Angeles Castellanos, et al, 2011.

VII. HIPÓTESIS

1. La resincronización del NSQ a un avance de fase es diferente entre la región ventrolateral y la región dorsomedial.

2. La restricción temporal de acceso al alimento acelera la resincronización de la expresión circadiana de las proteínas c-FOS y PER1 en el NSQ de la rata, después de un avance de fase de 6 horas en el ciclo de luz- oscuridad.

VIII. METODOLOGÍA

A. Sujetos

Se utilizaron ratas macho Wistar de 250 a 300 gramos de peso. Fueron alojadas en cajas individuales, en un ambiente con una temperatura constante (21° C) y un horario de iluminación 12:12 (encendido de la luz: 0700, definido como tiempo del sincronizador “0”: ZT0) con agua y alimento *ad libitum*.

B. Diseño experimental

Se formaron 3 grupos:

- Control: (N=24) fue alojado bajo el ciclo de luz-oscuridad previamente descrito durante 6 días, después de el cual fue eutanizado, en los puntos temporales ZT0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, y 21, con el objeto de construir una curva temporal de un ciclo de 24 horas. La obtención de los cerebros se realizó en tres series experimentales, cada una de las cuales consistió en el sacrificio de un sujeto por punto temporal, desde ZT0 hasta ZT21.
- Jet-lag (N=24) se alojó por 5 días en las mismas condiciones que el grupo control, y en el día 6 el inicio de la fase de oscuridad se adelantó por 6 horas, para lo cual se adelantó el inicio de la noche apagando las luces a ZT6 (1300). Las ratas fueron sacrificadas a partir de este punto temporal, una vez realizado el avance de fase del ciclo luz-oscuridad, cada tres horas hasta completar 24 h. Se procedió en tres series experimentales de un sujeto por punto temporal en cada serie.
- Jet-lag y alimento (N=24) se alojó por cinco días en las mismas condiciones basales que el grupo control; en el día 5, el alimento fue retirado de los comederos. En el día 6 se realizó el avance de fase del ciclo luz-oscuridad como descrito para el grupo Jet-lag, y concomitantemente con el apagado de la luz se les colocó alimento en los comederos por 2 horas. Las ratas fueron sacrificadas cada 3 horas en las condiciones ya descritas para el grupo JetLag. Se procedió en tres series experimentales de un sujeto por punto temporal en cada serie.

C. Obtención de cerebros

Las ratas fueron eutanizadas con una sobredosis de Pentobarbital, a las que se encontraban en la fase de oscuridad se les cubrieron los ojos para evitar exposición a la luz. Posteriormente fueron perfundidas transcárdialmente con 250 mL de NaCl 0.9%, seguida de PBS-paraformaldehído 4%. Se extrajeron los cerebros y se postfijaron en PBS-

paraformaldehído 4% por 24 horas. Posteriormente se crioprotegieron con solución de sacarosa 30%. Se obtuvieron 4 series de cortes coronales de 40 micrómetros de espesor, en un crióstato (Leica). Se cortó exclusivamente el hipotálamo anterior, y se depositaron en charolas de 12 pozos con una solución de PB-NaCl 0.9% (PBS).

D. Inmunohistoquímica

Los cortes se depositaron en tinas y se preincubaron con PBS-H₂O₂, 3% (pH 7.2), por 10 minutos. Posteriormente se lavaron tres veces con PBS pH7.2, y se incubaron por 48 h a 4°C en una solución de PBS + gelatina nutritiva 0.25% + Tritón X-100 0.5% (supermix) conteniendo anticuerpos primarios desarrollados en conejo contra c-FOS (Santa Cruz, 1:1000) o PER1 (Milipore, 1:1000). Posteriormente, los cortes fueron lavados tres veces con PBS, y se incubaron en solución supermix conteniendo anticuerpo biotinilado anti-conejo (Vector, 1:200) por 120 minutos, a temperatura ambiente. Después los cortes se lavaron tres veces con PBS, y se incubaron en solución supermix conteniendo el complejo avidina-biotina-peroxidasa de rábano (Vector, 9:1000), por 120 minutos. Después se lavaron nuevamente en PBS tres veces, y se depositaron en tinas conteniendo buffer Trizma 7.2 0.01M, 35µl de peróxido de hidrógeno 30% y diaminobencidina 0.05% como cromógeno. Al terminar el revelado, los cortes fueron montados en portaobjetos gelatinizados, y se permitió que se secan al aire por 1 día. Después fueron deshidratados con un gradiente de concentración de etanol y xileno, y finalmente cubiertos con cubreobjetos y medio de montaje (Entellan-Merck).

E. Digitalización de imágenes y conteo celular

Se tomaron fotografías digitales del NSQ medial con una cámara digital (Evolution LC) conectada a un microscopio óptico (Olympus), a 10X, que correspondieran al nivel anteroposterior bregma -1.30mm de atlas estereotáxico del cerebro de la rata de Paxinos y Watson (1998). De cada sujeto, se adquirieron 2 imágenes, correspondientes al NSQ izquierdo y derecho respectivamente. Las imágenes después se analizaron con el programa ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda). Primero se estimó el valor de fondo, midiendo dos áreas adyacentes al NSQ en las que no se apreciara inmunopositividad, los valores resultantes se promediaron y se usaron para establecer el umbral de conteo. Para c-FOS, se incluyeron todas las marcas que midieran como máximo 65% del valor de fondo. Para PER1, se incluyeron todas las marcas que midieran 60% del valor de fondo. Las zonas ventrolateral y dorsomedial del NSQ se definieron con base en lo establecido en Moore et al (2002). La cantidad de células medida en cada zona de cada fotografía se sumó a su contralateral correspondiente. Se cuantificó una sección por cerebro.

F. Análisis de datos

Los datos obtenidos de los conteos celulares en cada zona del NSQ de cada serie experimental por separado se ordenaron de acuerdo a horas geográficas y se sometieron a un ajuste Cosinor, usando el programa MatLab. Con este análisis se obtuvieron las amplitudes y las acrofases de cada serie experimental. Las acrofases y las amplitudes se sometieron a un Análisis de Varianza, seguido de una prueba post-hoc de las Mínimas Diferencias Significativas (Least Significant Differences; LSD).

IX. RESULTADOS

A. Expresión de c-FOS en la zona ventrolateral del NSQ

En condiciones basales de luz-oscuridad la expresión de c-FOS muestra ritmicidad, con niveles máximos en la primera mitad de la fase de luz, y una disminución en los niveles de expresión en la fase de oscuridad.; El análisis de cosinor estableció la acrofase a las 12.04 h (ZT 5.04 del horario previo). En el grupo JetLag, la acrofase media se estableció a las 6.27 h (ZT5.27 del nuevo horario). En el grupo de JetLag+Alimento la acrofase media se estableció a las 5.63 h (ZT4.63 del nuevo horario). El ANOVA realizado a las acrofases indicó diferencias significativas entre los grupos (F: 211.678; $p=0.000027$); la prueba post-hoc reveló que los grupos experimentales difieren significativamente del grupo control. El ANOVA realizado a las amplitudes obtenidas con el análisis de cosinor también indicó diferencias significativas entre los grupos (F: 6.961; $p=0.027317$); la prueba post-hoc reveló que en ambos grupos experimentales la amplitud del ritmo se incrementó con respecto al grupo control (Tabla 1, Figuras 6 y 7).

B. Expresión de c-FOS en la zona dorsomedial del NSQ

En el grupo control la expresión de c-FOS mostró ritmicidad con niveles máximos en la segunda mitad de la fase de luz y una disminución de dicha expresión en la fase de oscuridad; del análisis de cosinor se estableció la acrofase media del grupo a las 15.08 h (ZT8.08 del horario previo). En el grupo Jet-Lag, la acrofase media se estableció a las 16.14 h (ZT15.14 del nuevo horario). En el grupo de JetLag+Alimento la acrofase media se encontró a las 15.04 h (ZT15.04 del nuevo horario). El ANOVA realizado a las acrofases no indicó diferencias significativas entre los grupos (F: 1.076; $p=0.398516$). El ANOVA realizado a las amplitudes obtenidas con el análisis de cosinor indicó diferencias significativas entre los grupos (F: 9.757; $p=0.013003$); la prueba post-hoc reveló que en ambos grupos experimentales la amplitud del ritmo fue significativamente menor ala del grupo control (Tabla 1, Figuras 6 y 8).

