



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA  
CARRERA DE BIOLOGÍA**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**Efecto de la luz en la expresión de la actividad locomotora en  
ratas con lesión del Núcleo Supraquiasmático**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**B I Ó L O G O**

**P R E S E N T A:**

**PEDRO ROJAS LORENZO**

**DIRECTOR DE TESIS  
Dr. Rudolf Marinus Buijs**

**ASESORA INTERNA  
M. en IBSH. Angélica Flores Ramírez**

Investigación realizada gracias al programa UNAM-DGAPA IG 200417,  
Conacyt 220598.



**F E S  
ZARAGOZA**



CDMX. agosto de 2017.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES**

**“ZARAGOZA”**

**DIRECCIÓN**

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
P R E S E N T E.**

Comunico a usted que el alumno **ROJAS LORENZO PEDRO**, con número de cuenta **303037594**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **29 de agosto de 2017** a las **11:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

- PRESIDENTE** Dra. MARÍA ESTHER CRUZ BELTRÁN
- VOCAL** Dr. RUDOLF MARINUS BUIJS\*
- SECRETARIO** M. en IBSH. ANGÉLICA FLORES RAMÍREZ
- SUPLENTE** Dra. LETICIA MORALES LEDESMA
- SUPLENTE** M. en C. CARLOS CAMILO SILVA MÉNDEZ

El título de la tesis que presenta es: **Efecto de la luz en la expresión de la actividad locomotora en ratas con lesión del Núcleo Supraquiasmático.**

Opción de titulación: Tesis

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

**ATENTAMENTE**  
**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
 Ciudad de México, a 09 de junio de 2017

**DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ**  
 DIRECTOR

ACUERDO DE ESTUDIOS SUPERIORES  
  
 ZARAGOZA  
**DIRECCION**

RECIBÍ  
OFICINA DE EXÁMENES  
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.  
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL  
JEFE DE CARRERA

## Dedicatoria

---

*En memoria de mis abuelos Amalia Cruz Velázquez y Arturo Lorenzo Mancera, quienes me enseñaron el valor de la bondad y el amor. Siempre los llevo conmigo a donde quiera voy... dos aves en el cielo volando en libertad.*

*A mi madre, un pilar enorme en mi vida, mi todo. Gracias a ti por forjarme la perseverancia y el amor en la vida. Gracias por tu comprensión y tu apoyo inconmensurable, eres mi ejemplo a seguir, te admiro tanto y siempre estás conmigo porque gracias a ti soy lo que soy y seré.*

*A mi hermana Alicia, quien amo con todas mis fuerzas. Gracias por estar conmigo y apoyarme siempre. En todo momento siento tu amor de hermana y agradezco a la vida que seas tú.*

### *Agradecimientos*

*A la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO por brindarme el espacio y las herramientas necesarias para mi formación.*

*A la FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA por haberme formado como profesionista y persona.*

*A mi director de tesis Rudolf Marinus Buijs, por haberme permitido ser parte de su equipo de investigación y creer en mí. Por su enorme paciencia.*

*A mi asesora interna M. en IBSH Angélica Flores Ramírez, por sus valiosas aportaciones en el presente trabajo y ser un aliento para continuar.*

*A mis amigos Lalo, Rafa, Tona y Aline y todos los momentos que vivimos juntos.*

*A toda la gente que ha creído en mí y me brindó su apoyo y amistad incondicional sin reparo alguno. Gracias de corazón.*

# Abreviaturas

3V- Tercer ventrículo

ARC- Núcleo arqueado

ArcD- Núcleo arqueado dorsomedial

AVP- Arginina vasopresina

BNST- Núcleo cama de la estría terminal

Ctb- trazador fluoróforo conjugado

CUD- Ciclo ultradiano

DMH- Núcleo dorsomedial del hipotálamo

GRP- Péptido liberador de gastrina

IGL- Hojuela intergeniculada

L.NSQ- Lesión de núcleo supraquiasmático

L/O- Luz/oscuridad

L.parical- Lesión parcial

L.posterior- Lesión posterior

LS- Séptum lateral

MPO-Preóptico medial

NSQ- Núcleo supraquiasmático

O.c- Quiasma óptico

OC- Oscuridad constante

Opt-tracto óptico

PHI- Péptido Histidina Isoleucina

PVN- Núcleo paraventricular

PVT- Núcleo paraventricular del hipotálamo

RCh-Área retroquiasmatica

Sch-Núcleo supraquiasmático

sPVz-zona subparaventricular

TRH- Tracto retino-hipotalámico

VIP-Péptido vaso intestinal

VPAC2-Receptor a péptido vasointestinal (Codificado por el gen *Vipr2*)

VMHA- Área hipotalámica ventromedial

# Glosario

**Actograma:** Representación gráfica de los valores de una variable biológica. En el eje “x” está representado las horas del día y en el eje de las “y” se representa un ciclo.

**Acrofase:** Es la fase de punto máximo de expresión del valor de un ritmo biológico, ajustado a una senoide.

**Amplitud:** Diferencia entre el valor medio y el valor máximo alcanzado de la variable durante el periodo.

**Arritmico:** Variable de estudio que no presenta ningún tipo de periodicidad en su frecuencia de expresión u oscilación.

**Circadiano:** Ciclo cuyo periodo es cercano a las 24 horas.

**Cosinor:** Método desarrollado por Franz Halberg en 1960. Apropriado para datos no equidistantes y datos independientes en serie. Ajusta los datos obtenidos a una función sinusoidal. Permite el análisis de un ritmo biológico al ser capaz de obtener parámetros biológicos como son la amplitud, el mesor y la acrofase.

**Fase:** Relación entre dos o más ritmos, describiendo un ritmo en específico.

**Free running:** Ritmo biológico endógeno expresado en curso, posterior a quedar ausente de sincronizadores externos

**Frecuencia:** Cantidad de veces que se repite un fenómeno por unidad de tiempo. Es la inversa del periodo.

**Infradianos:** Ritmos biológicos que tienen periodos superiores a las 24 horas.

**Masking:** Expresión de una variable biológica de forma abrupta a consecuencia de un estímulo ambiental externo.

**Mesor:** Valor medio de la variable estudiada a lo largo del periodo.

**Periodo:** Intervalo de tiempo, entre dos acontecimientos idénticos. Duración completa de un ciclo.

**Periodograma:** También conocido como periodograma en  $\chi^2$ , es una modificación del análisis de Enright por Solokolve y Bushell que aporta un nivel de significancia o más, con el fin de determinar la existencia de un ritmo. Evaluados mediante el mesor y tres niveles de significancia.

**Sincronización:** También denominado encarrilamiento, define el acoplamiento de un ritmo biológico con respecto a otro ritmo dando como resultado una relación directa entre sus fases y periodos.

**Ultradiano:** Ciclo que tienen periodos menores a las 24 horas

Zeitgeber: Término alemán que significa “dador de tiempo” propuesto por Jürgen Aschoff para definir aquella señal externa que es capaz de indicar tiempo.



# Índice

---

	<b>Página</b>
<b>1. RESUMEN</b>	<b>11</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	<b>12</b>
<b>3. MARCO TEÓRICO</b>	<b>12</b>
<b>3.1 Ritmos Biológicos</b>	<b>12</b>
3.1.2 Estudio de los ritmos biológicos en la historia	<b>12</b>
3.1.3 Clasificación y estudio de los ritmos biológicos	<b>14</b>
<b>3.2 El núcleo supraquiasmático</b>	<b>17</b>
3.2.1 Poblaciones neuronales	<b>17</b>
<b>3.3 NSQ “el oscilador maestro”</b>	<b>18</b>
3.3.1 Recepción de señales fóticas	<b>18</b>
3.3.2 Oscilaciones circadianas en ausencia de señales fóticas	<b>19</b>
<b>3.4 Señales de luz y proyecciones del NSQ en el cerebro</b>	<b>19</b>
<b>3.5 Efecto de masking y sus características</b>	<b>20</b>
<b>4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>22</b>
<b>5. HIPÓTESIS</b>	<b>23</b>
<b>6. OBJETIVO</b>	<b>23</b>
<b>7. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>23</b>
7.1 Animales y condiciones generales de alojamiento	<b>24</b>
7.2 Procedimiento quirúrgico para lesiones de NSQ	<b>24</b>
7.3 Sistema de monitoreo y tiempo de recuperación	<b>25</b>
7.4 Fotoperiodos	<b>25</b>

7.5 Inyección de trazador	26
7.6 Obtención de cerebros	26
7.7 Histología e inmunohistoquímica	27
7.8 Análisis de la actividad locomotora y estadística	27
<b>8. RESULTADOS</b>	<b>29</b>
<b>8.1 Análisis de la Actividad Locomotora e Inmunohistoquímica</b>	<b>29</b>
<b>8.1.1 Animales Intactos</b>	<b>30</b>
8.1.2 Los animales intactos presentaron una organización de la actividad locomotora en el ciclo <i>L/O</i>	31
8.1.3 Los animales intactos presentan <i>corrimiento libre</i> en condiciones de Oscuridad Constante	33
8.1.4 Los animales intactos presentaron <i>masking</i> en el CUD	35
<b>8.2 Animales con Lesión de NSQ</b>	<b>38</b>
8.2.1 Cortes histológicos e inmunohistoquímica de Lesión de NSQ	38
8.2.2 Inmunohistoquímica para CTB	38
8.2.3 Inmunohistoquímica para VIP	40
8.2.4 Análisis de la actividad locomotora	42
8.2.5 Los animales con Lesión de NSQ presentan desorganización de la actividad locomotora en <i>L/O</i>	42
8.2.6 Los animales con Lesión de NSQ presentan desorganización de la actividad locomotora en Oscuridad constante	44
8.2.7 Los animales con Lesión de NSQ no presentan <i>masking</i> en <i>CUD</i>	46
<b>8.3 Animales con Lesión posterior al NSQ</b>	<b>49</b>
8.3.1 Cortes histológicos e inmunohistoquímica de Lesión posterior al NSQ	49

8.3.2	Análisis de la actividad locomotora	51
8.3.3	Los animales con Lesión posterior presentan una organización de la actividad locomotora en <i>L/O</i>	51
8.3.4	Los animales con Lesión posterior presentan una desorganización de la actividad locomotora en Oscuridad constante	53
8.3.5	Los animales con Lesión posterior presentan <i>masking</i> bajo el <i>CUD</i>	56
<b>8.4</b>	<b>Animales con Lesión parcial del NSQ</b>	<b>59</b>
8.4.1	Inmunohistoquímica para CTB	59
8.4.2	Inmunohistoquímica para VIP	60
8.4.3	Análisis de la actividad locomotora	61
8.4.4	Los animales con Lesión parcial presentan organización de la actividad locomotora en condiciones <i>L/O</i>	61
8.4.5	Los animales con Lesión parcial presentan desorganización de la actividad locomotora en <i>OC</i>	63
8.4.6	Los animales con Lesión parcial presentan <i>masking</i> bajo el <i>CUD</i>	65
<b>8.5</b>	<b>Análisis estadístico</b>	<b>68</b>
8.5.1	Análisis cosinor para <i>L/O</i> y <i>OC</i>	68
8.5.2	Análisis Lomb-Scargle para <i>CUD</i>	73
8.5.3	Análisis estadístico para <i>CUD</i>	76
<b>9.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>98</b>
<b>10.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>104</b>
<b>11.</b>	<b>Bibliografía</b>	<b>105</b>

## 1. RESUMEN

---

El núcleo Supraquiasmático (NSQ) es un reloj endógeno que interacciona con la luz medioambiental, ajustando su ciclo interno en un proceso llamado sincronización, ejerciendo así un ajuste en el periodo y fase en la expresión de la actividad locomotora de los mamíferos. Este es un proceso que tarda algunos días en ajustarse, sin embargo, la respuesta que se expresa de forma inmediata se le conoce como efecto de enmascaramiento.

Para evaluar el efecto de la luz en la expresión de la actividad locomotora se llevó a cabo un experimento de inducción de tres distintos fotoperiodos a 2 grupos experimentales (intactos y lesión total NSQ), inyectando el trazador antero-retrogrado toxina del cólera subunidad B (CTB) por el humor vítreo al grupo lesión total NSQ para corroborar que el grupo con lesión del NSQ tuviera ausencia total de proyecciones de luz desde la retina.

Debido a diferencias en las coordenadas y su aproximación al área a lesionar, se obtuvieron 2 grupos adicionales: Lesión parcial y Lesión posterior; los cuales fueron identificados una vez realizado el análisis histológico y recibieron el mismo protocolo experimental.

Los resultados muestran que la lesión total de NSQ elimina cualquier respuesta en la actividad locomotora ante cualquier estímulo luminoso. El grupo con Lesión parcial presentó un NSQ lesionado parcialmente y una lesión en la área retroquiasmática (RCh). El grupo con Lesión posterior presentó un NSQ totalmente intacto y una lesión en el RCh cercano al núcleo arqueado ARC rostral.

Los datos de ambos grupos indican que la RCh está implicado en la regulación de los ritmos endógenos de actividad locomotora debido a la pérdida de ritmicidad endógena verificada en condiciones de oscuridad constante (OC). Probablemente la RCh es un área de paso en las proyecciones del NSQ hacia los núcleos implicados en la regulación endógena de los ritmos de actividad locomotora.

## 2. INTRODUCCIÓN

---

En la naturaleza, no todas las interacciones y funciones propias de los organismos se muestran de forma constante; de hecho muchas de ellas se presentan de manera cíclica. En nuestro planeta, la energía luminosa del Sol es la principal fuente de energía de toda la vida existente, ya sea de manera directa o indirecta. Esta energía incide en el planeta de forma cíclica debido al movimiento que efectúa la Tierra al girar sobre su propio eje. Durante el desarrollo y evolución de la vida en el planeta, las especies desarrollaron una forma de anticipar esos cambios luminosos en el medioambiente, organizando así, su fisiología y comportamiento. Esta unidad funcional de predicción es conocida como reloj circadiano ([Dibner et al., 2010](#)), un sistema inherente y predictivo a cualquier nivel de organización ([Brady, 1982](#)).

## 3. MARCO TEÓRICO

---

### 3.1 Ritmos biológicos

Un ritmo biológico, es la recurrencia o manifestación de un fenómeno biológico en un intervalo regular en el tiempo, que se presenta en cualquier nivel de organización ([Aschoff y Daan, 1981](#)). La gemación, floración, fructificación, pérdida de hojas, tiempos de hibernación, desplazamiento de poblaciones migratorias o tiempos de búsqueda de pareja para la reproducción, son ejemplos de ritmos biológicos que se dan a diferentes intervalos de tiempo.