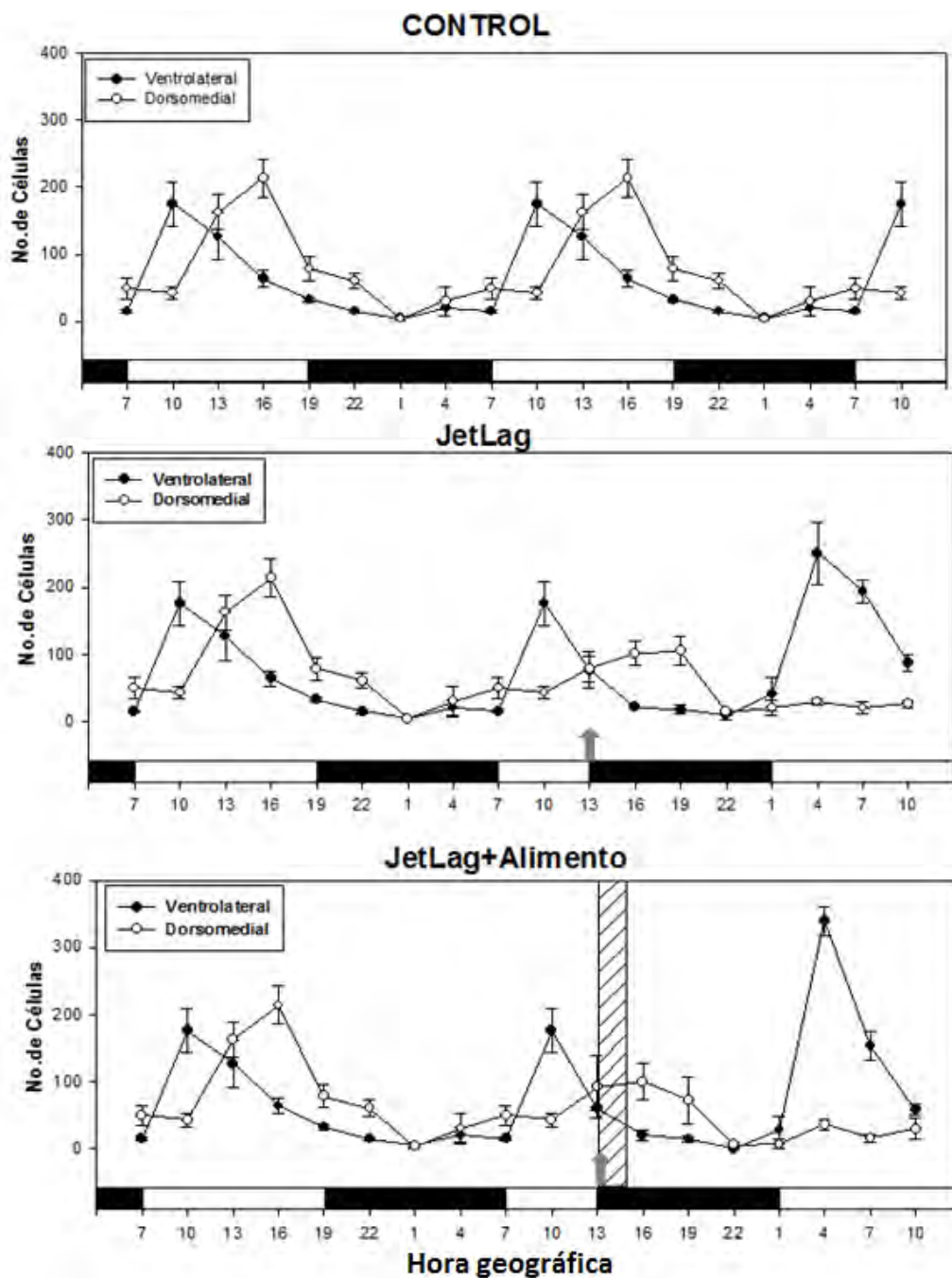


Figura 6. Expresión de c-FOS en el NSQ en los grupos control y experimentales. En el eje de las abscisas se indica la hora geográfica, y las barras negras y blancas representan las fases de oscuridad y luz, respectivamente. En las gráficas de los grupos experimentales, los puntos correspondientes a las primeras 30 horas son valores obtenidos del grupo control, y constituyen una línea base, con el fin de apreciar los cambios en la expresión debido a las manipulaciones experimentales. En estas mismas gráficas, las flechas indican el momento en el que se realizó el avance del inicio de la oscuridad. El recuadro en la gráfica JETLAG+ALIMENTO corresponde al tiempo de acceso al alimento (2 horas al inicio de la nueva fase de oscuridad).

TABLA 1				
	NSQ VENTROLATERAL		NSQ DORSOMEDIAL	
GRUPO	AMPLITUD	ACROFASE	AMPLITUD	ACROFASE
CONTROL	68.73±15.22	12.04±0.39	81.77±19.06	15.08±0.55
JETLAG	100.87±13.31*	6.27±0.60*	43.57±6.59*	16.14±0.58
JETLAG+AL	108.47±12.89*	5.63±0.13*	45.27±4.80*	15.04±1.62

Tabla 1. Amplitud y acrofase de los conteos celulares para c-FOS, obtenidas por medio de análisis de cosinor. *: $p < .05$, en la prueba LSD, respecto del grupo control. Las acrofases están expresadas en horas geográficas. Los datos representan la media \pm error estándar para todas las variables y estimados.

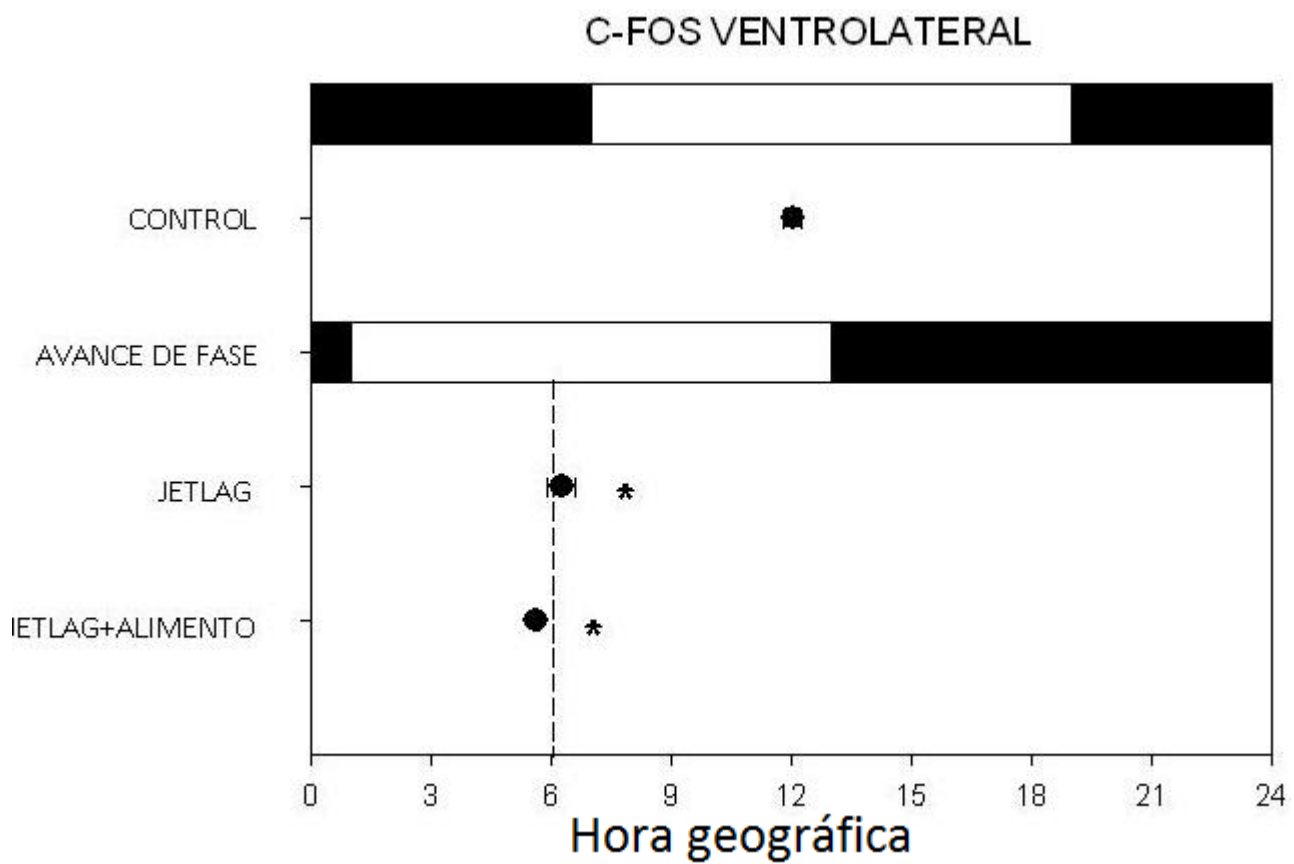


Figura 7. Acrofase media \pm error estándar de la expresión de c-FOS en la zona ventrolateral del NSQ, obtenidas por medio del análisis de cosinor. En el eje de las abscisas se indica la hora geográfica. Las barras blancas y negras representan las fases de luz y oscuridad, respectivamente, de las condiciones control y avance de fase; *: $p < .05$, en la prueba LSD, respecto del grupo control.

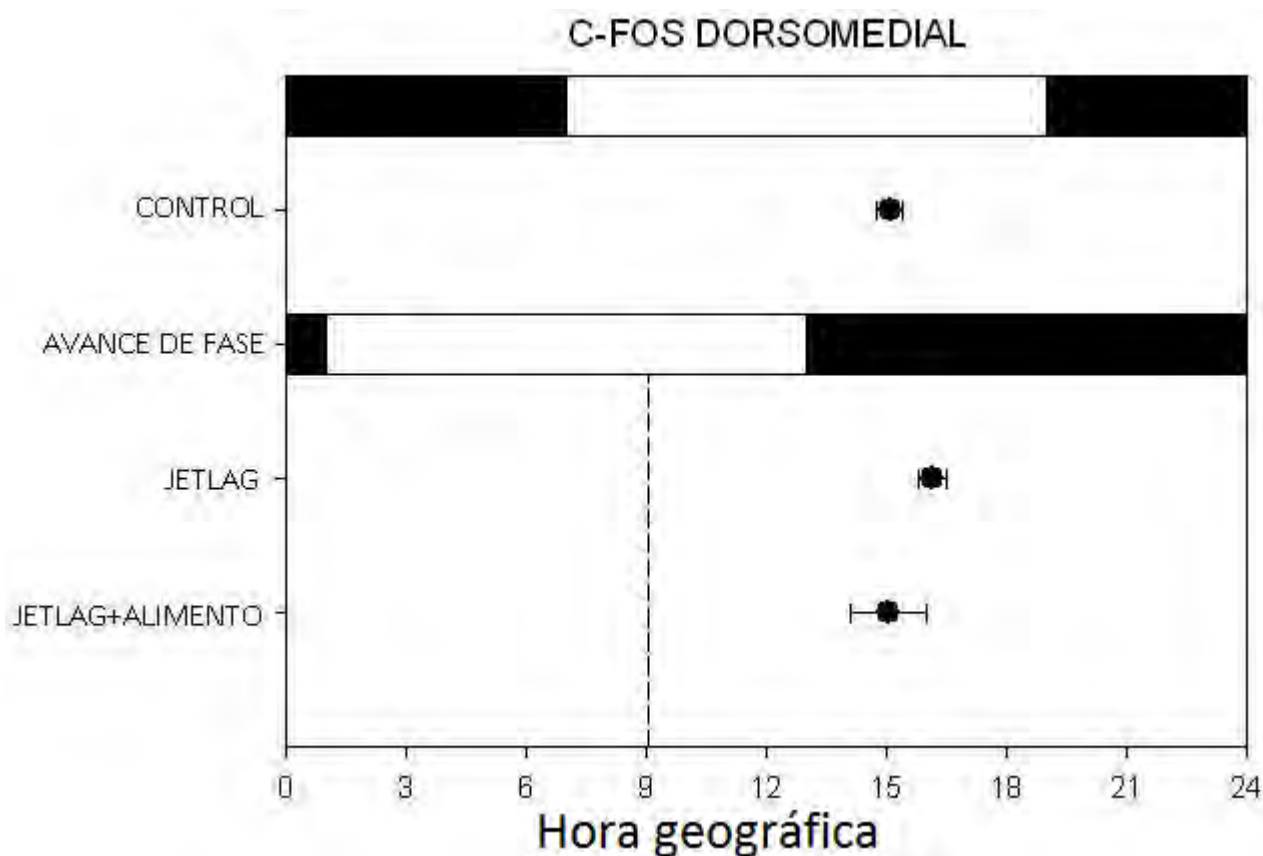


Figura 8. Acrofase media \pm error estándar de la expresión de c-FOS en la zona dorsomedial del NSQ, obtenidas por medio del análisis de cosinor. En el eje de las abscisas se indica la hora geográfica. Las barras blancas y negras representan las fases de luz y oscuridad, respectivamente, de las condiciones control y posterior al avance de fase; *: $p < .05$, en la prueba LSD, respecto del grupo control.

C. Expresión de PER1 en la zona ventrolateral del NSQ

En el grupo control la expresión de PER1 muestra ritmicidad con niveles máximos al inicio de la fase de oscuridad. El análisis de cosinor estableció la acrofase a las 21.68 h (ZT14.68 del horario previo). En el grupo de JetLag, el análisis de cosinor estableció la acrofase media a las 12.07 h (ZT11.07 del nuevo horario). En el grupo de JetLag+Alimento el análisis de cosinor estableció la acrofase media a las 12.45 h (ZT11.45 del nuevo horario). El ANOVA realizado a las acrofases indicó diferencias significativas entre los grupos ($F: 8.720$; $p=0.016770$); la prueba post-hoc reveló que ambos grupos experimentales difieren del grupo control. El ANOVA realizado a las amplitudes obtenidas con el análisis de cosinor no indicó diferencias significativas entre los grupos ($F: 2.315$; $p=0.179764$) (Tabla2, Figuras 9 y 11).

D. Expresión circadiana de PER1 en la zona dorsomedial del NSQ

La expresión de PER1 en el NSQ dorsomedial mostró ritmicidad, con niveles máximos en la primera mitad de la fase de oscuridad; del análisis de cosinor se estableció la acrofase media

a las 21.43 h (ZT14.43). En el grupo de JetLag la acrofase media se estableció a las 14.65 h (ZT 7.65 del ciclo previo). En el grupo de JetLag+Alimento la acrofase media se encontró a las 19.58 h (ZT 12.58 del ciclo anterior). El ANOVA realizado a las acrofases indicó diferencias significativas entre los grupos (F: 13.445; p=0.006070); la prueba post-hoc reveló que el grupo JetLag difiere de los grupos control y JetLag+Alimento. El ANOVA realizado a las amplitudes obtenidas con el análisis de cosinor indicó diferencias significativas entre los grupos (F: 10.406; p=0.011204); la prueba post-hoc reveló que en ambos grupos experimentales la amplitud del ritmo disminuyó con respecto al grupo control (Tabla 2, Figuras 10 y 11).

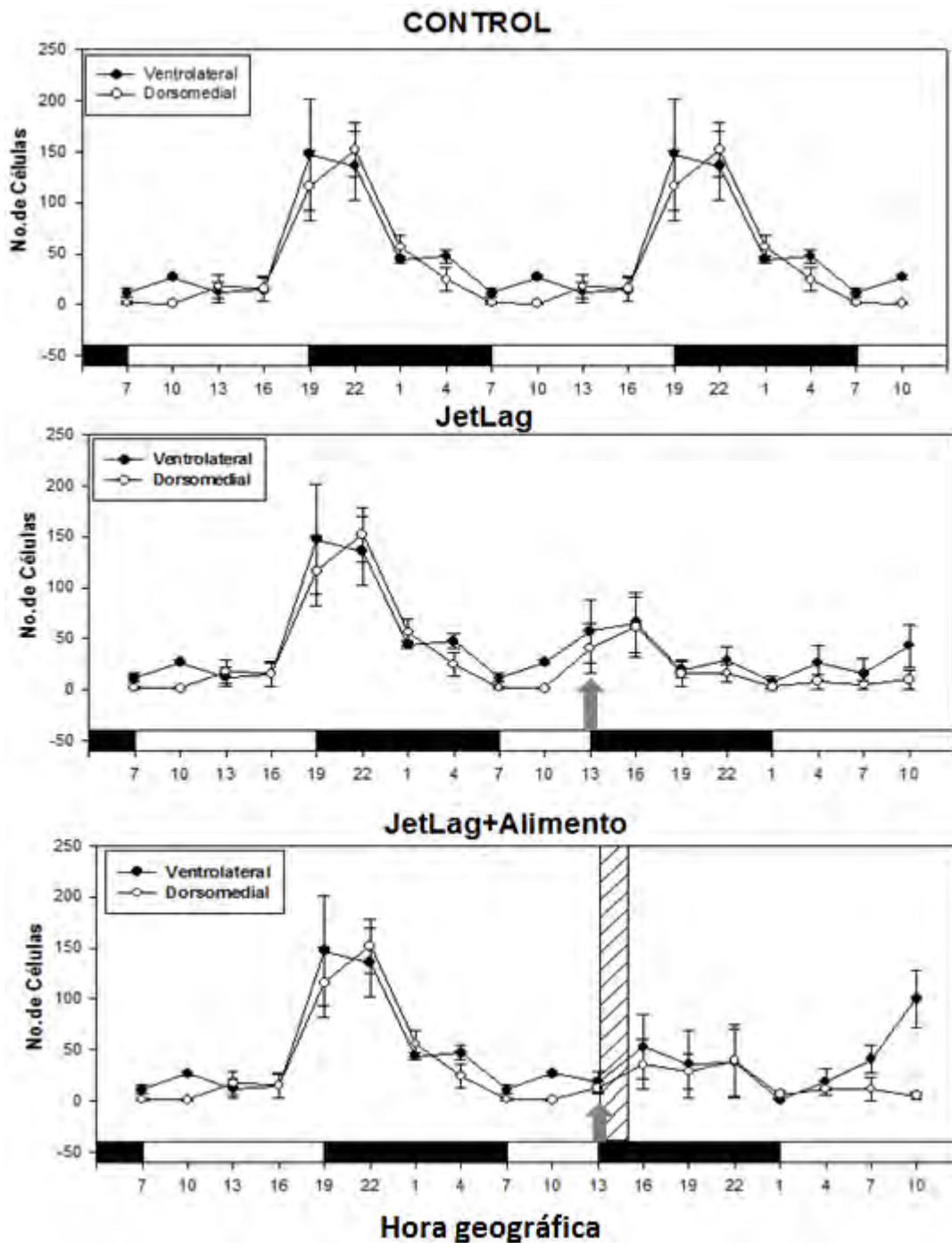


Figura 9. Expresión de PER1 en el NSQ en los grupos control y experimentales. En el eje de las abscisas se indica la hora geográfica, y las barras negras y blancas representan las fases de oscuridad y luz, respectivamente. En las gráficas de los grupos experimentales, los puntos correspondientes a las primeras 30 horas son valores obtenidos del grupo control, y constituyen una línea base, con el fin de apreciar los cambios en la expresión debido a las manipulaciones experimentales. En estas mismas gráficas, las flechas indican el momento en el que se realizó el avance del inicio de la oscuridad. El recuadro en la gráfica JETLAG+ALIMENTO corresponde al tiempo de acceso al alimento (2 horas al inicio de la nueva fase de oscuridad).

TABLA 2				
	PER1 VENTROLATERAL		PER1 DORSOMEDIAL	
GRUPO	Amplitud	acofase	amplitud	acofase
CONTROL	59.20±30.34	21.68±1.06	67.90±7.58	21.43±1.23
JETLAG	29.40±7.67	12.07±2.62*	22.73±13.95*	14.50±0.95*
JETLAG+AL	27.53±11.68	12.45±3.09*	15.53±8.75*	19.58±2.12

Tabla2. Amplitud y acofase de los conteos celulares para PER1, obtenidas por medio de análisis de cosinor. *: $p < .05$, en la prueba LSD, respecto del grupo control. Las acrofases están expresadas en horas geográficas. Los datos representan la media \pm error estándar para todas las variables y estimados.