#### 3.1.2 Estudio de los ritmos biológicos en la historia

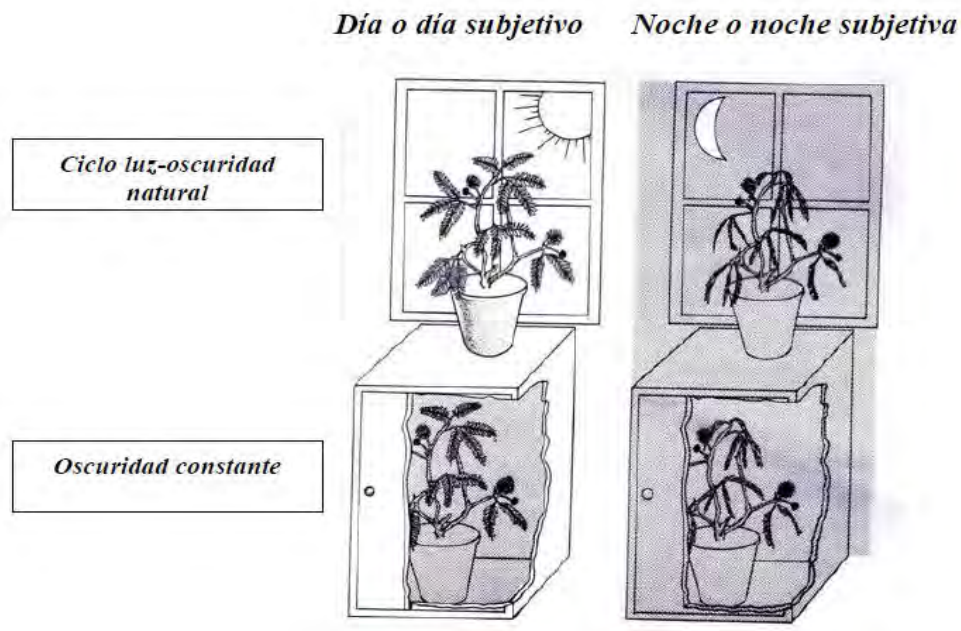
Desde la antigua Grecia, médicos y filósofos ya reportaban observaciones y recomendaciones de salud, dependiendo de las estaciones del año, o del día o la noche. Hesíodo en el año 700 A.C. ya mencionaba que “las enfermedades caen sobre los hombres, algunas de día y otras por la noche”. En el mundo oriental, el concepto de la periodicidad en el tiempo es de suma importancia, tanto para su filosofía como para el diagnóstico de enfermedades ([Golombek y Rosenstein, 2010](#)), como se ha escrito en el tratado médico Nei Ching del siglo IV A.C.

En 1731, el científico, naturalista y botánico, Carl von Linné, creador del sistema de taxonomía, con ayuda de su conocimiento de la ritmicidad biológica en plantas, creó un mapa de flores donde aplicó la temporalidad que presentan algunas plantas con flor para abrir y cerrar sus pétalos, lo que permitió consultar la hora del día (Figura 1).



**Figura 1. Contador del día solar por un reloj biológico en plantas.** Alrededor de las 6 am y 7am, las flores de crepis rojas y las lilas acuáticas blancas abren sus flores cerrando alrededor de las 5 p.m. o 6 p.m. *Anthericum liliago* o Lily de San Bernard e *Hypericum perforatum* o hierba de San Juan abren entre las 7 y 8 p.m. y cierran entre 3 y 4 p.m. La escarlata pimpinela o *Anagallis arvensis* abre entre las 8 y 9 p.m. y cierra entre la 1 y las 2 p.m. Por último, las caléndulas o margaritas abren entre el medio día y la 1 p.m. (Modificada de Fraser, 1987).

Jean Jacques D'ortous de Mairan, en 1729 realizó el primer experimento de ritmicidad circadiana. Él observó que la planta sensitiva *Mimosa púdica*, la cual mantiene sus hojas extendidas durante el día y retraídas durante la noche, es capaz de preservar este comportamiento en ausencia de luz, ya que al ser colocada dentro de un armario de manera que no recibía la luz del sol (Figura 2) las hojas continuaban abriendo y cerrando en el mismo ciclo que ocurría en el exterior, demostrándose así que los ritmos circadianos son capaces de mantenerse aún en ausencia de señales temporales del ambiente.



**Figura 2. Experimento de De Mairan** que muestra por primera vez la existencia de ritmos circadianos endógenos. Al tener una planta de *Mimosa pudica* expuesta a un ciclo de luz y oscuridad, las hojas se mueven como siguiendo al Sol; sin embargo, al eliminar la influencia de la luz solar colocando la planta en oscuridad constante (paneles inferiores), las hojas continúan moviéndose (Modificada de Moore Ede *et al.*, 1982).

### 3.1.3 Clasificación y estudio de los ritmos biológicos

Los ritmos biológicos se clasifican de acuerdo a la frecuencia de su oscilación (Enright, 1981):

**Ritmos ultradianos:** ciclos que tienen periodos menores a las 24 horas; tales como el ritmo cardiaco, respiratorio, fases de sueño lento y sueño paradójico o ritmos neuroendocrinos como la liberación de leptina.

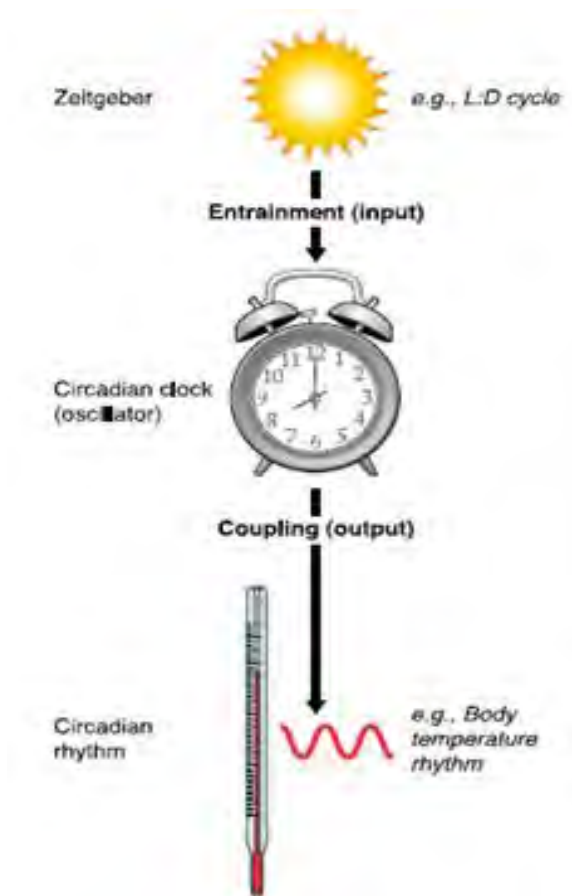
**Ritmos circadianos:** ciclos cuyo periodo es cercano a las 24 horas, como los ciclos de sueño vigilia, secreciones hormonales como la que presenta el cortisol, la melatonina o la prolactina.

**Ritmos infradianos:** son aquellos ritmos biológicos que tienen periodos más largos que los ritmos circadianos, aproximadamente mayores a 28 horas, como el ciclo estral, el ciclo menstrual o la hibernación.

De estos tres grupos, los ritmos circadianos son los más estudiados, los cuales concuerdan con las variaciones cíclicas del día y de la noche de aproximadamente 24 horas (Aschoff y Daan,

1981). A continuación se presentan las características que definen un sistema circadiano, el cual se compone de una entrada, un ajuste (marcapasos u oscilador endógeno) y una salida (figura 3).

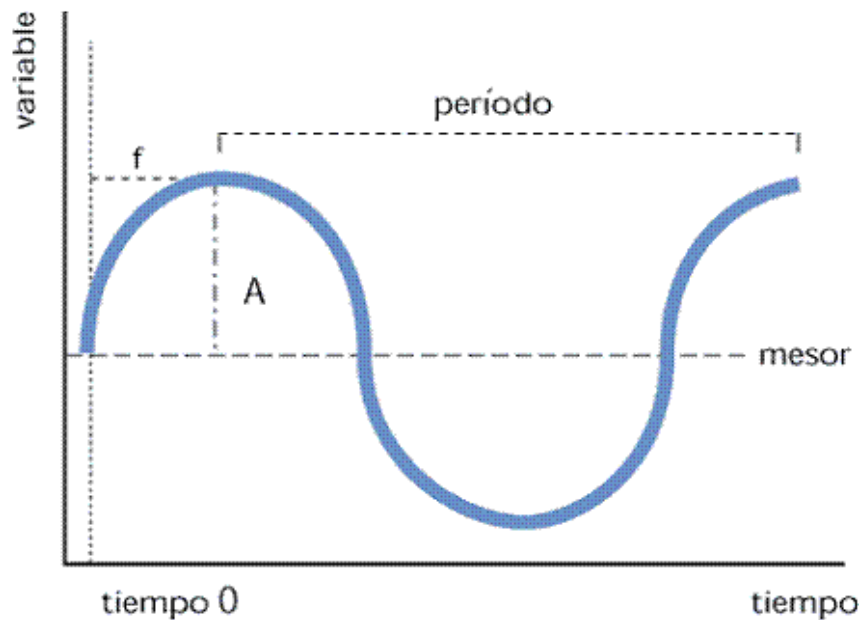
- Un zeitgeber (dador de tiempo), como la luz medioambiental, dirigida hacia un marcapasos circadiano.
- Un marcapasos u oscilador endógeno. Su expresión continúa sin la necesidad de un estímulo, en otras palabras, es auto sostenible.
- Vías de salida, por las cuales el marcapasos regula ritmos fisiológicos, conductuales o bioquímicos (Kalsbeek *et al.*, 2006).



**Figura 3. Sistema circadiano.** El sol representa la señal fónica la cuál es la señal de entrada al reloj circadiano, ambas se sincronizan y se “acoplan” en tiempo. Este proceso es llamado sincronización. Una vez que estas señales están sincronizadas se origina la salida de una señal que regula por ejemplo, el ritmo de temperatura (Modificada de Golombek y Rosenstein, 2010).



En el análisis del ritmo biológico se consideran los siguientes parámetros:



**Figura 4. Ritmo biológico.** Se ilustra la forma sinusoidal que toma un ritmo biológico, así como sus parámetros: mesor, amplitud (A), periodo y acrofase (f). (Imagen tomada de [Dunlap J, et al, 2004](#)).

- **Periodo.** Se define como el intervalo de tiempo, entre dos acontecimientos idénticos, es decir, que es la duración de un ciclo completo. En ocasiones, suele utilizarse *frecuencia* en lugar de periodo, definido como el número de ciclos por unidad de tiempo.
- **Nivel medio o mesor.** Es el valor medio de la variable estudiada, calculado a lo largo de un periodo completo.
- **Amplitud.** Es la diferencia entre el mesor y el valor máximo alcanzado por la variable durante el periodo.
- **Fase.** Describe la relación entre dos o más ritmos y describe en específico, en qué momento del curso temporal se sitúa el ritmo biológico en estudio.
- **Acrofase.** Momento del ciclo en el que el fenómeno presenta su valor máximo.

Aunque generalmente se hace referencia a otra función periódica que pueda ser externa o interna, como la comparación entre el ritmo de secreción de cortisol que es inverso al de

melatonina, indicando la relación de fase entre estos dos ritmos biológicos (Cardinali y Stern, 1994).

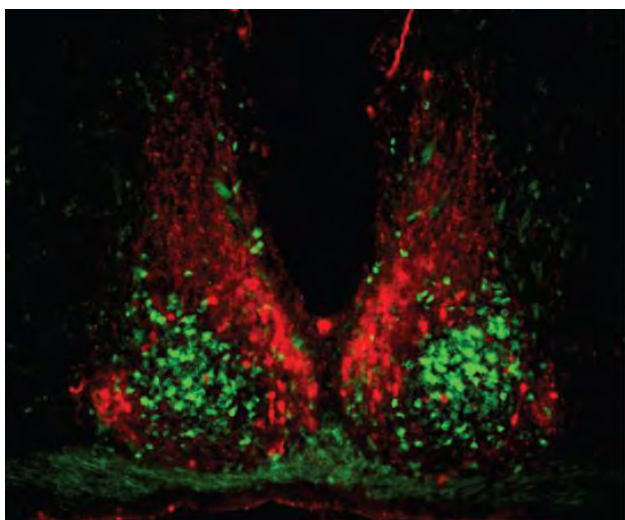
En el cerebro existe una entidad autónoma o reloj interno responsable de la generación de ritmos circadianos: el Núcleo Supraquiasmático (NSQ).

## 3.2 El núcleo supraquiasmático

En mamíferos, el reloj circadiano se encuentra en el Núcleo Supraquiasmático (NSQ). Anatómicamente, el NSQ se compone de un par de estructuras neuronales que se localizan en el hipotálamo antero ventral a ambos lados del tercer ventrículo, por arriba del quiasma óptico (Schwartz, 2002; Welsh *et al.*, 2010).

### 3.2.1 Poblaciones neuronales en el NSQ

Aunque el NSQ es un núcleo pequeño (en ratas no mayor a 1 mm<sup>3</sup>), contiene alrededor de 16000 neuronas (Schwartz, 2002), que utilizan sistemas de neurotransmisión tales como el de la Arginina Vasopresina (AVP), liberada por la región dorsomedial y el Péptido Vasoactivo Intestinal (VIP) liberado por la región ventrolateral del NSQ; región que recibe la información fótica de la retina. Además de estos neuropéptidos también se encuentran el Péptido Liberador de Gastrina (GRP), el Péptido Histidina Isoleucina (PHI), calbindina, hormona liberadora de tirotrófina, encefalina y calcitonina, por mencionar algunos (van Esseveldt, 2000). La Figura 5 muestra de manera ilustrativa el inmunomarcaje de algunos neuropéptidos localizados en el NSQ.



**Figura 5. Marcaje de neuropéptidos.** Sección coronal de NSQ en ratón, la cual muestra marcaje de neuronas inmunoreactivas a AVP localizadas dorsomedialmente y neuronas inmunoreactivas a GRP localizadas en el área ventrolateral (Tomada de Welsh *et al.*, 2010).