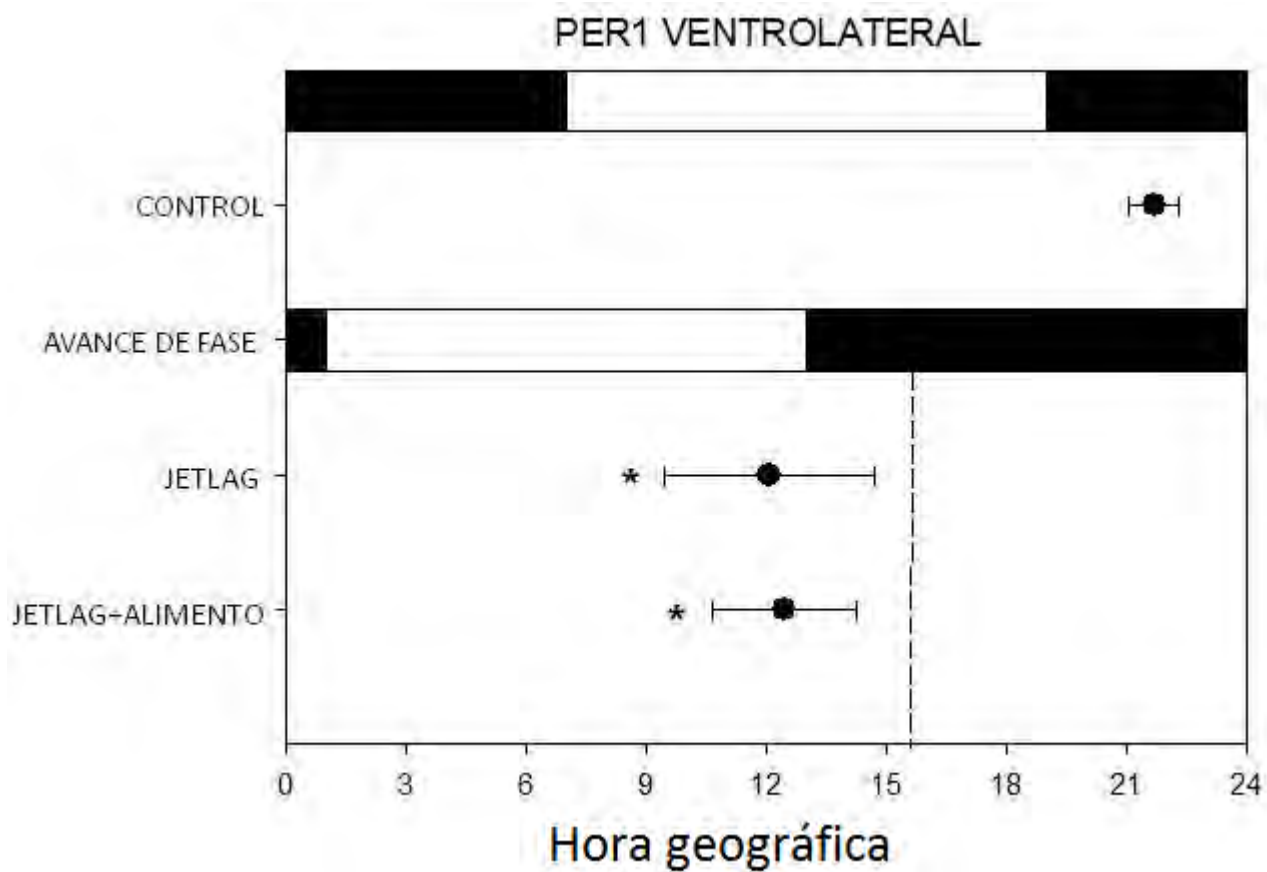


Figura 10. Acrofase media \pm error estándar de la expresión de PER1 en la zona ventrolateral del NSQ, obtenidas por medio del análisis de cosinor. En el eje de las abscisas se indica la hora geográfica. Las barras blancas y negras representan las fases de luz y oscuridad, respectivamente, de las condiciones control y avance de fase; *: $p < .05$, en la prueba LSD, respecto del grupo control.

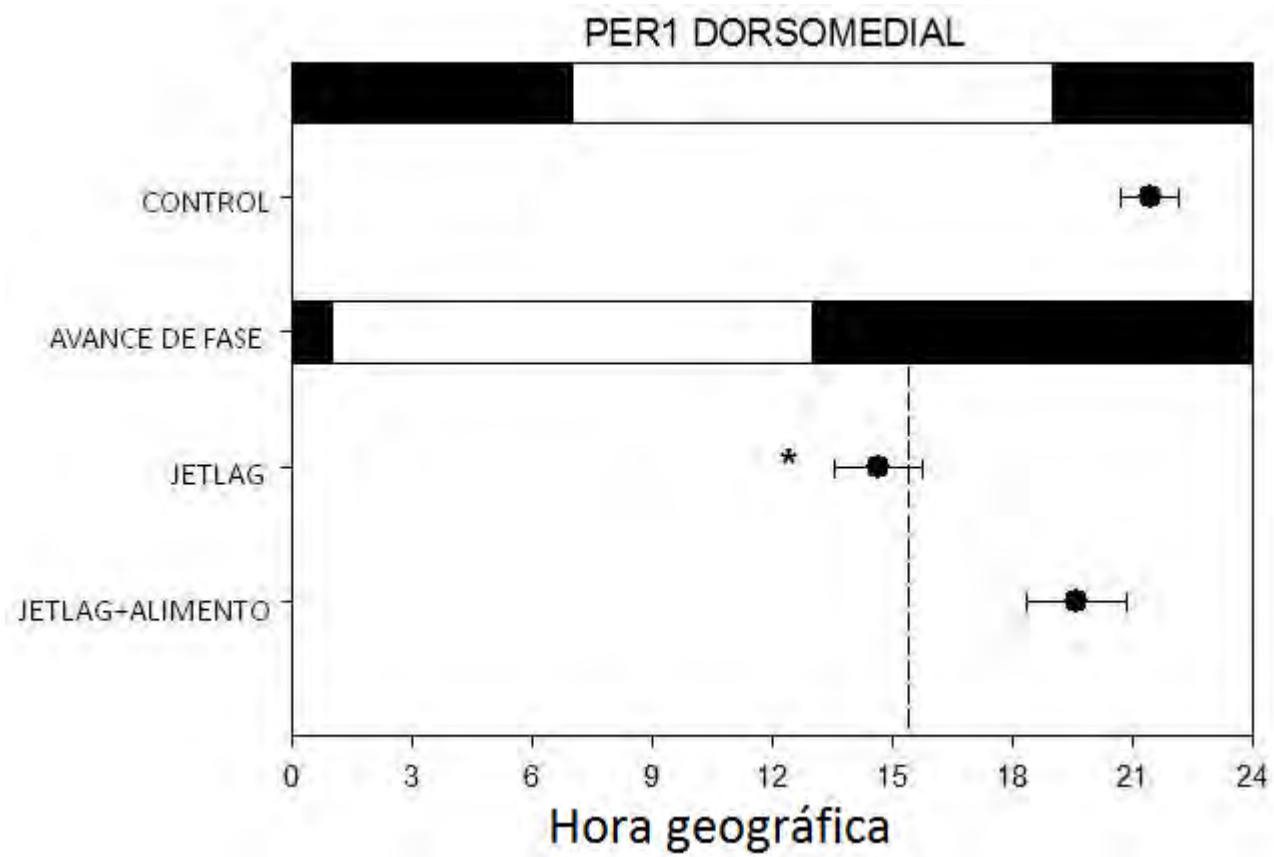


Figura 11. Acrofase media \pm error estándar de la expresión de PER1 en la zona dorsomedial del NSQ, obtenidas por medio del análisis de cosinor. En el eje de las abscisas se indica la hora geográfica. Las barras blancas y negras representan las fases de luz y oscuridad, respectivamente, de las condiciones control y avance de fase; *: $p < .05$, en la prueba LSD, respecto del grupo control.

X. DISCUSIÓN

Es posible que la falta de resincronización de la expresión de c-FOS en la zona dorsomedial en ambos grupos experimentales reflejen los datos obtenidos en estudios previos (Vanstenseel, et al, 2003; van Oosterhout, et al, 2008) en los que se encuentra que después de un avance de fase la actividad eléctrica del NSQ, registrada *in vivo*, no adquiere relación de fase con el nuevo horario de iluminación, y en cambio muestra un avance muy pequeño. Se ha encontrado que ante avances de fase en el ciclo de luz-oscuridad, la actividad eléctrica multiunitaria del NSQ se torna muy variable en cuanto a sus picos de actividad, lo que resulta en una desincronización a lo interno del NSQ (Rohling, et al, 2011).

Los datos obtenidos en la zona ventrolateral podrían explicarse por los hallazgos que reportan que la presencia de luz en la fase de oscuridad inducen la expresión de c-FOS (Colwell y Foster, 1992; Teclemariam-Mesbah, et al, 1995; Best, et al, 1999); el paradigma de avance de fase en el ciclo de luz-oscuridad utilizado en este estudio asemeja la presencia de luz en la segunda parte de la fase de oscuridad previa al cambio de horario. Esta presencia de luz induce la expresión de c-FOS, en la zona ventrolateral, en las células VIP y GRP (Schwartz, et al, 2000; Romijn, et al, 1996; Field, et al, 2000,). Esta zona, a diferencia de la zona dorsomedial, no posee una ritmicidad endógena en la expresión de c-FOS (Sumová, et al, 1998), sino que dicha expresión puede ser inducida por la luz durante tres cuartas partes del ciclo circadiano (Schwartz, et al, 1994).

En el caso de la zona dorsomedial, la presencia de la nueva oscuridad tiene un efecto de disminución de la expresión de c-FOS esperada en ZT12 del horario anterior, lo cual se confirma con la disminución de la amplitud. Esto asemeja a lo reportado por Mendoza, et al (2009), quienes han encontrado que la administración de pulsos de oscuridad reduce los niveles de expresión de c-FOS 1 hora después, aunque en dicho trabajo no se distingue si el efecto observado toma lugar en una subdivisión particular del NSQ.

Por otro lado, la restricción temporal de acceso al alimento no tuvo efectos sobre la resincronización de la expresión de c-FOS en el NSQ. Ha sido observado antes que dicho paradigma, bajo un ciclo estable de luz-oscuridad, modifica sólo la amplitud de la acrofase de expresión tres semanas después de iniciado el tratamiento, no así por una privación aguda de alimento, ni por una privación seguida de una realimentación (Ángeles Castellanos, et al, 2004).

En cuanto a la expresión de PER1, la disminución observada en la amplitud de la expresión coincide con lo que ha sido reportado en estudios previos, para ARNm *Per1* (Nakamura, et al, 2005); este estudio encuentra una resincronización instantánea, coincidiendo con el estudio previamente realizado por Yamazaki et al (2000); sin embargo, otro estudio presenta desfase de la zona dorsomedial respecto del nuevo horario de iluminación, pero no reporta una pérdida de amplitud (Nagano, et al, 2003). En el caso del presente trabajo, se observan coincidencias con los dos primeros estudios, en el caso de la zona ventrolateral, al observarse un avance de fase mayor al avance de fase en el ciclo de luz oscuridad (efecto “overshoot”; Nakamura, et al, 2005); y en el caso de la zona dorsomedial, al encontrarse que la acrofase de expresión de PER1 muestra un avance en el primer ciclo, sin embargo es posible que esto se deba a la amortiguación del pico de

expresión. El hecho de que la expresión en el grupo JetLag disminuye con el inicio de la nueva fase de oscuridad podría tener relación con lo observado por Mendoza, et al (2004), quienes encontraron que la administración de pulsos de oscuridad en hámsters reduce la expresión de ARNm para *Per1* en el NSQ.

Contrario a lo esperado, la expresión de PER1 en la zona dorsomedial no muestra un avance de fase, el cual al parecer toma lugar en condiciones de cambio de horario y alimentación ad libitum. Se ha establecido que los paradigmas de restricción temporal de acceso al alimento no tiene efectos sobre la expresión de genes reloj en el NSQ (Damiola, et al, 2000; Hara, et al, 2001; Stokkan, et al, 2001), excepto cuando se trata de dietas hipocalóricas (Caldelas, et al, 2005, Mendoza, et al, 2005b, Mendoza, et al, 2007). Lo obtenido en el presente experimento parece sumarse a estos estudios, en el sentido en el que un paradigma de restricción temporal de acceso al alimento afecta la expresión de genes reloj en el NSQ cuando se combina con un cambio súbito en el horario de iluminación; para confirmar este hecho sería necesario medir la expresión de PER1 en los días siguientes al cambio en animales sujetos a dicho paradigma.