### 3.3 NSQ “el oscilador maestro”

El NSQ es el “oscilador maestro” del organismo, ya que es una entidad autónoma, capaz de generar por sí misma ritmicidad circadiana en su actividad neuronal. Existen evidencias de que las neuronas del NSQ en aislamiento (cortes de núcleo supraquiasmático aislado (Inouye y Kawamura, 1979) o en cultivo neuronal *in vitro*, expresan actividad eléctrica circadiana (Green y Gillete, 1982; Gross y Hendriks, 1982; Shibata *et al.*, 1982). La estimulación eléctrica del NSQ resulta en el desplazamiento de fase de la mayoría de los ritmos expresados (Schwartz, 2000). En roedores, la lesión electrolítica del NSQ mostró la pérdida de la organización circadiana tanto de variables fisiológicas, como la corticosterona, o conductuales como la actividad locomotora (Moore y Eichler, 1972; Stephan y Sucker, 1972). Algunos trabajos han mostrado que trasplantes de tejido fetal de NSQ dentro de animales previamente lesionados pueden restaurar los ritmos circadianos de actividad locomotora, así como en ratones genéticamente arrítmicos con mutación en el gen CLOCK (Ralph, 1990; Sujino *et al.*, 2003). Propiedades intrínsecas del NSQ tales como su metabolismo energético, los picos de actividad neuronal y la expresión de genes muestran una ritmicidad circadiana tanto *in vivo* como *in vitro* (Swartz, 2000). Estas evidencias han demostrado la función del NSQ como reloj biológico.

#### 3.3.1 Recepción de señales fóticas

En mamíferos, la información luminosa es captada inicialmente por la retina, lugar donde se encuentran las células ganglionares fotosensitivas de la retina (pRCG) (Moore *et al.*, 1995), las cuales expresan un fotopigmento llamado melanopsina, que al recibir la luz origina una cascada de señalización celular, que induce la liberación pre sináptica de glutamato y del péptido hipofisario activador de la adenilato ciclasa (PCAP), ambas señales viajan a través de los axones hasta hacer contacto con la región retinocipiente del NSQ celular, transmitiendo así la información de la luz medio ambiental (Aguilar-Roblero, *et al.*; 2004, Moore, 1972). Otras áreas también reciben aferencias del TRH, como el hipotálamo anterior, el hipotálamo lateral y el área retroquiasmática (Johnson *et al.*, 1988). Esta fotestimulación de la retina, además, resulta en la secreción directa del neurotransmisor glutamato, de carácter neuronal excitatorio, que es transportado por el TRH (Tracto retino hipotalámico) hasta la parte retinorecipiente del NSQ, donde estimula la liberación de VIP, lo que resulta en la sincronización de la actividad autónoma del NSQ.

### 3.3.2 Oscilaciones circadianas en ausencia de señales fóticas

Cuando un organismo es privado de señales de luz, es decir se encuentra en condiciones constantes de oscuridad, el NSQ produce ritmos ligeramente distintos a las 24 horas, fenómeno conocido como “corrimiento libre” (“free running”), el cual es un efecto endógeno. Sin embargo, un organismo puede reajustar su reloj circadiano si éste recibe un pulso de luz. La entrada de luz en el organismo produce diferentes respuestas del NSQ dependiendo del momento en el que esta señal incida sobre el organismo, por ejemplo, al inicio de la noche la luz produce un retraso de fase del reloj circadiano, mientras que al final de la fase oscura produce un avance de fase (Pittendrigh y Daan, 1976). Así también, la magnitud de los retrasos y avances de fase depende de la intensidad de luz y la duración de la exposición a la luz que el organismo recibe (Meijer *et al.*, 1992; Nelson y Takahashi, 1991). Estas respuestas del NSQ nos indican que aun cuando éste es capaz de generar oscilaciones autónomas, la luz es una señal muy poderosa que provoca efectos directos sobre él, poniendo en marcha la excitación neuronal. Además que se ha mostrado en ratas, que la luz también puede inhibir la actividad locomotora junto con el decremento en la tasa cardiaca, mientras que en humanos, se acompañan del incremento de la tasa cardiaca (Scheer, 2002).

### 3.4 Señales de luz y proyecciones del NSQ en el cerebro

La expresión rítmica-circadiana de un organismo se debe a la combinación de influencias rítmicas, tanto endógenas como exógenas. La señal medioambiental que recibe el organismo, es la luz o también llamado Zeitgeber, palabra alemana propuesta por Aschoff, la cual significa “dadora de tiempo”. En cronobiología el Zeitgeber define a aquella señal que es capaz de indicar tiempo (Aschoff, 1960). Al ajuste del NSQ con el Zeitgeber se le conoce como proceso de sincronización. La característica más importante del NSQ es que en ausencia de zeitgebers, este núcleo es capaz de seguir generando ritmicidad en su expresión; a esto se le conoce como ritmicidad o expresión endógena (Buijs y Kalsbeek, 2001; Dibner *et al.*, 2010; Ederi, 2010; Moore, 1997). Dado el acoplamiento del NSQ con el zeitgeber, el NSQ transmite esa ritmicidad hacia diferentes estructuras, manteniendo una comunicación para la expresión de variables específicas en el cuerpo, tales como los ritmos fisiológicos, de comportamiento, sueño-vigilia, secreción de hormonas (Schwartz, 2002; Welsh, 2010), así como la organización en la expresión de temperatura corporal (Eastman *et al.*, 1984; Refinetti *et al.*, 1994). En mamíferos, el NSQ es responsable de la organización de la actividad locomotora, ajustándola predominantemente a una fase, ya sea de luz u oscuridad. En roedores, dicha organización predominante se encuentra en la fase de oscuridad. Como se ha mencionado anteriormente

en roedores, lesiones electrofólicas del NSQ demuestran la pérdida de esta organización (Moore y Eichler, 1972; Stephan y Sucker, 1972).

Entre los núcleos que reciben las proyecciones del NSQ se encuentran: el Núcleo Arqueado (ARC), el área Preóptica Media (MPO), el Septum Lateral (LS), el Núcleo Dorsomedial del Hipotálamo (DMH), la zona Subparaventricular (sPVZ), el Núcleo Paraventricular (PVN), el núcleo basal de la estría terminal (BNST), el Núcleo Paraventricular del Tálamo (PVT) y la Hojuela Intergeniculada (IGL) (Dibner *et al.*, 2010; Morin, LP 1999). El NSQ ha sido relacionado análogamente como un director de orquesta, el cual dirige en los tiempos adecuados los demás relojes autónomos presentes en un organismo, como los presentes en tejidos y órganos (Buijs y Kalsbeek, 2001; Dibner *et al.*, 2010; Ederi, 2010).

Algunos ejemplos en los que la luz tiene una influencia en la expresión de variables circadianas, se encuentra la inhibición instantánea de la liberación de melatonina, cuya producción está mediada por la glándula pineal, lo que ha sido mostrado tanto en roedores como en el ser humano (Bothorel 2002; Klein y Weller; 1972; Pevet y Challet, 2011; Zeitzer, 2000). Algunos ejemplos adicionales acerca de la influencia de la luz en los efectos que ejerce el NSQ son: la inhibición de la liberación de corticosterona en el inicio del periodo de oscuridad (Buijs *et al.*, 1999) y el decremento del ritmo cardiaco (Scheer *et al.*, 2001).

### 3.5 Efecto de Masking y sus características

Este es un fenómeno propuesto por Aschoff en 1960, quien lo definió como aquel efecto provocado por la luz para ajustar el reloj circadiano, que tiende además, a tener un efecto directo sobre los ritmos que se han expresado. Él observó que aquellas especies que son activas durante el día presentan un aumento en su actividad por el incremento de la luz y a su vez, es suprimida por la oscuridad (Aschoff y von Goetz, 1988). Es decir, que además de los efectos de sincronización de los ciclos luz-oscuridad en el sistema de tiempo circadiano, la luz *per se* ejerce un efecto directo en las variables rítmicas indicadoras del sistema circadiano (Gander y Moore-Ede, 1983).

La mayoría de los zeitgebers no solo sincronizan a los ritmos circadianos por el control de periodo y fase del marcapasos, sino también afectan a los ritmos expresados positiva o negativamente, resultando en el enmascaramiento u ocultamiento (“mask”) del comportamiento del marcapasos. En otras palabras, en un ritmo sincronizado, el masking puede ocultar la fase que el marcapasos ha dictado (Aschoff, 1999).

La diferencia fundamental entre el proceso de sincronización y el efecto de masking, radica principalmente en que mientras en el proceso de sincronización, el efecto que ejerce la señal medioambiental de luz u oscuridad en la expresión del ritmo biológico es lenta y tarda bastantes días en ajustarse, en el proceso de masking, la respuesta es abrupta e inmediata y solo dura el tiempo en que la señal incidente está presente ([Aschoff, 1988](#)).

Entonces, el ajuste del reloj endógeno no es el único efecto que ejerce la luz confinando mecanismos de comportamiento y actividad a tiempos adecuados del día o la noche, sino que la luz complementa las expresiones de estas variables que se controlan desde el reloj biológico los cuales son totalmente ajenos al proceso de ajuste del reloj biológico, siendo el masking un efecto que complementa el control del reloj biológico para ajustarse a su medioambiente ([Aschoff, 1988](#)).

Mrosovsky (1999), propuso que si bien el efecto de masking es un proceso que integra el proceso de sincronización, el NSQ, no es necesario para que el efecto de masking esté presente. En un experimento realizado en Hamsters sirios con lesión del NSQ, fueron sometidos a un ciclo ultradiano de 3 horas luz - 3 horas oscuridad. La medición de la actividad locomotora en una rueda para correr o Wheel running (un parámetro para la medición de la actividad voluntaria), mostró que cerca del 90% de la actividad locomotora, realizado por los animales lesionados ocurría en la fase oscura del ciclo ultradiano, lo que sugiere que el proceso de masking es independiente al reloj biológico.

Es importante resaltar la falta de evidencia o la realización de un análisis histológico de los cortes de cerebro en el trabajo anteriormente citado, pues sólo se menciona que se realizó un análisis por tinción de Nissl, el cual es insuficiente para demostrar que en efecto ningún neurotransmisor está siendo secretado o que ponga en evidencia que existe la presencia de algún remanente de NSQ posterior a la lesión. Trabajos como [Satinoff y Prosser \(1988\)](#); [Buijs et al. \(1993\)](#), y [Scheer \(2002\)](#), han mostrado la importancia de verificar por examinación histológica los tejidos cerebrales para un neurotransmisor específico como VIP. La marcación de este neurotransmisor en la zona retinocipiente es una señal precisa acerca de la entrada de luz en el organismo.

## 4. Planteamiento del problema

---

Como se ha visto, el estudio del efecto de enmascaramiento es un fenómeno de importancia en el ámbito de los ritmos biológicos, ya que es un proceso complementario en el control del reloj biológico de los organismos, el cual ejerce un efecto directo en la expresión de variables biológicas, como es en este caso, la ritmicidad en la actividad locomotora. A su vez, estos estudios nos dan pautas que permiten un análisis y comprensión de los mecanismos en las rutas del NSQ y la expresión que este núcleo conduce, como la de la actividad locomotora.

Debido a la importancia del estudio de los efectos de masking en los ritmos biológicos y a la falta de estudios presentes con el debido cotejo inmunohistoquímico en la remoción total del reloj biológico, es necesario realizar estudios que permitan entender el fenómeno de masking o de cómo responde la actividad locomotora de un organismo en ausencia total del NSQ ante estímulos de luz-oscuridad.

## 5. Hipótesis

---

Si el NSQ es un reloj endógeno que interacciona con la luz medioambiental ajustando su ciclo interno en un proceso llamado sincronización, entonces la lesión completa del NSQ provocará la desaparición de la sincronización por luz y se alterará la expresión de la actividad locomotora, lo que conducirá a la desaparición del efecto de masking.

## 6. Objetivo general

---

Analizar la expresión de la actividad locomotora en ratas con lesión del NSQ, en distintos ciclos de luz-oscuridad.

## 7. Material y métodos

---

Para poder analizar si realmente los efectos inhibitorios de la luz sobre la actividad locomotora son dependientes de la presencia del NSQ se realizaron lesiones bilaterales de este núcleo.

Los experimentos fueron realizados con dos principales grupos experimentales:

- Animales intactos
- Animales con lesión de NSQ e inyección de la toxina del cólera subunidad b (CTB) en el humor vítreo.

Debido a lo complejo de obtener animales con una remoción total del NSQ, se procedió a evaluar la expresión de la actividad locomotora a dos grupos extras, cuya lesión del NSQ fue parcial (Lesión parcial), o que no ocurrió, siendo esta lesión más lejana o posterior al NSQ, Lesión posterior.



## 7.1 Animales y condiciones generales de alojamiento

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, proporcionadas por el Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, con un peso entre 250 y 300 g al inicio del experimento. Los animales fueron alojados en cajas individuales de polipropileno (45 x 30 x 35), con libre acceso al agua y al alimento (Rodent Laboratory Chow 5001, Purina Minnetanka, MN, USA).

Se mantuvieron en un cuarto de monitoreo en un ciclo de luz/oscuridad (L/O) de 12:12 h. Las luces se encendieron a las 8:00 am, definiéndose como ZT0 (Zeitgeber 0), y se apagaron a las 8:00 pm, definido como ZT12.

Los experimentos siguieron los acuerdos del Comité de Ética del Instituto de Investigaciones Biomédicas conforme en la guía para el cuidado y el uso de la experimentación con animales, el cual está apegado a los lineamientos para manipulación animal internacional. Todos los procedimientos fueron realizados de manera que se minimizara la cantidad de animales así como para evitar su sufrimiento.

## 7.2 Procedimiento quirúrgico para lesiones del NSQ

- **Anestesia**

Para las cirugías, los animales fueron anestesiados con 180  $\mu$ L de Ketamina (10mg/100g) y 100  $\mu$ L de Xilazina (1mg/100g) vía intramuscular.

- **Cirugía**

Las ratas fueron colocadas en un estereotáxico (David Kopf Modelo 900). La barra de los dientes fue colocada en una posición de -2.5 y los brazos de los electrodos en un ángulo de -2°. Por medio de 2 electrodos las ratas recibieron lesiones bilaterales dirigidas hacia el NSQ de acuerdo a las siguientes coordenadas: En las que Bregma, es tomada como referencia 0 ([Paxinos y Watson, 1998](#)), 0.4 mm posterior, 8.5 mm ventral de la superficie de la duramadre y 0.2 mm lateral de la vena Sinus. Se hizo pasar corriente de 1 miliampere (mA) con una temperatura de 85°C durante 1 minuto (Generador de lesión, Radiotonics).

### 7.3 Sistema de monitoreo y tiempo de recuperación

- **Tiempo de recuperación**

Posterior a las operaciones se permitió a los animales recuperarse durante una semana en un fotoperiodo 12 h luz: 12 h oscuridad, con libre acceso al agua y al alimento.

- **Sistema de monitoreo y registro de la actividad**

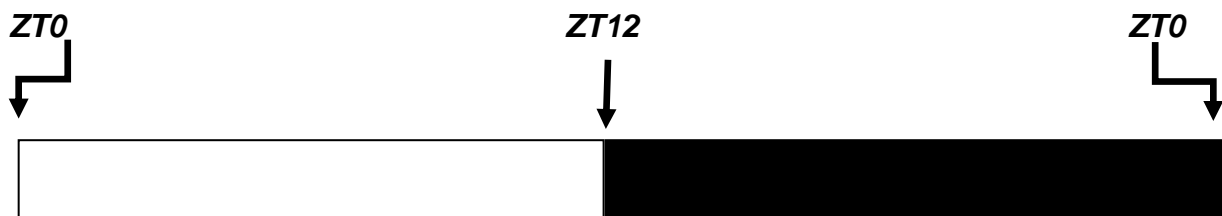
Cada caja se colocó en estantes, en el que la posición de cada posición por caja posee plataformas que contienen sensores de movimiento para registrar los movimientos durante todo el experimento.

El registro de la actividad fue almacenada en un sistema digitalizado de almacenamiento automatizado; en intervalos de 1 minuto. Estos datos fueron almacenados en una PC. Para realizar los análisis posteriores, el sistema SPAD9 (Sistema de Procesamiento y Adquisición de Datos 9) basado en el programa Matlab, convirtió el registro que se obtuvo de los sensores en actogramas, los cuales son representaciones gráficas del movimiento de cada animal.

### 7.4 Fotoperiodos

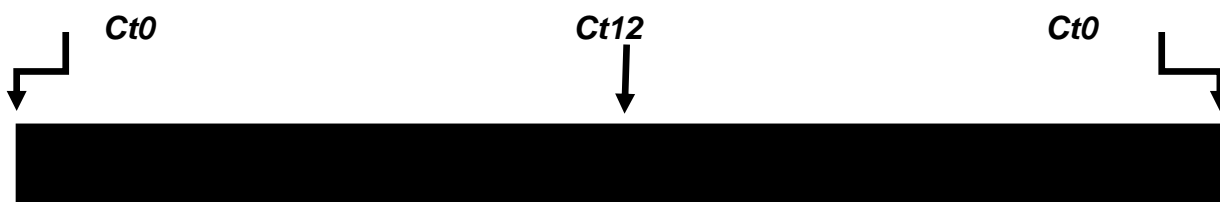
Todos los grupos experimentales fueron sometidos a los siguientes fotoperiodos:

1.- Animales expuestos a un fotoperiodo de 12 horas luz/12 horas oscuridad, de ahora en adelante se definirá como (**L/O**). El momento de encendido de las luces se define como ZT 0 y ZT12 el momento de apagado de las luces.

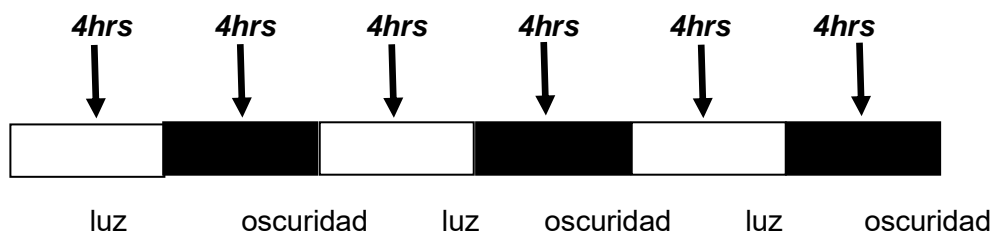


#### **Ciclo L/O 12:12**

2.- Oscuridad constante (**OC**). La ausencia de señales fóticas es un método que permite conocer la ritmicidad endógena de la actividad locomotora. En cronobiología, *circadian time* (CT), es un término análogo a zt, pero utilizado para condiciones constantes o en ausencia de las señales externas.



3.- Ciclo ultradiano 4 horas luz- 4 horas oscuridad (**CUD**). El ciclo ultradiano es una prueba a la que los animales serán sometidos para poder analizar si la actividad locomotora tiene una respuesta por la incidencia de luz.



Se consideró que para la duración de cada fotoperiodo inducido, debía mostrarse claramente un patrón en la organización o desorganización de la actividad locomotora, según fuera el caso. Es así que la duración mínima de inducción fue a partir de 5 días. En casos donde se quiso evidenciar la fuerza de ese patrón se dejó correr una semana extra.

## 7.5 Inyección de Trazador

Con la finalidad de conocer la posibilidad de la existencia de remanentes en las vías de comunicación nerviosas que van de la retina hacia el NSQ, una vez realizada la lesión se inyectó el trazador fluoróforo-conjugado antero-retrogrado: toxina del cólera subunidad B (CTB) en el humor vítreo del ojo, ([Angelucci et al., 1996](#)).

## 7.6 Obtención de cerebros

Las ratas fueron anestesiadas con una sobredosis de pentobarbital sódico (Sedal-Vet 65 mg/mL), y perfundidas transcárdialmente con 50 mL de solución salina al 0.9%, seguida de 250 mL de paraformaldehído al 4%, diluido en Buffer de Fosfato Salino 0.1M (PBS; pH 7.2-7.4). Los cerebros fueron removidos manualmente y fijados en paraformaldehído durante 24 horas, el cual conservó las proteínas que se encuentran en el cerebro. Posteriormente fueron

crioprotectados con una solución de sacarosa al 30% de 3 a 4 días hasta que los cerebros tuvieran una densidad mayor que la solución de sacarosa, la cual ayudó a un adecuado manejo del cerebro durante su seccionado y evitó la formación de cristales de agua que pudieran cortar o maltratar las secciones cerebrales.

Las secciones coronales cerebrales fueron obtenidas con la ayuda de un criostato con un grosor de 40  $\mu\text{m}$  a una temperatura  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 7.7 Histología e Inmunohistoquímica

Se verificaron los cortes de cerebro con la técnica de inmunohistoquímica para el neuropéptido VIP y para CTB. El concepto fundamental de la técnica de la inmunohistoquímica está basado en la detección de un antígeno, por medio de un anticuerpo específico, y el uso del reactivo diaminobenzidina para revelar la presencia del anticuerpo mediante reacción enzimática (Hoffman *et al.*, 1993; Morgan y Curran, 1991; Ramos-Vara, 2005)

Se tomaron de 4 a 6 cortes antero-posterior según el atlas “The rat brain in stereotaxic coordinates” de Paxinos y Watson, 1998. Los cortes fueron incubados en una solución de supermix (0.25% de gelatina, 0.5% de triton X-100 diluido en TBS), en un pH entre 7.4-7.6, con el anticuerpo primario contra CTB o VIP (según correspondió) hecho en conejo, durante una hora a temperatura ambiente y una noche a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado de burro anti-conejo en una relación 1:200 por una hora a temperatura ambiente, y después se incubaron en el complejo avidina-biotina: 0.9% de avidina y 0.9% de la solución de biotina; (Vector Laboratories) 1:500 por una hora a temperatura ambiente. Los tejidos se hicieron reaccionar en diaminobenzidina (0.5 mg/mL, en Buffer de Trizma, pH 7.2), con peróxido de hidrógeno (15  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30%) y 500  $\mu\text{L}$  de Niquel. Entre cada paso, los tejidos fueron lavados tres veces por 5 minutos en PBS (Buffer de fosfato y salina). Los tejidos se montaron en portaobjetos gelatinizados, se deshidrataron con concentraciones ascendentes de etanol (70, 96 y 100%), clarificados con xileno, y por último se les colocó un cubreobjetos con Entellan (Merk).

## 7.8 Análisis de la actividad locomotora y estadística

Del programa SPDAD9 se obtuvieron los archivos de los datos de locomoción por cada fotoperiodo. Estos datos fueron agrupados por grupos experimentales. Posteriormente se

obtuvieron los promedios de cada grupo y una gráfica que representa del comportamiento de cada grupo ante cada fotoperiodo.

Para determinar la existencia o ausencia de un patrón rítmico durante las condiciones del fotoperiodo L/O y OC, por medio del programa Matlab, se realizó el análisis de cosinor ([Ángeles-Castellanos et al., 2011](#)), el que emplea la siguiente fórmula:

$$y = [M + A \cdot \cos(2\pi/24 \cdot t - c)],$$

donde “y” es el nivel de actividad, M la media de la actividad, A la amplitud de la actividad, “c” la Acrofase de la oscilación y t el tiempo en horas (h) ([Bingham et al., 1982](#)) obteniendo así, los parámetros que definen un ritmo biológico: mesor, amplitud y acrofase. Por medio de un análisis de varianza de una vía se compararon sus amplitudes. Un análisis pot hoc con la prueba de Tukey fue realizado para verificar las diferencias estadísticas entre los grupos o fotoperiodos según fue el caso, con un nivel de significancia  $p < 0.05$ . Un análisis adicional que mostró el nivel de significancia en condiciones de OC fue el análisis  $\chi^2$  debido a que es una herramienta ampliamente utilizada para la determinación de ritmicidades durante condiciones de OC ([Reffinetti et al., 2007](#)).

Para evaluar la actividad locomotora bajo el periodo ultradiano se hicieron pruebas estadísticas con ayuda del programa STATA, por medio de ANOVAS de medidas repetidas para comparar las diferencias significativas entre fotoperiodos dentro del mismo grupo y comparándolo entre todos los grupos experimentales. También se realizaron ANOVAS de una vía para evaluar el efecto de la lesión en la actividad locomotora expresada y ANOVAS de dos vías para evaluar el fotoperiodo y el factor lesión en un análisis de más de un grupo experimental y así poder analizar grupos experimentales con el grupo control. Un análisis post hoc fue realizado con la prueba de Bonferroni, con un nivel de significancia  $p < 0.05$ . Adicional a este análisis con ayuda de Matlab se obtuvo el análisis de Lomb-Scargle ([Lomb N, 1986](#)) el cual es un periodograma que muestra la frecuencia y el pico de significancia el cual es el indicativo de la periodicidad de los datos.

## 8. Resultados

---

### 8.1 Análisis de la Actividad Locomotora e Inmunohistoquímica

Debido a diferencias en el posicionamiento de los electrodos, lo que repercutió en la zona de la lesión, ya que nos alejó de forma posterior en el caso de la lesión posterior (L.posterior) y dañando al NSQ de forma parcial en el grupo de Lesión parcial (L.parcial), se obtuvieron dos grupos adicionales.

Estos grupos experimentales corresponden a: *Animales con lesión parcial de NSQ* y *Animales con lesión posterior al NSQ* y debido a la importancia de los resultados obtenidos se presentan a continuación. El protocolo de inducción de fotoperiodos fue el mismo.

El orden de los grupos es el siguiente con sus respectivos fotoperiodos y cortes histológicos por cada grupo, excepto el grupo de animales intactos donde no es necesario mostrar cortes histológicos.

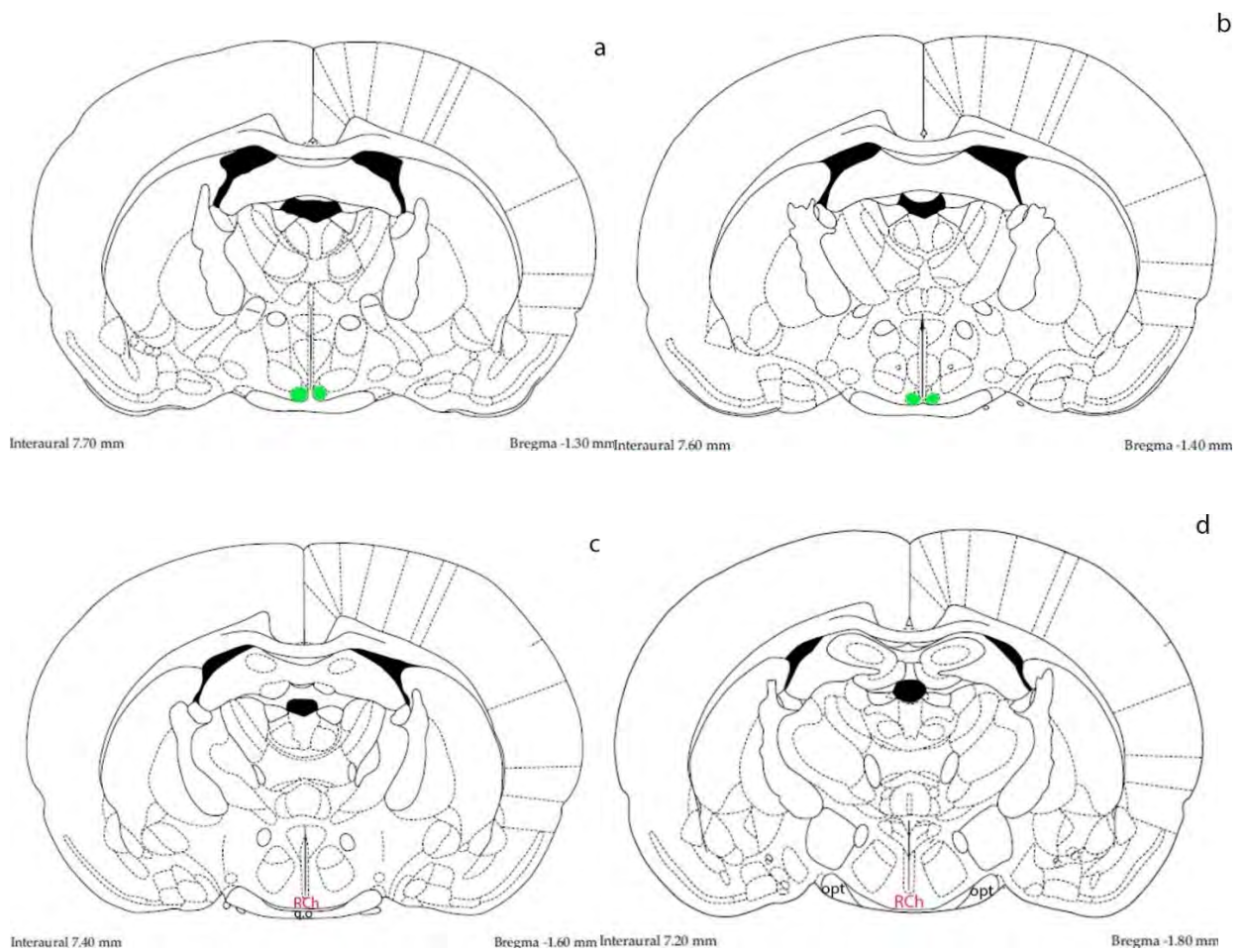
<b>Grupo 1</b>	<b>Fotoperiodo</b>	<b>Grupo 2</b>	<b>Fotoperiodo</b>
<b>INTACTOS</b>	L/O	<b>L. NSQ</b>	L/O
	OC		OC
	CUD		CUD
<b>Grupo 3</b>	<b>Fotoperiodo</b>	<b>Grupo 4</b>	<b>Fotoperiodo</b>
<b>L. Posterior</b>	L/O	<b>L. parcial</b>	L/O
	OC		OC
	CUD		CUD