Se ha descrito previamente que la exposición a pulsos de luz durante la fase de oscuridad induce la expresión de ARNm para *Per1*, específicamente en la zona ventrolateral (Zylka, et al, 1998; Yan, et al, 1999; Dardente et al, 2002b); en el caso de este estudio, el inicio de la luz bajo el nuevo horario coincide con la mitad de la fase de oscuridad del previo, lo que hace pensar que la elevación de la expresión observada en la zona ventrolateral es resultado de esta exposición a la luz, en una fase circadiana en la que dicha expresión es evocable (bajo el horario previo). Este hallazgo parece coincidir con un estudio previo, en el que la administración de pulsos de luz en la fase de oscuridad induce incrementos en la expresión 4, 6, y 8 horas después del tratamiento (Yan y Silver, 2004).

Los avances de fase en los ritmos de expresión de c-FOS y de PER1 se podrían explicar por eventos sinápticos e intracelulares en el NSQ. VIP y GRP provocan cambios de fase en el ritmo de actividad eléctrica en el NSQ in vitro y en el ritmo de actividad locomotora in vivo (McArthur, et al, 2000; Reed, et al, 2001; Kallungal y Mintz, 2006), Estos grupos celulares expresan c-FOS ante estímulos que provocan cambios de fase (Romijn, et al, 1996). Estudios recientes muestran que los avances de fase se relacionan con una serie de factores intracelulares. CREM-ICER se expresan en el NSQ VL en los avances de fase (Schwartz, et al, 2005); en los avances de fase también está involucrada la vía RAFK-MAPK-ERK. La inhibición de RAFK promueve la fosforilación de ERK, y la expresión de c-FOS y PER1 (Antoun, et al, 2012, Guillaumond, et al, 2007), dicha fosforilación lleva a la activación de RSK's que son cinasas efectoras de esta vía, y funcionan como factores de transcripción y reguladores de la estructura de la cromatina (Butcher, et al, 2005). Por otro lado, la inhibición de PDE cGMP incrementa la magnitud de los avances de fase y disminuye la cantidad de ciclos transitorios ante avances del ciclo luz-oscuridad, e incrementa la expresión de c-FOS en el NSQ (Plano, et al, 2012). CREB es otro factor involucrado, ya que si se bloquea su unión a CRE's, se impiden los avances de fase, y los incrementos en la expresión de ARNm para *per1* (Gamble, et al, 2007). En el presente trabajo, los incrementos en la expresión de c-FOS posteriores al cambio de horario se observan en la zona ventrolateral, que es la zona donde se encuentran las células VIP y GRP, por lo que es posible que los avances de fase observados sean resultado de las interacciones arriba mencionadas. La presencia de oscuridad en la fase original de luz es un punto difícil de abordar, puesto que escasos estudios han abordado los efectos de la oscuridad sobre el NSQ. Uno de ellos refiere que la

administración de pulsos de oscuridad en el día subjetivo provocan cambios de fase en una relación inversa a los de luz y disminuyen la expresión de ERK fosforilada en el NSQ (Coogan y Piggins, 2005); en el presente trabajo se esperaría que la oscuridad resultara en un adelanto de fase, lo cual sucede, excepto en el caso la expresión de PER1 del grupo JL+ALIMENTO. Habiendo mencionado que la restricción temporal de acceso al alimento no tiene efectos sobre la expresión de PER1 en el NSQ, lo cual podría estar relacionado con el factor *dexras1*, dado que cuando se elimina este gen, la restricción de acceso al alimento provoca incrementos en la expresión de PER1 en el NSQ, e incrementos en la fosforilación de ERK (Bourchard-Cannon y Cheng, 2012). La ausencia de trabajos que aborden los mecanismos moleculares en el NSQ en relación con el NSQ hace difícil una interpretación de lo observado en el presente trabajo.

Una posibilidad es que el efecto de aceleración de la resincronización de los ritmos de actividad locomotora y de temperatura por la restricción temporal de acceso al alimento se deba a la modificación de la ritmicidad en otras estructuras cerebrales más allá del NSQ. Se ha observado que la restricción temporal de acceso al alimento modifica los ritmos de expresión de c-FOS en el hipotálamo, en los núcleos PVN y DMH, y las áreas LH, perifornical (PeF) y tuberomamilar (TM); así como la aparición de un ritmo de expresión de la proteína PER1 en el DMH, el NArc, y en el PeF (Ángeles Castellanos, et al, 2004; Ángeles Castellanos et al, 2008). Fuera del hipotálamo, el núcleo del tracto solitario y el núcleo parabraquial, los cuales constituyen la entrada de señales viscerales al sistema nervioso central, también presentan un ritmo de expresión de c-FOS bajo una restricción temporal de acceso al alimento (Ángeles Castellanos, et al, 2005). La restricción temporal de acceso al alimento también provoca la aparición de ritmo de expresión de c-FOS en estructuras pertenecientes al sistema límbico, como la amígdala central, el septum lateral, el NLST y el PVT, e incrementa y cambia la fase del ritmo en el núcleo Accumbens, en sus regiones core y shell, la amígdala basolateral, el hipocampo y la corteza prefrontal. También cambia la fase del ritmo de expresión de proteína PER1 en el Accumbens core y shell, en el hipocampo y en la corteza prefrontal, el PVT, y el séptum lateral, e impone la aparición de un ritmo en la amígdala basolateral (Ángeles Castellanos, et al, 2007), todas estas estructuras forman parte del sistema motivacional. Es importante notar que la restricción temporal de acceso al alimento provoca una reducción en la expresión de c-FOS en el NSQ dorsal y ventral en la hora en la que el alimento es esperado, y que cuando el horario de alimentación varía, los eventos de alimentación generan un incremento en la actividad locomotora más o menos 24 horas después. La restricción fija y la restricción variable provocan incrementos en la expresión de c-FOS en el ARC y en el DMH (Escobar, et al, 2007). Por lo anterior, se podría pensar que el efecto observado en nuestro experimento previo, en el cual el ritmo de actividad locomotora se resincroniza más rápidamente al cambio de horario, se deba a la influencia de la restricción temporal de acceso al alimento sobre núcleos cerebrales del hipotálamo, relacionados con el balance energético, la integración de señales autonómicas, y la regulación de estados de vigilancia; y del sistema límbico, relacionados con la motivación y las conductas dirigidas por recompensas. El determinar si la aceleración de la resincronización por el alimento se da por efectos en otras estructuras, requeriría extender el análisis a las estructuras cerebrales mencionadas. Si el efecto sobre el NSQ es gradual y se da posterior a dos ciclos se requiere realizar los muestreos en los días siguientes al avance de fase.

XI. CONCLUSIONES

1. Los resultados indican que la resincronización de la expresión de c-FOS en el NSQ de la rata después de un avance de fase de 6 horas se logra en el transcurso del primer ciclo bajo el nuevo régimen de iluminación únicamente en la zona ventrolateral, no así en la zona dorsomedial.
2. Se observó que en el 1er ciclo se presenta una desincronización entre las zonas dorsomedial y ventrolateral del NSQ, la cual consiste en un ajuste temporal de la zona ventrolateral al nuevo horario, y una ausencia de cambios de fase en la zona dorsomedial.
3. El ritmo de expresión de PER1 en la zona dorsomedial muestra un avance de fase en el primer ciclo, resultado tal vez de la amortiguación del pico nocturno.
4. La restricción temporal de acceso al alimento, concomitante con el avance de fase, no tiene efecto sobre la expresión de c-FOS en el NSQ, pero impide que la expresión de PER1 se sincronice al nuevo horario.

XII. PERSPECTIVA

Los resultados de este estudio abren la posibilidad de que la restricción temporal de acceso al alimento, como estrategia para la aceleración de la resincronización de los ritmos de actividad locomotora y de temperatura pudiera estar influyendo a través de otras estructuras cerebrales cuya ritmicidad se ha observado se sincroniza por el alimento, como la corteza, el NPV, el HDM, o el NArc (Wakamatsu, et al, 2001; Ángeles Castellanos, et al, 2007; Ángeles Castellanos, et al, 2008). Para confirmarlo se requeriría de analizar otras estructuras cerebrales, en el transcurso de los días siguientes a un avance de fase en el ciclo de luz oscuridad.

XIII. REFERENCIAS

- Abe H, Rusak B, Robertson HA. (1991) Photic induction of Fos protein in the suprachiasmatic nucleus is inhibited by the NMDA receptor antagonist MK-801. *Neurosci Lett* 127(1):9-12
- Abe H, Rusak B, Robertson HA. (1992) NMDA and non-NMDA receptor antagonists inhibit photic induction of Fos protein in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Brain Res Bull* 28(5):831-5.
- Albers HE, Liou SY, Stopa EG, Zoeller RT. (1991) Interaction of colocalized neuropeptides: functional significance in the circadian timing system. *J Neurosci* 11(3):846-51.
- Albrecht U. (2012) Timing to perfection: the biology of central and peripheral circadian clocks. *Neuron* 74(2):246-60.
- Angeles-Castellanos M, Aguilar-Roblero R, Escobar C. (2004) c-FOS expression in hypothalamic nuclei of food-entrained rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286(1):R158-65.
- Angeles-Castellanos M, Mendoza J, Díaz-Muñoz M, Escobar C. (2005) Food entrainment modifies the c-FOS expression pattern in brain stem nuclei of rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288(3):R678-84.
- 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(1):344-55.
- Angeles-Castellanos M, Salgado-Delgado R, Rodríguez K, Buijs RM, Escobar C. (2008) Expectancy for food or expectancy for chocolate reveals timing systems for metabolism and reward. *Neuroscience* 155(1):297-307
- Angeles-Castellanos M, Amaya JM, Salgado-Delgado R, Buijs RM, Escobar C. (2011) Scheduled food hastens re-entrainment more than melatonin does after a 6-h phase advance of the light-dark cycle in rats. *J Biol Rhythms* 26(4):324-34.
- Antle MC, Silver R (2005) Orchestrating time: arrangements of the brain circadian clock. *Trends Neurosci* 28(3):145-51.
- Antoun G, Bouchard-Cannon P, Cheng HY. (2012) Regulation of MAPK/ERK signaling and photic entrainment of the suprachiasmatic nucleus circadian clock by Raf kinase inhibitor protein. *J Neurosci* 32(14):4867-77.
- Asai M, Yoshinobu Y, Kaneko S, Mori A, Nikaido T, Moriya T, Akiyama M, Shibata S. (2001) Circadian profile of *Per* gene mRNA expression in the suprachiasmatic nucleus, paraventricular nucleus, and pineal body of aged rats. *J Neurosci Res* 66(6):1133-9.

- Atkinson SE, Maywood ES, Chesham JE, Wozny C, Colwell CS, Hastings MH, Williams SR. (2011) Cyclic AMP signaling control of action potential firing rate and molecular circadian pacemaking in the suprachiasmatic nucleus. *J Biol Rhythms* 26(3):210-20.
- Aton SJ, Huettner JE, Straume M, Herzog ED. (2006) GABA and Gi/o differentially control circadian rhythms and synchrony in clock neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(50):19188-93.
- Beaulé C, Arvanitogiannis A, Amir S. (2001) Light suppresses Fos expression in the shell region of the suprachiasmatic nucleus at dusk and dawn: implications for photic entrainment of circadian rhythms. *Neuroscience* 106(2):249-54.
- Beaulé C, Amir S. (2003) The eyes suppress a circadian rhythm of FOS expression in the suprachiasmatic nucleus in the absence of light. *Neuroscience* 121(2):253-7.
- Best JD, Maywood ES, Smith KL, Hastings MH. (1999) Rapid resetting of the mammalian circadian clock. *J Neurosci* 19(2):828-35.
- Bos NP, Mirmiran M. (1990) Circadian rhythms in spontaneous neuronal discharges of the cultured suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 511(1):158-62.
- Bouchard-Cannon P, Cheng HY. (2012) Scheduled feeding alters the timing of the suprachiasmatic nucleus circadian clock in dexas1-deficient mice. *Chronobiol Int* 29(8):965-81.
- Caldelas I, Poirel VJ, Sicard B, Pévet P, Challet E. (2003) Circadian profile and photic regulation of clock genes in the suprachiasmatic nucleus of a diurnal mammal *Arvicantis ansorgei*. *Neuroscience* 116(2):583-91.
- Caldelas I, Feillet CA, Dardente H, Eclancher F, Malan A, Goumelen S, Pévet P, Challet E. (2005) Timed hypocaloric feeding and melatonin synchronize the suprachiasmatic clockwork in rats, but with opposite timing of behavioral output. *Eur J Neurosci* 22(4):921-9.
- Coogan AN, Piggins HD. (2005) Dark pulse suppression of P-ERK and c-Fos in the hamster suprachiasmatic nuclei. *Eur J Neurosci* 22(1):158-68.
- Card JP, Brecha N, Karten HJ, Moore RY. (1981) Immunocytochemical localization of vasoactive intestinal polypeptide-containing cells and processes in the suprachiasmatic nucleus of the rat: light and electron microscopic analysis. *J Neurosci* 1(11):1289-303.
- Card JP, Fitzpatrick-McElligott S, Gozes I, Baldino F Jr. (1988) Localization of vasopressin-, vasoactive intestinal polypeptide-, peptide histidine isoleucine- and somatostatin-mRNA in rat suprachiasmatic nucleus. *Cell Tissue Res* 252(2):307-15.
- Carter DA, Murphy D. (1992) Nuclear mechanisms mediate rhythmic changes in vasopressin mRNA expression in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res Mol Brain Res* 12(4):315-21.

Chambille I, Doyle S, Servièrre J. (1993) Photic induction and circadian expression of Fos-like protein. Immunohistochemical study in the retina and suprachiasmatic nuclei of hamster. *Brain Res* 612(1-2):138-50.

Challet E. (2007) Minireview: Entrainment of the suprachiasmatic clockwork in diurnal and nocturnal mammals. *Endocrinology* 148(12):5648-55.

Colwell CS, Foster RG. (1992) Photic regulation of Fos-like immunoreactivity in the suprachiasmatic nucleus of the mouse. *J Comp Neurol* 324(2):135-42.

Curran T, Morgan JI. (1995) Fos: an immediate-early transcription factor in neurons. *J Neurobiol* 26(3):403-12.

Daan S, Aschoff J. The entrainment of circadian systems. En: Takahashi JS, Turek FW, Moore RY. (2001) *Handbook of behavioral neurobiology 12: Circadian Clocks*. Kluwer Academic/Plenum Publishers: Nueva York.

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(23):2950-61.

Dardente H, Poirel VJ, Klosen P, Pévet P, Masson-Pévet M. (2002a) Per and neuropeptide expression in the rat suprachiasmatic nuclei: compartmentalization and differential cellular induction by light. *Brain Res* 958(2):261-71.

Dardente H, Klosen P, Caldelas I, Pévet P, Masson-Pévet M. (2002b) Phenotype of *Per1*- and *Per2*-expressing neurons in the suprachiasmatic nucleus of a diurnal rodent (*Arvicanthis ansorgei*): comparison with a nocturnal species, the rat. *Cell Tissue Res* 310(1):85-92.

Davidson AJ, Castanon-Cervantes O, Leise TL, Molyneux PC, Harrington ME. (2009) Visualizing jet lag in the mouse suprachiasmatic nucleus and peripheral circadian timing system. *Eur J Neurosci* 29(1):171-80.

DeCoursey PJ, Buggy J. (1989) Circadian rhythmicity after neural transplant to hamster third ventricle: specificity of suprachiasmatic nuclei. *Brain Res* 500(1-2):263-75.

Diebner C, Schibler U, Albrecht U. (2010) The mammalian circadian timing system: Organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annu Rev Physiol* 72: 517-49.

Drucker-Colín R, Aguilar-Roblero R, García-Hernández F, Fernández-Cancino F, Bermudez Rattoni F. (1984) Fetal suprachiasmatic nucleus transplants: diurnal rhythm recovery of lesioned rats. *Brain Res* 311(2):353-7.

Earnest DJ, DiGiorgio SM, Sladek CD. (1991) Effects of tetrodotoxin on the circadian pacemaker mechanism in suprachiasmatic explants *in vitro*. *Brain Res Bull* 26(5):677-82.

Earnest DJ, DiGiorgio S, Olschowka JA. (1993) Light induces expression of fos-related proteins within gastrin-releasing peptide neurons in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 627(2):205-9.

- Earnest DJ, Sladek CD. (1986) Circadian rhythms of vasopressin release from individual rat suprachiasmatic explants *in vitro*. Brain Res 382(1):129-33.
- Earnest DJ, Sladek CD. (1987) Circadian vasopressin release from perfused rat suprachiasmatic explants *in vitro*: effects of acute stimulation. Brain Res 422(2):398-402.
- Earnest DJ, Sladek CD, Gash DM, Wiegand SJ. (1989) Specificity of circadian function in transplants of the fetal suprachiasmatic nucleus. J Neurosci 9(8):2671-7.
- Eastman CI, Mistlberger RE, Rechtschaffen A. (1984) Suprachiasmatic nuclei lesions eliminate circadian temperature and sleep rhythms in the rat. Physiol Behav 32(3):357-68.
- Escobar C, Martínez-Merlos MT, Angeles-Castellanos M, del Carmen Miñana M, Buijs RM. (2007) Unpredictable feeding schedules unmask a system for daily resetting of behavioural and metabolic food entrainment. Eur J Neurosci 26(10):2804-14.
- Ferreyra GA, Golombek DA. (2001) Rhythmicity of the cGMP-related signal transduction pathway in the mammalian circadian system. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 280(5):R1348-55.
- Field MD, Maywood ES, O'Brien JA, Weaver DR, Reppert SM, Hastings MH. (2000) Analysis of clock proteins in mouse SCN demonstrates phylogenetic divergence of the circadian clockwork and resetting mechanisms. Neuron 25(2):437-47.
- Francois-Bellan AM, Kachidian P, Dusticier G, Tonon MC, Vaudry H, Bosler O. (1990) GABA neurons in the rat suprachiasmatic nucleus: involvement in chemospecific synaptic circuitry and evidence for GAD-peptide colocalization. J Neurocytol 19(6):937-47.
- Gamble KL, Allen GC, Zhou T, McMahon DG. (2007) Gastrin-releasing peptide mediates light-like resetting of the suprachiasmatic nucleus circadian pacemaker through cAMP response element-binding protein and Per1 activation. J Neurosci 27(44):12078-87.
- Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, Davis FC, Wilsbacher LD, King DP, Takahashi JS, Weitz CJ. (1998) Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. Science 280(5369):1564-9.
- Golombek DA, Rosenstein RE. (2010) Physiology of circadian entrainment. Physiol Rev 90(3):1063-102.
- Granados-Fuentes D, Norris AJ, Carrasquillo Y, Nerbonne JM, Herzog ED. (2012) I(A) channels encoded by Kv1.4 and Kv4.2 regulate neuronal firing in the suprachiasmatic nucleus and circadian rhythms in locomotor activity. J Neurosci 32(29):10045-52.
- Guillaumond F, Becquet D, Blanchard MP, Attia J, Moreno M, Bosler O, François-Bellan AM. (2007) Nocturnal expression of phosphorylated-ERK1/2 in gastrin-releasing peptide neurons of the rat suprachiasmatic nucleus. J Neurochem 101(5):1224-35.