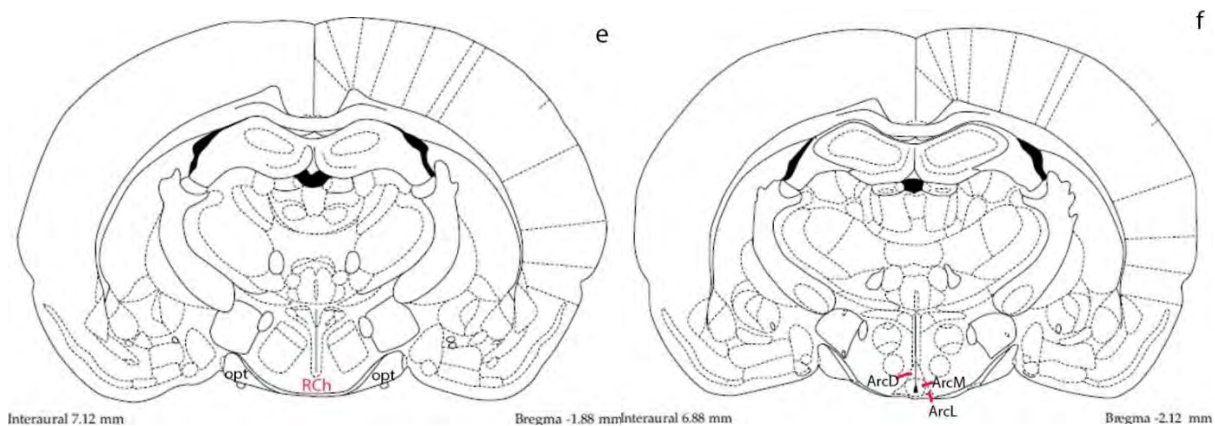
**Cuadro 1. Organización de grupos experimentales.** Esquema que muestra los 4 diferentes grupos experimentales de los que consta el presente trabajo. O.C- oscuridad constante, L/O- luz/oscuridad, CUD- ciclo ultradiano.

### 8.1.1 Animales Intactos

El grupo de animales intactos sirve como un comparativo con respecto a los demás grupos. Muestra la respuesta de la actividad locomotora en condiciones donde el NSQ está presente y no se realiza ningún tipo de lesión.

En las figuras siguientes, se ilustra el cerebro de una rata intacta, desde el NSQ-Bregma -1.30 mm hasta la zona más rostral del ARC-Bregma -2.12 mm las cuales se localizan en la zona ventral del cerebro.





**Figura 6. Diagramas coronales de cerebro. A-F)** Las ilustraciones muestran cortes coronales de cerebro de una rata totalmente intacta. El orden es presentado en orden anterior (inciso a) hasta llegar al área posterior (inciso f). Inciso a-b) El área coloreada en verde muestra el núcleo supraquiasmático. Inciso c-e) en letras rojas se muestra el área retroquiasmática. Inciso f) Se muestran las diversas áreas del Núcleo arqueado. Oq-quiasma óptico, RCh-Área retroquiasmática, ArcD-Núcleo arqueado dorsomedial, ArcM Núcleo arqueado Medial, ArcL núcleo arqueado lateral. (Imágenes modificadas de: [Paxinos y Watson, 1998](#)).

### 8.1.2 Los animales intactos presentaron una organización de la actividad locomotora en el ciclo L/O

La Figura 7 representa la actividad locomotora de un animal intacto en condiciones de luz/oscuridad. Se puede observar que los animales intactos muestran mayor actividad locomotora promedio hacia la fase oscura, 79%, y una menor cantidad de actividad locomotora promedio en la fase de luz con 21% (Figura 7-b). Estos datos muestran las condiciones normales en las que un animal intacto expresa su actividad locomotora.

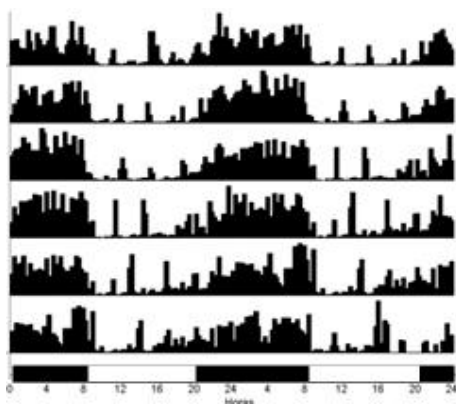
En la Figura 8 podemos ver el periodograma  $\chi^2$ , el cual corresponde al grupo de animales intactos en condiciones L/O, en donde se muestra que existe un ritmo periódico cada 24 horas. Este análisis corresponde al periodograma en  $\chi^2$  correspondiente a los datos del actograma anterior. Estos datos de actividad son evaluados mediante el análisis propuesto por Solokolove y Bushell, el cual es una modificación al análisis de Enright, en donde se agregan tres niveles de significancia con la finalidad de detectar la periodicidad que pudiera existir en la serie temporal de los datos de actividad. Esta figura muestra que existe un ritmo cada 24 horas el cual es estadísticamente significativo, debido a que el pico sobrepasa las tres líneas de significancia.



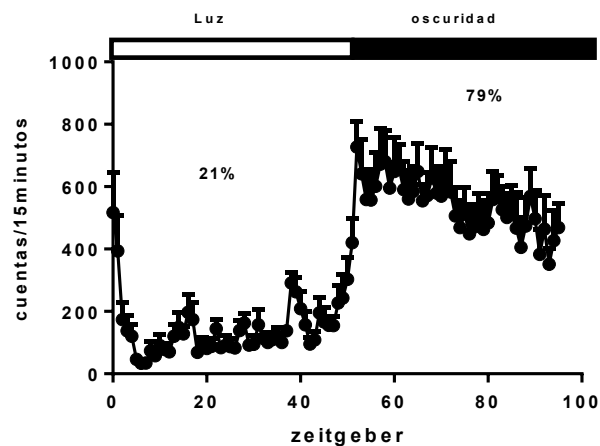
Ciclo 12h luz: 12h oscuridad

Promedio N=6

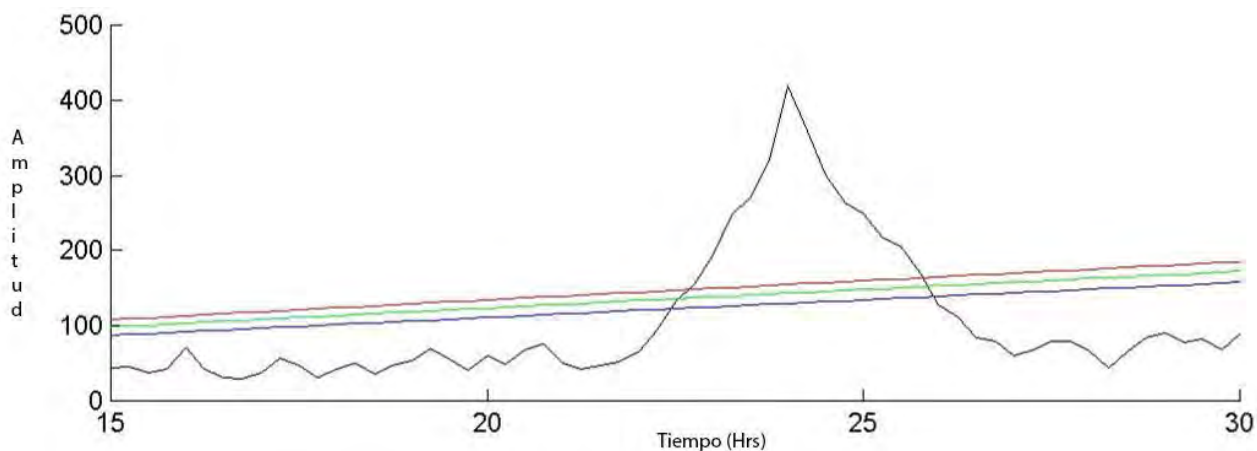
A) Actograma



B) Tendencia de los datos



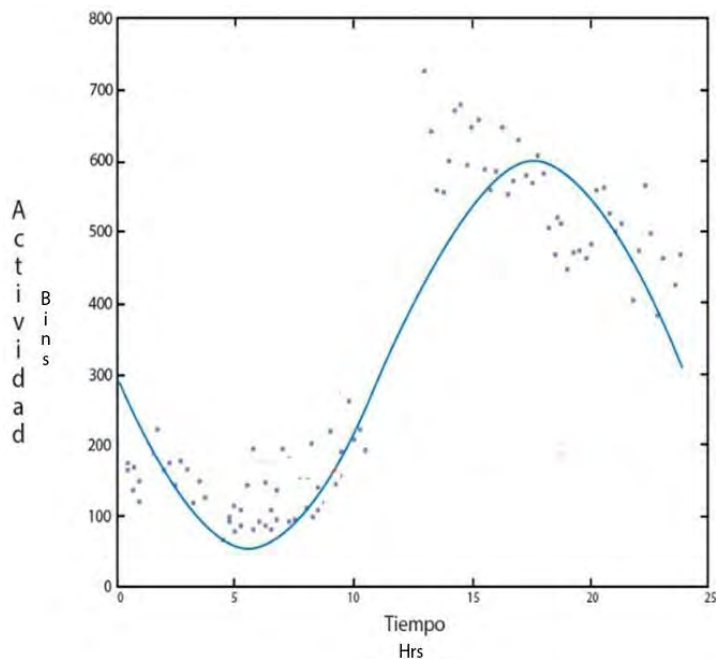
**Figura 7. Actograma doble plot y tendencia de los datos.** a) Actograma que representa la organización de la actividad locomotora en un ciclo 12 horas luz/12 horas oscuridad. Las barras negras indican la fase oscura y las blancas la fase de luz. B) Tendencia de la actividad locomotora correspondiente al actograma, mostrando que la mayor actividad se presenta en la fase oscura.



**Figura 8. Periodograma  $\chi^2$ .** Datos de actividad locomotora obtenidos del actograma de la figura anterior. Distribución de la longitud del periodo o periodograma  $\chi^2$ . El eje de las abscisas representa el tiempo en el que la longitud del periodo es medida, el cual va de 15 a 30 horas. El eje de las ordenadas mide la amplitud del ritmo, el cual es evaluado por el gráfico mediante los niveles de significancia denotadas por las líneas azul= 0.05%, línea verde= 0.01 y línea roja= 0.001%.

Un análisis cosinor, figura 9, fue realizado para evaluar el mesor, la amplitud y la acrofase; parámetros del ritmo biológico. Se obtuvieron los siguientes datos: un mesor de 328.6, una amplitud de 272.9 y una acrofase de 17.55, considerando así la respuesta de la actividad en

condiciones normales de los animales, indicando la existencia de un ritmo cada 24 horas. Estos datos fueron tomados como referencia para realizar el análisis estadístico con respecto a los grupos experimentales.



**Figura 9. Análisis cosinor.** Gráfica que muestra el comportamiento del grupo intacto. Nótese que el grupo presenta un comportamiento sinusoidal.

Para mayores detalles consultar la sección 8.5.1.

### 8.1.3 Los animales intactos muestran *corrimiento libre* en condiciones de oscuridad constante

La Figura 10-a muestra el comportamiento de los animales en corrimiento libre en condiciones de oscuridad constante. La figura 10-b muestra el comportamiento de la actividad locomotora de los datos del actograma anterior (Figura 10-a). Se observó el 30.40% de actividad entre ct0 y ct12, correspondiente al día subjetivo, y un 65.40% de actividad de ct12 a ct0, correspondiente la noche subjetiva, mostrando así una diferencia entre la cantidad de actividad entre el día subjetivo y la noche

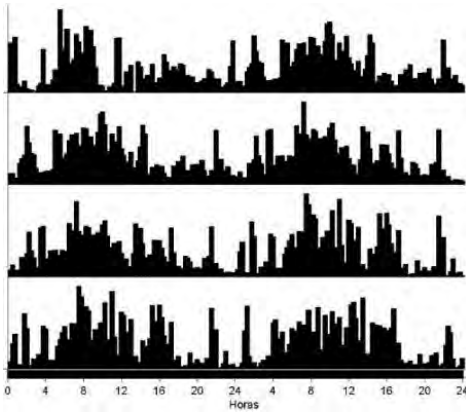
La Figura 11 muestra el periodograma en análisis por  $\chi^2$  correspondiente a los datos del actograma anterior (Figura 10-a). En él, los datos de actividad son evaluados mediante el mesor

y tres niveles de significancia con la finalidad de detectar la periodicidad que pudiera existir en la serie temporal de datos de actividad. Se observa claramente una periodicidad exhibida cada 24 horas estadísticamente significativa, ilustrado por el pico que sobrepasa las tres líneas de evaluación de significancia.

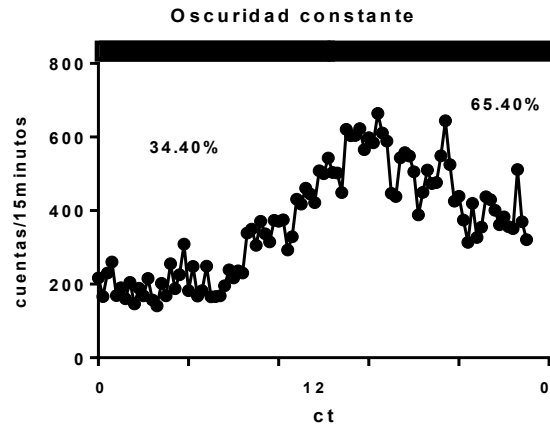
**Oscuridad constante**

Promedio N=6

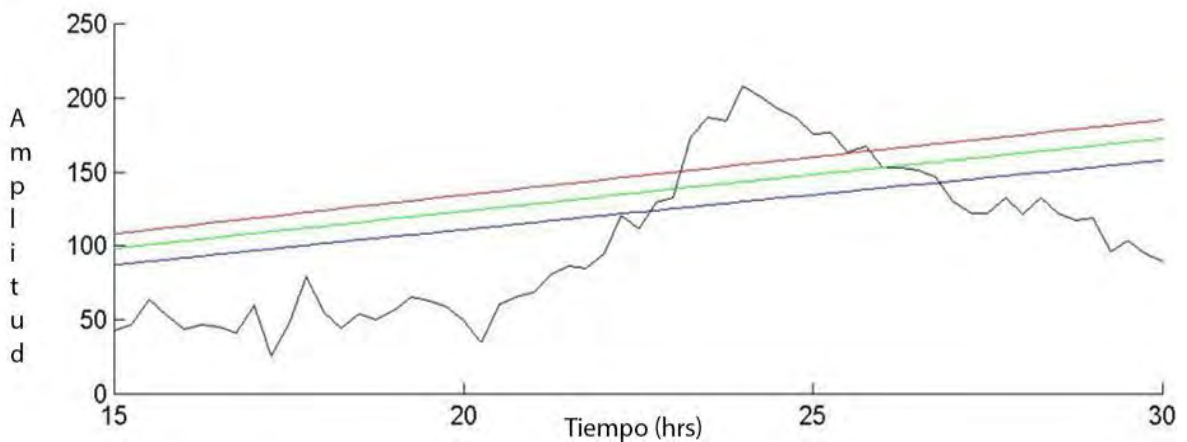
**a) Actograma**



**b) Comportamiento de la actividad locomotora**

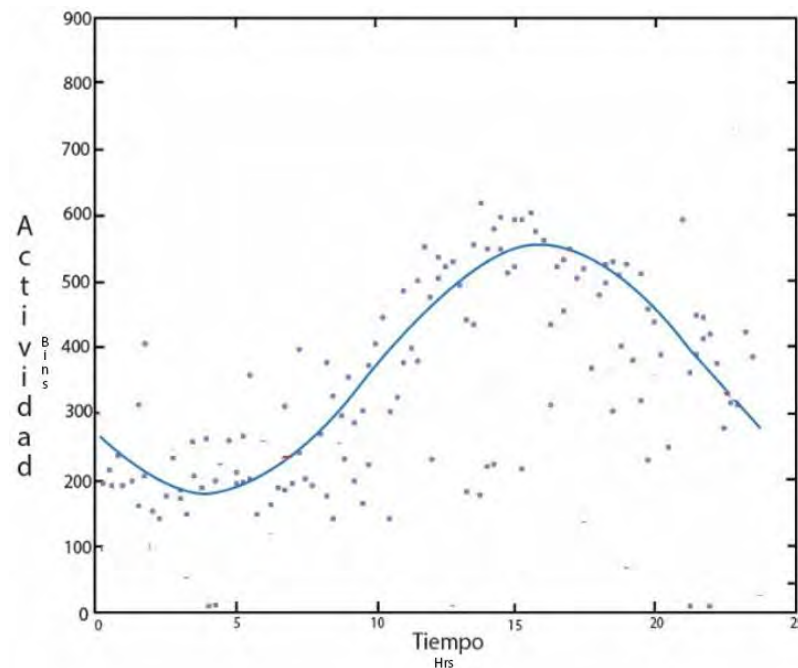


**Figura 10. Actogramas y tendencia de los datos. A)** Actograma que representa la actividad locomotora en condiciones de oscuridad constante, la barra oscura representa las condiciones de oscuridad constante. **B)** tendencia de la actividad locomotora del actograma anterior. La barra negra representa la fase oscura durante las 24 horas.



**Figura 11. Periodograma  $\chi^2$ .** Datos de actividad locomotora obtenidos del actograma de la figura anterior. Distribución de la longitud del periodo o periodograma  $\chi^2$ . El eje de las abscisas representa el tiempo en el que la longitud del periodo es medida, el cual va de 15 a 30 horas. El eje de las ordenadas mide la amplitud del ritmo, el cuál es evaluado por el gráfico mediante los niveles de significancia denotadas por las líneas azul= 0.05%, línea verde= 0.01 y línea roja= 0.001%.

Un análisis cosinor (Figura 12) muestra los siguientes parámetros rítmicos: un mesor de 367.2, una amplitud de 186.6 y una acrofase de 15.93. La amplitud fue posteriormente utilizada para hacer un análisis estadístico con respecto a los demás grupos experimentales en las mismas condiciones de oscuridad constante. En la sección 8.5.1 se muestran a detalle los resultados de estos análisis así como sus gráficas.



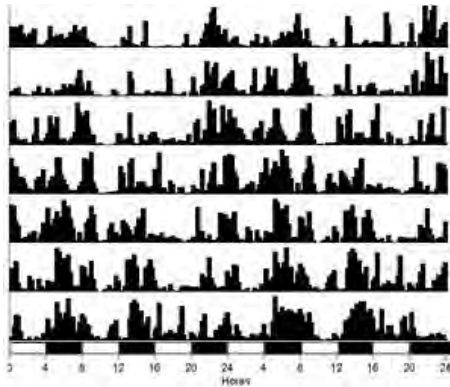
**Figura 12. Análisis cosinor.** Gráfica que muestra el comportamiento sinusoidal del grupo intacto en condiciones de oscuridad constante.

#### 8.1.4 Los animales intactos presentaron *masking* en el CUD

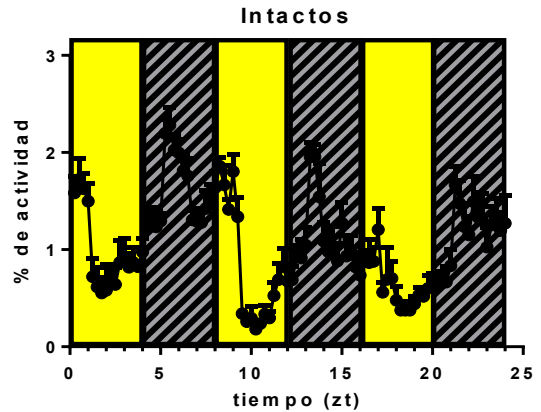
La Figura 12, muestra la respuesta de la actividad locomotora bajo condiciones ultradianas de luz/oscuridad.

En la figura 13 podemos ver el periodograma  $\chi^2$ , correspondiente al grupo de animales intactos en condiciones de un ritmo ultradiano (CUD). Se muestran dos picos estadísticamente significativos a las 16 y 24 horas, los cuales se correlacionan con las horas en las que la luz era apagada, lo cual explica el incremento de la actividad locomotora a esas horas.

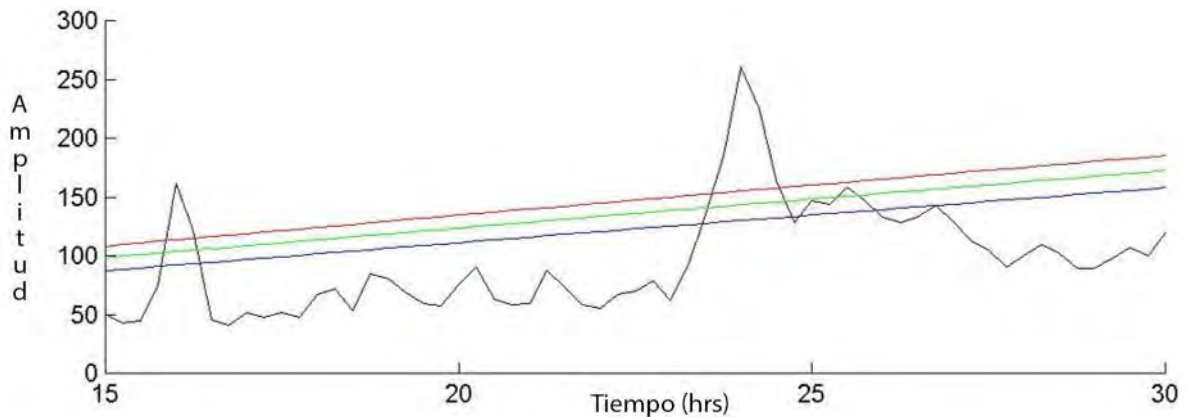
A. Actograma



B. Tendencia de los datos

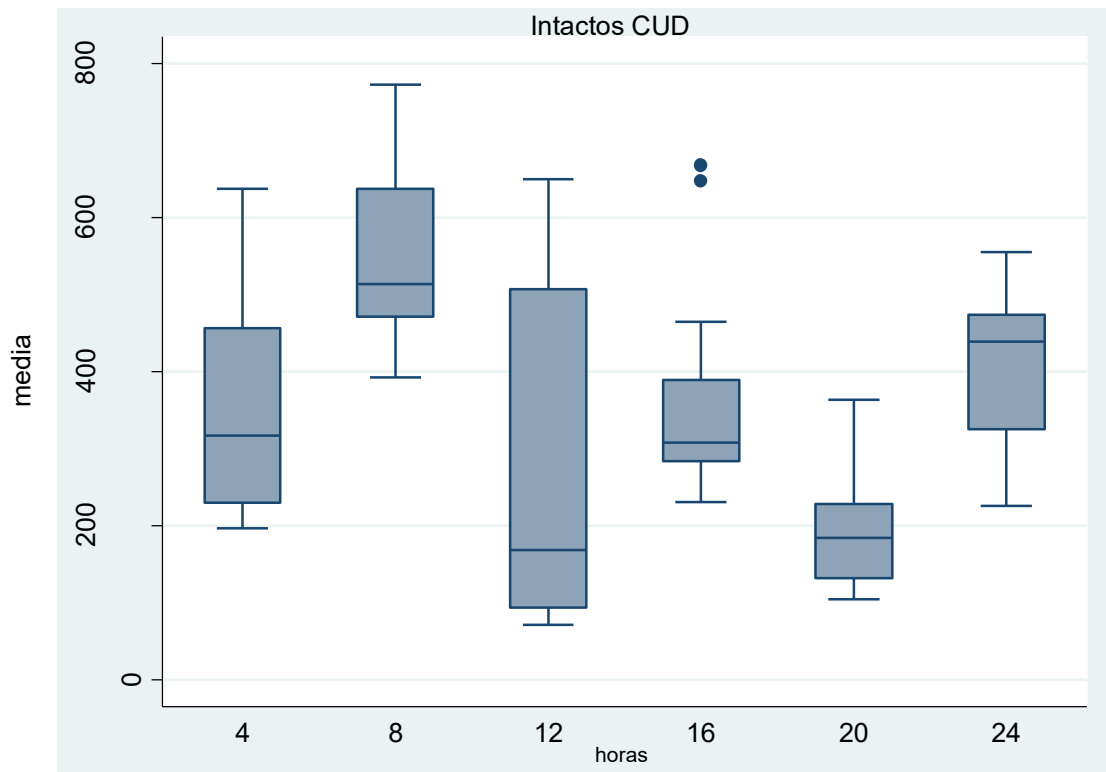


**Figura 12. Actograma y tendencia de los datos.** a) Representación de la actividad locomotora posterior a un ciclo ultradiano de 4 horas luz 4 horas oscuridad. Las barras blancas representan el periodo de luz, las negras el periodo de oscuridad. b) Gráfica que muestra el comportamiento bajo el fotoperiodo 4:4. Nótese la inhibición de la actividad durante las fases de luz (barras amarillas) y el incremento de la actividad en las fases oscuras (barras grises).



**Figura 13. Periodograma  $\chi^2$ .** Datos de actividad locomotora obtenidos del actograma de la figura anterior. Distribución de la longitud del periodo o periodograma  $\chi^2$ . El eje de las abscisas representa el tiempo en el que la longitud del periodo es medida, el cual va de 15 a 30 horas. El eje de las ordenadas mide la amplitud del ritmo, el cual es evaluado por el gráfico mediante los niveles de significancia denotadas por las líneas azul= 0.05%, línea verde= 0.01 y línea roja= 0.001%.

La Figura 14 muestra la distribución del conjunto de datos obtenidos por medio de la representación gráfica de caja y bigotes.



**Figura 14. Gráfica de caja y bigotes.** Diagrama de caja y bigote que muestra la dispersión y simetría de los datos a lo largo de los 6 cambios de luz oscuridad de los animales intactos. Los puntos fuera de la caja a las 16 horas muestran los casos extraordinarios fuera de la media.

Para evaluar si existen diferencias estadísticamente significativas en la expresión de la actividad locomotora cada 4 horas, se realizó una ANOVA de medidas repetidas. Los resultados se presentan en la sección 8.5.3.

Adicionalmente los datos fueron evaluados con el análisis Lomb-Scargle, la cual es una herramienta que permite detectar la presencia o ausencia de un ritmo ultradiano en la presente serie de datos temporales, así como su nivel de significancia, además de que ajusta la media de los datos durante las 24 horas y ajusta una senoide para evidenciar la respuesta de la actividad cada que se realizaron los cambios de luz-oscuridad (cada 4 horas). Para mayores detalles ver la sección 8.5.2.

## **8.2 Animales con Lesión de NSQ**

---

En las siguientes secciones se presentan los resultados del primer grupo de animales experimentales. Se mostrará primeramente los cortes histológicos y posteriormente se mostrarán los resultados de la actividad locomotora bajo los tres distintos fotoperiodos inducidos.

### **8.2.1 Cortes Histológicos e inmunohistoquímica de L. de NSQ**

Para poder analizar la participación del núcleo supraquiasmático sobre los efectos de la luz en la expresión de la actividad locomotora y el efecto de masking, a un grupo de animales con lesión del núcleo supraquiasmático se les realizó inmunomarcajes para VIP y CTB, los cuales se muestran en las figuras 15 y 16 correspondientemente, para mostrar que las lesiones se hicieron de manera total.