- Hara R, Wan K, Wakamatsu H, Aida R, Moriya T, Akiyama M, Shibata S. (2001) Restricted feeding entrains liver clock without participation of the suprachiasmatic nucleus. *Genes Cells* 6(3):269-78.
- Herzog ED, Aton SJ, Numano R, Sakaki Y, Tei H. (2004) Temporal precision in the mammalian circadian system: a reliable clock from less reliable neurons. *J Biol Rhythms* 19(1):35-46.
- Hirayama J, Nakamura H, Ishikawa T, Kobayashi Y, Todo T. (2003) Functional and structural analyses of cryptochrome. Vertebrate CRY regions responsible for interaction with the CLOCK:BMAL1 heterodimer and its nuclear localization. *J Biol Chem* 278(37):35620-8.
- Honma S, Kawamoto T, Takagi Y, Fujimoto K, Sato F, Noshiro M, Kato Y, Honma K. (2002) Dec1 and Dec2 are regulators of the mammalian molecular clock. *Nature* 419(6909):841-4.
- Brown SA, Kowalska E, Dallmann R. (2012) (Re)inventing the circadian feedback loop. *Dev Cell* 22(3):477-87.
- Ibuka N, Kawamura H. (1975) Loss of circadian rhythm in sleep-wakefulness cycle in the rat by suprachiasmatic nucleus lesions. *Brain Res* 96(1):76-81.
- Inouye ST, Kawamura H. (1979) Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic "island" containing the suprachiasmatic nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(11):5962-6.
- Jin X, Shearman LP, Weaver DR, Zylka MJ, de Vries GJ, Reppert SM. (1999) A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell* 96(1):57-68
- Kallingal GJ, Mintz EM. (2006) Glutamatergic activity modulates the phase-shifting effects of gastrin-releasing peptide and light. *Eur J Neurosci* 24:2853–2858.
- Katona C, Rose S, Smale L. (1998) The expression of Fos within the suprachiasmatic nucleus of the diurnal rodent *Arvicanthis niloticus*. *Brain Res* 791(1-2):27-34.
- Kojima S, Shingle DL, Green CB. (2011) Post-transcriptional control of circadian rhythms. *J Cell Sci* 124(Pt 3):311-20.
- Kononen J, Koistinaho J, Alho H. (1990) Circadian rhythm in c-FOS-like immunoreactivity in the rat brain. *Neurosci Lett* 120(1):105-8.
- Kononenko NI, Honma S, Dudek FE, Honma K. (2008a) On the role of calcium and potassium currents in circadian modulation of firing rate in rat suprachiasmatic nucleus neurons: multielectrode dish analysis. *Neurosci Res* 62(1):51-7.
- Kononenko NI, Kuehl-Kovarik MC, Partin KM, Dudek FE. (2008b) Circadian difference in firing rate of isolated rat suprachiasmatic nucleus neurons. *Neurosci Lett* 436(3):314-6.
- Kornhauser JM, Nelson DE, Mayo KE, Takahashi JS. (1990) Photic and circadian regulation of c-FOS gene expression in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Neuron* 5(2):127-34.

- Kwon I, Lee J, Chang SH, Jung NC, Lee BJ, Son GH, Kim K, Lee KH. (2006) BMAL1 shuttling controls transactivation and degradation of the CLOCK/BMAL1 heterodimer. *Mol Cell Biol* 26(19):7318-30.
- Lamont EW, Diaz LR, Barry-Shaw J, Stewart J, Amir S. (2005) Daily restricted feeding rescues a rhythm of period2 expression in the arrhythmic suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience*. 2005;132(2):245-8.
- Leak RK, Moore RY. (2001) Topographic organization of suprachiasmatic nucleus projection neurons. *J Comp Neurol* 433(3):312-34.
- Lee J, Lee Y, Lee MJ, Park E, Kang SH, Chung CH, Lee KH, Kim K. (2008) Dual modification of BMAL1 by SUMO2/3 and ubiquitin promotes circadian activation of the CLOCK/BMAL1 complex. *Mol Cell Biol* 28(19):6056-65.
- Liu S, Chen XM, Yoda T, Nagashima K, Fukuda Y, Kanosue K. (2002) Involvement of the suprachiasmatic nucleus in body temperature modulation by food deprivation in rats. *Brain Res* 929(1):26-36.
- Liu C, Weaver DR, Strogatz SH, Reppert SM (1997) Cellular construction of a circadian clock: period determination in the suprachiasmatic nuclei. *Cell* 91(6):855-60
- Lucassen EA, van Diepen HC, Houben T, Michel S, Colwell CS, Meijer JH. (2012) Role of vasoactive intestinal peptide in seasonal encoding by the suprachiasmatic nucleus clock. *Eur J Neurosci* 35(9):1466-74.
- Marchant EG, Mistlberger RE. (1997) Anticipation and entrainment to feeding time in intact and SCN-ablated C57BL/6j mice. *Brain Res* 765(2):273-82.
- Matsui M, Mitsui Y, Ishida N. (1993) Circadian regulation of per repeat mRNA in the suprachiasmatic nucleus of rat brain. *Neurosci Lett* 163(2):189-92.
- Matsui D, Takekida S, Okamura H. (2005) Molecular oscillation of Per1 and Per2 genes in the rodent brain: an in situ hybridization and molecular biological study. *Kobe J Med Sci* 51(5-6):85-93.
- Maywood ES, Mrosovsky N, Field MD, Hastings MH. (1999) Rapid down-regulation of mammalian period genes during behavioral resetting of the circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(26):15211-6.
- Maywood ES, O'Neill JS, Chesham JE, Hastings MH. (2007) Minireview: The circadian clockwork of the suprachiasmatic nuclei--analysis of a cellular oscillator that drives endocrine rhythms. *Endocrinology* 148(12):5624-34.
- McArthur AJ, Coogan AN, Ajpru S, Sugden D, Biello SM, Piggins HD. (2000) Gastrin-releasing peptide phase-shifts suprachiasmatic nuclei neuronal rhythms in vitro. *J Neurosci* 20:5496-5502.

- Mendoza JY, Dardente H, Escobar C, Pevet P, Challet E. (2004) Dark pulse resetting of the suprachiasmatic clock in Syrian hamsters: behavioral phase-shifts and clock gene expression. *Neuroscience* 127(2):529-37.
- Mendoza J, Angeles-Castellanos M, Escobar C. (2005a) A daily palatable meal without food deprivation entrains the suprachiasmatic nucleus of rats. *Eur J Neurosci* 22(11):2855-62.
- Mendoza J, Graff C, Dardente H, Pevet P, Challet E. (2005b) Feeding cues alter clock gene oscillations and photic responses in the suprachiasmatic nuclei of mice exposed to a light/dark cycle. *J Neurosci* 25(6):1514-22.
- Mendoza J, Pévet P, Challet E. (2007) Circadian and photic regulation of clock and clock-controlled proteins in the suprachiasmatic nuclei of calorie-restricted mice. *Eur J Neurosci* 25(12):3691-701.
- Mendoza J, Pévet P, Challet E. (2008) High-fat feeding alters the clock synchronization to light. *J Physiol* 586(24):5901-10.
- Mendoza J, Pévet P, Challet E. (2009) Entrainment and coupling of the hamster suprachiasmatic clock by daily dark pulses. *J Neurosci Res* 87(3):758-65.
- Mieda M, Williams SC, Richardson JA, Tanaka K, Yanagisawa M. (2006) The dorsomedial hypothalamic nucleus as a putative food-entrainable circadian pacemaker. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(32):12150-5.
- Mistlberger RE. (1993) Circadian properties of anticipatory activity to restricted water access in suprachiasmatic-ablated hamsters. *Am J Physiol* 264(1 Pt 2):R22-9.
- Miyake S, Sumi Y, Yan L, Takekida S, Fukuyama T, Ishida Y, Yamaguchi S, Yagita K, Okamura H. (2000) Phase-dependent responses of *Per1* and *Per2* genes to a light-stimulus in the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Neurosci Lett* 294(1):41-4.
- Miyamoto Y, Sancar A. (1998). Vitamin B2-based blue-light photoreceptors in the retinohypothalamic tract as the photoactive pigments for setting the circadian clock in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95(11):6097-102.
- Miyamoto Y, Sancar A. (1999) Circadian regulation of cryptochrome genes in the mouse. *Brain Res Mol Brain Res* 71(2):238-43.
- Moga MM, Moore RY. (1996) Putative excitatory amino acid projections to the suprachiasmatic nucleus in the rat. *Brain Res*. 743(1-2):171-7.
- Moga MM, Moore RY. (1997) Organization of neural inputs to the suprachiasmatic nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 389(3):508-34.
- Moore RY, Eichler VB. (1972) Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res* 42:201-06.

Moore RY, Speh JC, Leak RK. (2002) Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell Tissue Res* 309(1):89-98.

Morin LP, Blanchard JH. (2001) Neuromodulator content of hamster intergeniculate leaflet neurons and their projection to the suprachiasmatic nucleus or visual midbrain. *J Comp Neurol* 437(1):79-90.

Murakami N, Takamura M, Takahashi K, Utunomiya K, Kuroda H, Etoh T. (1991) Long-term cultured neurons from rat suprachiasmatic nucleus retain the capacity for circadian oscillation of vasopressin release. *Brain Res* 545(1-2):347-50.

Murphy BA, Elliott JA, Sessions DR, Vick MM, Kennedy EL, Fitzgerald BP. (2007) Rapid phase adjustment of melatonin and core body temperature rhythms following a 6-h advance of the light/dark cycle in the horse. *J Circadian Rhythms* 5:5

Nagano M, Adachi A, Nakahama K, Nakamura T, Tamada M, Meyer-Bernstein E, Sehgal A, Shigeyoshi Y. (2003) An abrupt shift in the day/night cycle causes desynchrony in the mammalian circadian center. *J Neurosci* 23(14):6141-51.

Nakamura W, Yamazaki S, Takasu NN, Mishima K, Block GD. (2005) Differential response of Period 1 expression within the suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci* 25(23):5481-7.

Newman GC, Hospod FE, Patlak CS, Moore RY. (1992) Analysis of *in vitro* glucose utilization in a circadian pacemaker model. *J Neurosci* 12(6):2015-21.

Okamoto S, Okamura H, Miyake M, Takahashi Y, Takagi S, Akagi Y, Fukui K, Okamoto H, Ibata Y. (1991) A diurnal variation of vasoactive intestinal peptide (VIP) mRNA under a daily light-dark cycle in the rat suprachiasmatic nucleus. *Histochemistry* 95(5):525-8.

Okamura H, Bérrod A, Julien JF, Geffard M, Kitahama K, Mallet J, Bobillier P. (1989) Demonstration of GABAergic cell bodies in the suprachiasmatic nucleus: in situ hybridization of glutamic acid decarboxylase (GAD) mRNA and immunocytochemistry of GAD and GABA. *Neurosci Lett* 102(2-3):131-6.

Okamura H, Ibata Y. (1994) GRP immunoreactivity shows a day-night difference in the suprachiasmatic nuclear soma and efferent fibers: comparison to VIP immunoreactivity. *Neurosci Lett* 181(1-2):165-8.

Paxinos G, Watson C. (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Fourth Edition. Academic Press, San Diego.

Plano SA, Agostino PV, de la Iglesia HO, Golombek DA. (2012) cGMP-phosphodiesterase inhibition enhances photic responses and synchronization of the biological circadian clock in rodents. *PLoS One* 7(5):e37121.

Prosser RA, Gillette MU. (1989) The mammalian circadian clock in the suprachiasmatic nuclei is reset *in vitro* by cAMP. *J Neurosci* 9(3):1073-81.

- Prosser RA, Gillette MU. (1991) Cyclic changes in cAMP concentration and phosphodiesterase activity in a mammalian circadian clock studied *in vitro*. *Brain Res* 568(1-2):185-92.
- Prosser RA, Macdonald ES, Heller HC. (1994) c-FOS mRNA in the suprachiasmatic nuclei *in vitro* shows a circadian rhythm and responds to a serotonergic agonist. *Brain Res Mol Brain Res* 25(1-2):151-6.
- Rea MA. (1989) Light increases Fos-related protein immunoreactivity in the rat suprachiasmatic nuclei. *Brain Res Bull* 23(6):577-81.
- Rea MA. (1992) Different populations of cells in the suprachiasmatic nuclei express c-FOS in association with light-induced phase delays and advances of the free-running activity rhythm in hamsters. *Brain Res* 579(1):107-12.
- Reddy AB, Field MD, Maywood ES, Hastings MH. (2002) Differential resynchronisation of circadian clock gene expression within the suprachiasmatic nuclei of mice subjected to experimental jet lag. *J Neurosci* 22(17):7326-30.
- Reed HE, Meyer-Spasche A, Cutler DJ, Coen CW, Piggins HD. (2001) Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) phase-shifts the rat suprachiasmatic nucleus clock *in vitro*. *Eur J Neurosci* 13(4):839-43.
- Reppert SM, Weaver DR. (2001) Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol* 63:647-76.
- Rohling JH, vanderLeest HT, Michel S, Vansteensel MJ, Meijer JH. (2011) Phase resetting of the mammalian circadian clock relies on a rapid shift of a small population of pacemaker neurons. *PLoS One* 6(9):e25437.
- Romijn HJ, Sluiter AA, Pool CW, Wortel J, Buijs RM. (1996) Differences in colocalization between Fos and PHI, GRP, VIP and VP in neurons of the rat suprachiasmatic nucleus after a light stimulus during the phase delay versus the phase advance period of the night. *J Comp Neurol* 372(1):1-8.
- Saitoh Y, Nihonmatsu I, Kawamura H. (1990) Location of the suprachiasmatic nucleus grafts in rats which restored circadian rhythmicity after transplantation. *Neurosci Lett* 118(1):45-8.
- Satoh Y, Kawai H, Kudo N, Kawashima Y, Mitsumoto A. (2006) Temperature rhythm reentrains faster than locomotor rhythm after a light phase shift. *Physiol Behav* 88(4-5):404-10.
- Sawaki Y, Nihonmatsu I, Kawamura H. (1984) Transplantation of the neonatal suprachiasmatic nuclei into rats with complete bilateral suprachiasmatic lesions. *Neurosci Res* 1(1):67-72.
- Schumann DM, Cooper HM, Hofmeyr MD, Bennett NC. (2006) Light-induced Fos expression in the suprachiasmatic nucleus of the four-striped field mouse, *Rhabdomys pumilio*: A southern African diurnal rodent. *Brain Res Bull* 70(4-6):270-7.

- Schwartz WJ, Aronin N, Sassone-Corsi P. (2005) Photoinducible and rhythmic ICER-CREM immunoreactivity in the rat suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Lett* 385(1):87-91.
- Schwartz WJ, Davidsen LC, Smith CB. (1980) *In vivo* metabolic activity of a putative circadian oscillator, the rat suprachiasmatic nucleus. *J Comp Neurol* 189(1):157-67.
- Schwartz WJ. (1987) *In vivo* metabolic activity of hamster suprachiasmatic nuclei: use of anesthesia. *Am J Physiol* 252(2 Pt 2):R419-22.
- Schwartz WJ, Carpino A Jr, de la Iglesia HO, Baler R, Klein DC, Nakabeppu Y, Aronin N. (2000) Differential regulation of fos family genes in the ventrolateral and dorsomedial subdivisions of the rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* 98(3):535-47.
- Schwartz MD, Nunez AA, Smale L. (2004) Differences in the suprachiasmatic nucleus and lower subparaventricular zone of diurnal and nocturnal rodents. *Neuroscience* 127(1):13-23.
- Schwartz WJ, Reppert SM, Eagan SM, Moore-Ede MC. (1983) *In vivo* metabolic activity of the suprachiasmatic nuclei: a comparative study. *Brain Res* 274(1):184-7.
- Schwartz WJ, Takeuchi J, Shannon W, Davis EM, Aronin N. (1994) Temporal regulation of light-induced Fos and Fos-like protein expression in the ventrolateral subdivision of the rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* 58(3):573-83.
- Schwartz WJ, Zimmerman P. (1991) Lesions of the suprachiasmatic nucleus disrupt circadian locomotor rhythms in the mouse. *Physiol Behav* 49(6):1283-7.
- 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(1):154-8.
- Shibata S, Hamada T, Tominaga K, Watanabe S. (1992) An *in vitro* circadian rhythm of protein synthesis in the rat suprachiasmatic nucleus under tissue culture conditions. *Brain Res* 584(1-2):251-6.
- Stephan FK, Zucker I. (1972) Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69(6):1583-6.
- Stephan FK. (1984) Phase shifts of circadian rhythms in activity entrained to food access. *Physiol Behav* 32(4):663-71.
- Stephan FK. (2001) Food-entrainable oscillators in mammals. En: Takahashi JS, Turek FW, Moore RY (editores): *Handbook of Behavioral Neurobiology*, 12: Circadian Clocks. Kluwer Academic, Plenum Publishers, Nueva York.
- Stokkan KA, Yamazaki S, Tei H, Sakaki Y, Menaker M. (2001) Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science*. 2001 Jan 19;291(5503):490-3.

Sumová A, Trávníčková Z, Mikkelsen JD, Illnerová H. (1998) Spontaneous rhythm in c-FOS immunoreactivity in the dorsomedial part of the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 801(1-2):254-8.

Takeuchi J, Nagasaki H, Shinohara K, Inouye ST. (1992) A circadian rhythm of somatostatin messenger RNA levels, but not of vasoactive intestinal polypeptide/peptide histidine isoleucine messenger RNA levels in rat suprachiasmatic nucleus. *Mol Cell Neurosci* 3(1):29-35.

Takumi T, Matsubara C, Shigeyoshi Y, Taguchi K, Yagita K, Maebayashi Y, Sakakida Y, Okumura K, Takashima N, Okamura H. (1998) A new mammalian period gene predominantly expressed in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Cells*. 3(3):167-76.

Tecler-Mesbah R, Vuillez P, Van Rossum A, Pévet P. (1995) Time course of neuronal sensitivity to light in the circadian timing system of the golden hamster. *Neurosci Lett* 201(1):5-8.

Tischkau SA, Mitchell JW, Tyan SH, Buchanan GF, Gillette MU. (2003) Ca²⁺/cAMP response element-binding protein (CREB)-dependent activation of *Per1* is required for light-induced signaling in the suprachiasmatic nucleus circadian clock. *J Biol Chem* 278(2):718-23.

van der Veen DR, van der Pol-Meijer MM, Jansen K, Smeets M, van der Zee EA, Gerkema MP. (2008) Circadian rhythms of C-FOS expression in the suprachiasmatic nuclei of the common vole (*Microtus arvalis*). *Chronobiol Int* 25(4):481-99.

van Oosterhout F, Michel S, Deboer T, Houben T, van de Ven RC, Albus H, Westerhout J, Vansteensel MJ, Ferrari MD, van den Maagdenberg AM, Meijer JH (2008) Enhanced circadian phase resetting in R192Q Cav2.1 calcium channel migraine mice. *Ann Neurol* 64(3):315-24.

vanderLeest HT, Vansteensel MJ, Duindam H, Michel S, Meijer JH. (2009) Phase of the electrical activity rhythm in the SCN *in vitro* not influenced by preparation time. *Chronobiol Int* 26(6):1075-89.

Vansteensel MJ, Yamazaki S, Albus H, Deboer T, Block GD, Meijer JH. (2003) Dissociation between circadian *Per1* and neuronal and behavioral rhythms following a shifted environmental cycle. *Curr Biol* 13(17):1538-42.

Vindlacheruvu RR, Ebling FJ, Maywood ES, Hastings MH. (1992) Blockade of Glutamatergic Neurotransmission in the Suprachiasmatic Nucleus Prevents Cellular and Behavioural Responses of the Circadian System to Light. *Eur J Neurosci* 4(7):673-679.

Vitaterna MH, Selby CP, Todo T, Niwa H, Thompson C, Fruechte EM, Hitomi K, Thresher RJ, Ishikawa T, Miyazaki J, Takahashi JS, Sancar A. (1999) Differential regulation of mammalian period genes and circadian rhythmicity by cryptochromes 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(21):12114-9.

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(6):1190-6.

Waterhouse J. (1999) Jet-lag and shift work: (1). Circadian rhythms. *J R Soc Med* 92(8):398-401

Waterhouse J, Reilly T, Atkinson G, Edwards B. (2007) Jet lag: trends and coping strategies. *Lancet* 369(9567):1117-29.

Welsh DK, Logothetis DE, Meister M, Reppert SM. (1995) Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* 14(4):697-706.

Yamazaki S, Maruyama M, Cagampang FR, Inouye ST. (1994) Circadian fluctuations of cAMP content in the suprachiasmatic nucleus and the anterior hypothalamus of the rat. *Brain Res* 651(1-2):329-31.

Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, Ueda M, Block GD, Sakaki Y, Menaker M, Tei H. (2000) Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* 288(5466):682-5.

Yan L, Takekida S, Shigeyoshi Y, Okamura H. (1999) *Per1* and *Per2* gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus: circadian profile and the compartment-specific response to light. *Neuroscience* 94(1):141-50.

Yan L, Okamura H. (2002) Gradients in the circadian expression of *Per1* and *Per2* genes in the rat suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci* 15(7):1153-62.

Yan L, Silver R. (2004) Resetting the brain clock: time course and localization of *mPER1* and *mPER2* protein expression in suprachiasmatic nuclei during phase shifts. *Eur J Neurosci* 19(4):1105-9.

Yang J, Cagampang FR, Nakayama Y, Inouye SI. (1993) Vasoactive intestinal polypeptide precursor mRNA exhibits diurnal variation in the rat suprachiasmatic nuclei. *Brain Res Mol Brain Res* 20(3):259-62.

Zanquetta MM, Corrêa-Giannella ML, Monteiro MB, Villares SM. (2010) Body weight, metabolism and clock genes. *Diabetol Metab Syndr* 2:53.

Zylka MJ, Shearman LP, Weaver DR, Reppert SM. (1998) Three period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron* 20(6):1103-10.