### **8.2.2 Inmunohistoquímica para CTB**

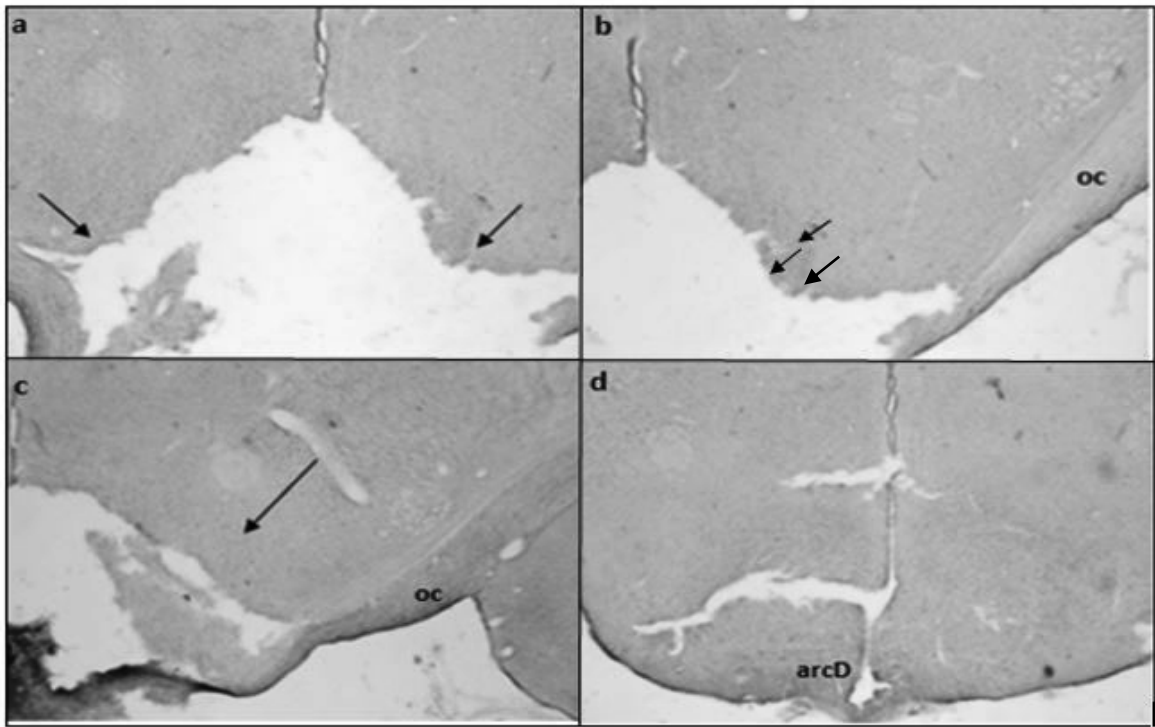
Posterior a realizar una lesión electrolítica del NSQ existe la posibilidad de que subsistan fibras nerviosas que van desde la retina hacia el NSQ comunicando por este medio, señales luminosas.

A continuación se presentan los cortes coronales e inmunohistoquímicas para el inmunomarcaje del trazador CTB (ver Figura 15).

## Lesión de Núcleo Supraquiasmático

- Inmunohistoquímica para CTB

### Rostral



### Caudal

**Figura 15. Cortes histológicos.** Cortes coronales de una región representativa de la lesión del NSQ, que va de la zona rostral a la caudal. Se muestra la ausencia de fibras positivas a CTB, confirmando que la lesión está completa: A) Las flechas señalan la ausencia total del NSQ, al igual que en b) y c). Oc-quiasma óptico. ArcD- Núcleo arqueado dorsomedial.

Como puede observarse en la figura anterior, hay una ausencia total del NSQ desde a) hasta c). Las figuras se muestran en orden anterio-posterior hasta llegar a la figura d) que es la región más rostral. Igualmente las figuras muestran una ausencia de neuronas positivas a CTB, lo cual nos indica que no existe ninguna señal luminosa que sea transmitida desde la retina del organismo hacia el reloj biológico; que como se ha observado está totalmente ausente.



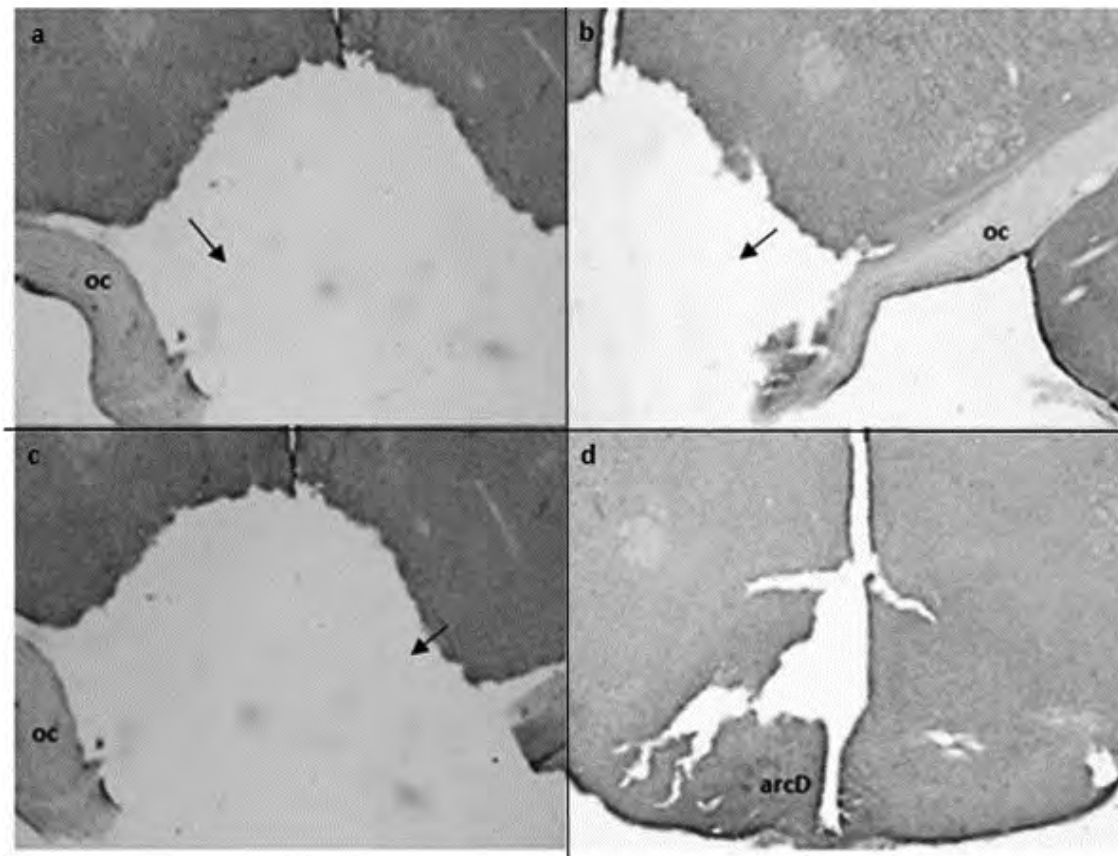
### **8.2.3 Inmunohistoquímica para VIP**

La realización de la tinción específica para el neuropéptido VIP nos permite detectar un posible remanente del NSQ sobre todo de la región ventral, zona que es la primera en recibir las señales fóticas. En el caso de no detectarlo mediante el inmunomarcaje, es una muestra directa de que la lesión está completa y de que se descartan posibles remanentes del reloj biológico. En la figura 16 se presentan los cortes coronales e inmunohistoquímicas para el inmunomarcaje de VIP.

## Lesión de Núcleo Supraquiasmático

- Inmunohistoquímica para VIP

### Rostral



Caudal

**Figura 16. Cortes histológicos.** Cortes coronales de una región significativa de la lesión del NSQ. Se muestra la ausencia de neuronas positivas de VIP, confirmando que la lesión está completa: a) las flechas señalan la remoción total del NSQ, al igual que en b) y en c). OC-quiasma óptico. ArcD-Núcleo arqueado dorsomedial.

Los cortes histológicos mostrados en la figura 16 muestran tanto la ausencia visual del NSQ así como también la ausencia de marcaje para VIP. Estas evidencias nos indican de manera directa que la lesión del NSQ está completa y que así la sincronización por luz no puede realizarse tanto por la remoción total del reloj biológico, como por la falta de secreción de VIP.

## 8.2.4 Análisis de la actividad locomotora

### 8.2.5 Los animales con L. de NSQ presentan desorganización en el ciclo L/O

En las Figuras 17 y 18 se muestran los resultados de la actividad locomotora de los animales con lesión total del NSQ.

Como se observa en las Figura 17 y 17-b, una vez realizada la remoción total del NSQ, los animales sufren una pérdida de la organización de la actividad locomotora, mostrándose activos tanto de día como de noche, sin distinción de señales de luz y de oscuridad, pues el 49.44% de la actividad se muestra en el periodo de luz y el 50.56% en el periodo de oscuridad.

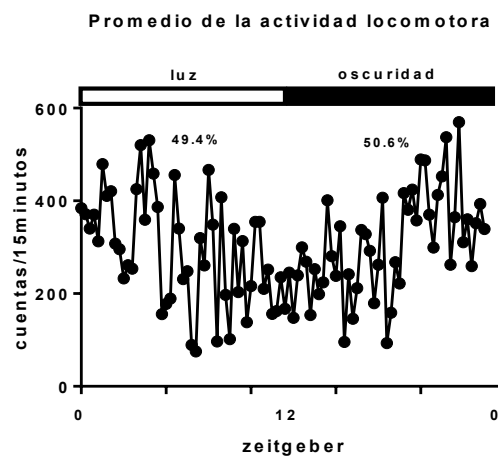
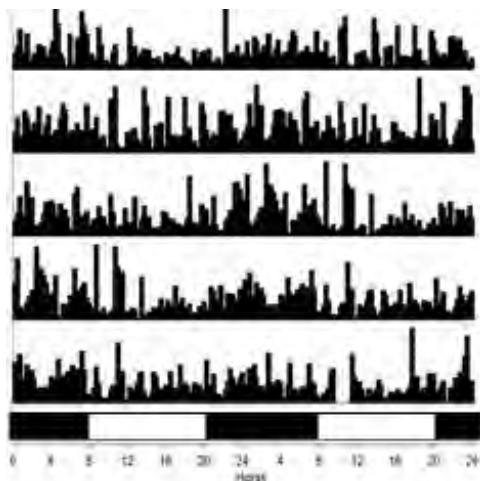
La Figura 18 muestra el periodograma del análisis por  $\chi^2$  correspondiente a los datos del actograma de la Figura 17.

Ciclo L/O 12:12  
N=3

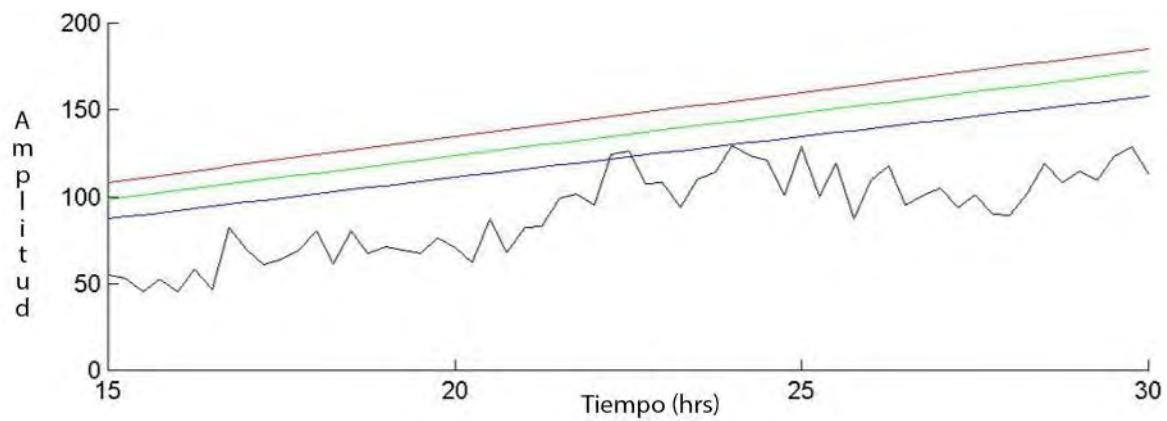
Promedio

A. Actograma

B. Cuantificación

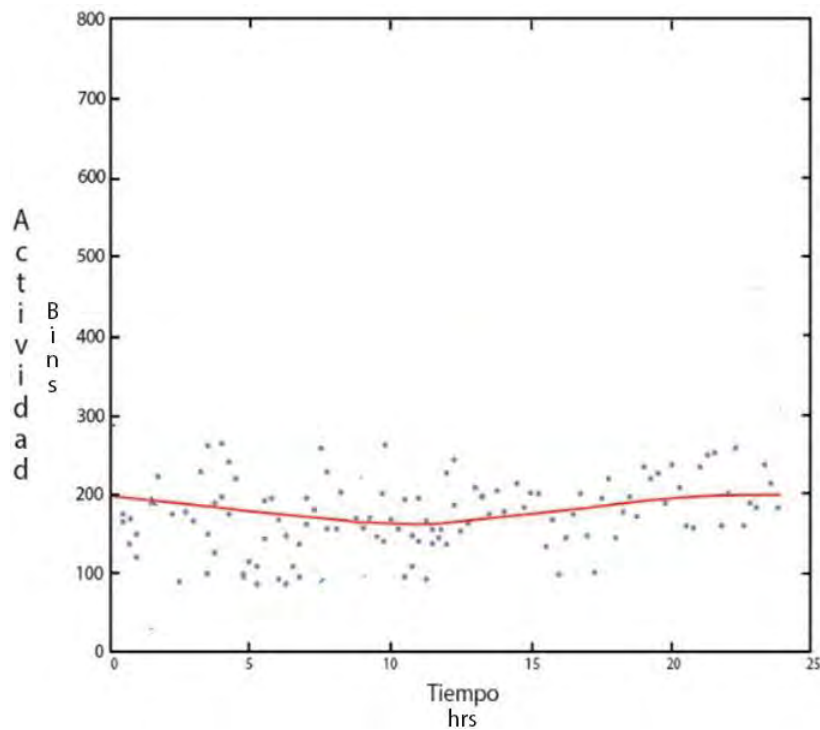


**Figura 17. Actograma y tendencia de los datos.** Actograma doble-plot que representa la desorganización de la actividad locomotora en un ciclo L-O posterior a la lesión del NSQ. Cada línea horizontal representa un día. La barra sin color representa la fase de luz. La barra negra la fase de oscuridad. b) Nótese la pérdida de la organización de la actividad locomotora al no existir una organización hacia el periodo de oscuridad. La barra sin color representa 12 horas luz. La barra negra representa 12 horas de oscuridad.



**Figura 18. Periodograma  $\chi^2$ .** Datos de actividad locomotora obtenidos del actograma de la figura anterior. Distribución de la longitud del periodo o periodograma  $\chi^2$ . El eje de las abscisas representa el tiempo en el que la longitud del periodo es medida, el cual va de 15 a 30 horas. El eje de las ordenadas mide la amplitud del ritmo, el cual es evaluado por el gráfico mediante los niveles de significancia denotadas por las líneas azul= 0.05%, línea verde= 0.01 y línea roja= 0.001%.

Un análisis cosinor figura 19, fue realizado. Se obtuvieron los siguientes datos: un mesor de 181.1, una amplitud de 18.1 y una acrofase de 22.52.



**Figura 19. Análisis cosinor.** Gráfica que muestra el comportamiento del grupo con lesión de núcleo supraquiasmático.

En la sección 8.5.1 se muestran a detalle los resultados del análisis estadístico donde se comparó por medio de una ANOVA de una vía, la amplitud con respecto a los demás grupos.

### **8.2.6 Los animales con L. de NSQ presentan una desorganización de la actividad locomotora en *Oscuridad constante*.**

La Figura 20 muestra la actividad locomotora en forma de actograma del grupo de animales lesionados del NSQ que estuvieron en condiciones de oscuridad. Como se puede observar en los animales con una lesión total del NSQ muestran una desorganización total de su actividad locomotora bajo condiciones de oscuridad constante. Esto ocurre por la falta de un reloj biológico que dicte los tiempos concretos en los que el animal debe organizar correctamente los tiempos de sueño y vigilia.

La Figura 20-b, muestra la cuantificación de la actividad registrada en el anterior actograma, mostrando que el 49.2% de la actividad se presenta de ct0 a ct12 correspondiente al periodo subjetivo de luz y el 50.2% de la actividad se presenta de ct 2 a ct0 correspondiente al periodo subjetivo de noche.

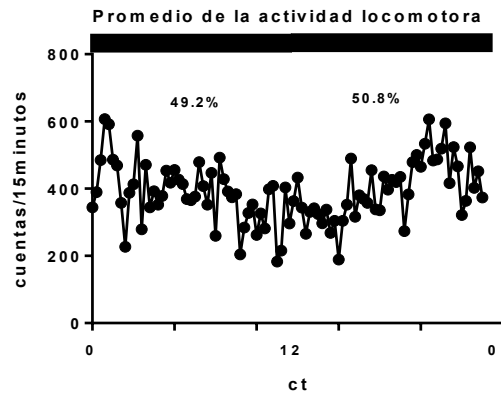
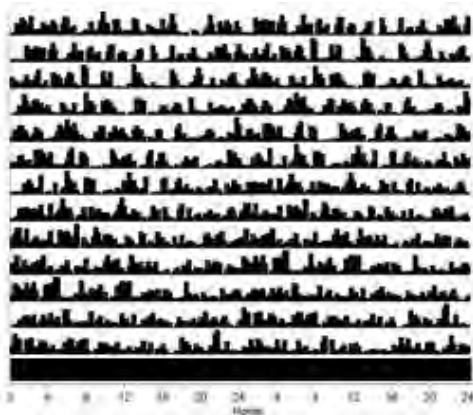
La Figura 21 muestra el periodograma por  $\chi^2$  correspondiente a los datos del actograma anterior. En él los datos son evaluados mediante el mesor y tres niveles de significancia con la finalidad de detectar la periodicidad que pudiera existir en la serie temporal de datos de actividad. Se observa un pico que sobre pasa la línea azul, lo cual indica que hay una  $p < 0.05$  de que no exista un patrón circadiano. Por otra parte, existe otro pico que sobrepasa la línea verde, lo cual indica que hay una  $p < 0.01$  de que no exista un patrón circadiano. Estos datos nos indican que este grupo de animales se encuentra desorganizado al no mostrar una periodicidad cada 24 horas sino 2 diferentes picos mostrados en diferentes horas del día, siendo esto lo contrario a un patrón circadiano.

Oscuridad constante

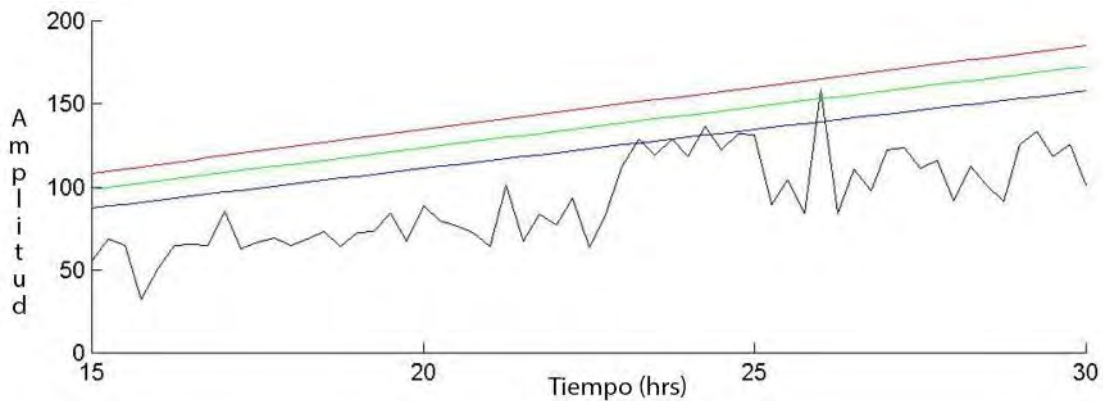
Promedio N=3

A. Actograma

B. Comportamiento de los datos.

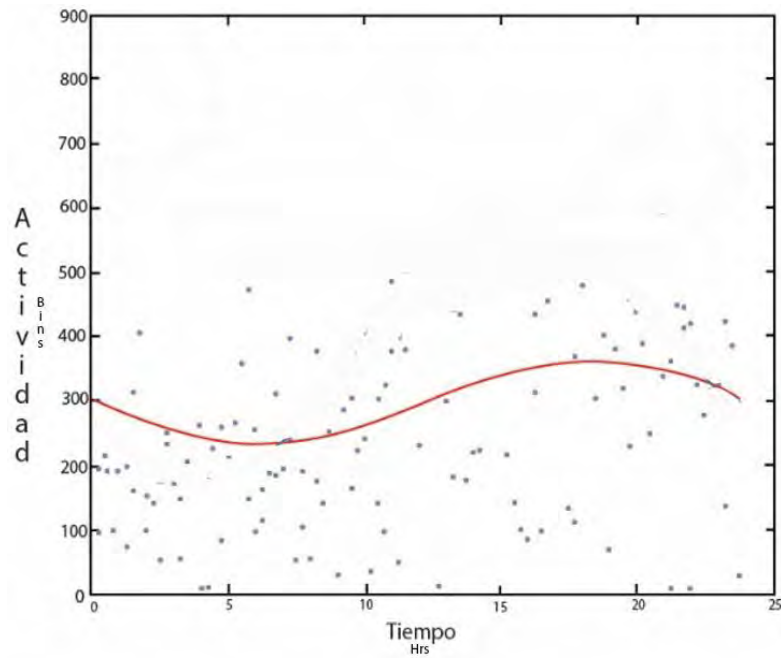


**Figura 20. Actograma y tendencia de los datos A)** Actograma que representa la desorganización de la actividad locomotora en condiciones de oscuridad constante posterior a la operación. . La barra negra representa la condición de oscuridad absoluta. **B)** Obsérvese que la desorganización en la actividad locomotora persiste, al igual que en la figura anterior en el ciclo luz-oscuridad.



**Figura 21. Periodograma  $\chi^2$ .** Datos de actividad locomotora obtenidos del actograma de la figura anterior-(A). Distribución de la longitud del periodo o periodograma  $\chi^2$ . El eje de las abscisas representa el tiempo en el que la longitud del periodo es medida, el cual va de 15 a 30 horas. El eje de las ordenadas mide la amplitud y la fuerza (robustness) del ritmo, el cual es evaluado por el gráfico mediante los niveles de significancia denotadas por las líneas azul= 0.05%, línea verde= 0.01 y línea roja= 0.001%.

Mediante el análisis cosinor (Figura 22) se obtuvieron los siguientes parámetros: un mesor de 391.2, una amplitud de 70.9 y una acrofase de 23.42.



**Figura 22. Análisis cosinor.** Gráfica que muestra el comportamiento del grupo con lesión de núcleo supraquiasmático en condiciones de oscuridad constante.

En la sección 8.5.1 se muestran a detalle los resultados del análisis estadístico que comparó las amplitudes de los grupos y su significancia.

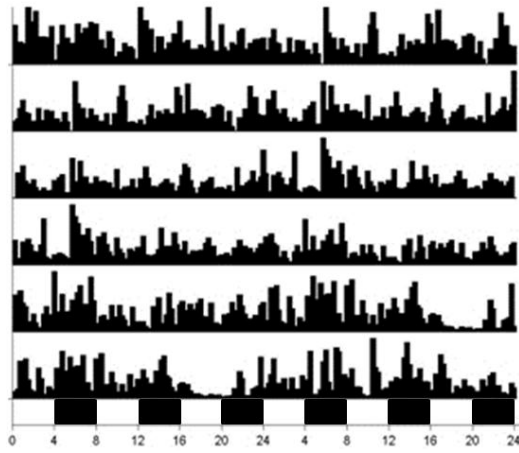
### 8.2.7 Los animales con L. de NSQ no presentan *masking* en CUD

En las Figuras 23 y 24 se muestran los resultados del ciclo ultradiano del grupo de animales con L.NSQ.

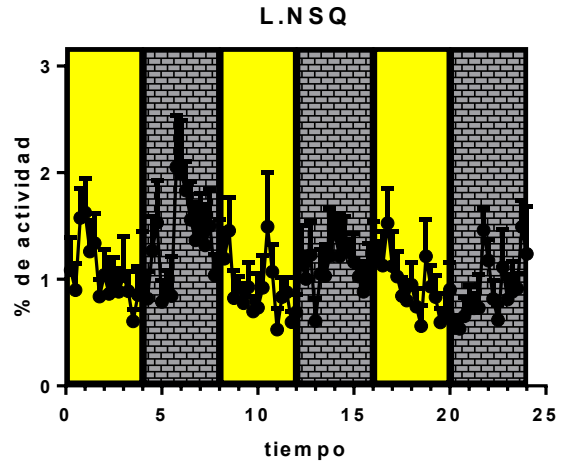
En el actograma de la Figura 23, puede observarse el comportamiento expresado por el presente grupo.

La Figura 24 muestra el periodograma en análisis por  $\chi^2$  correspondiente a los datos del actograma de la figura anterior.

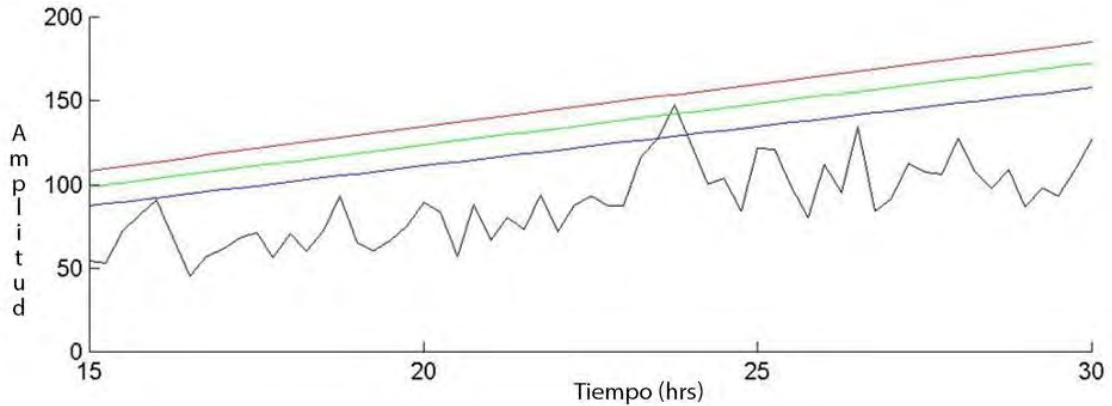
A. Actograma



B. Comportamiento de los datos



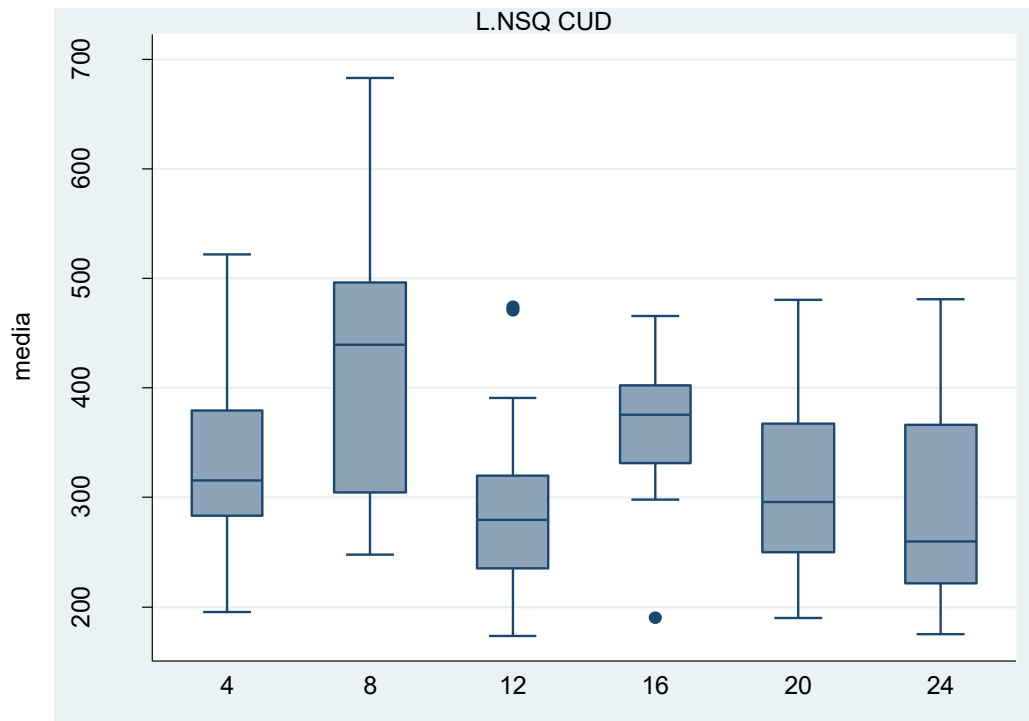
**Figura 23. Actograma y tendencia de los datos.** a) Representación de la actividad locomotora posterior a un ciclo ultradiano de 4 horas luz 4 horas oscuridad. Las barras blancas representan el periodo de luz, las negras el periodo de oscuridad. b) Gráfica que muestra el comportamiento bajo el fotoperiodo 4:4.



**Figura 24. Periodograma  $\chi^2$ .** Datos de actividad locomotora obtenidos del actograma de la figura anterior. Distribución de la longitud del periodo o periodograma  $\chi^2$ . El eje de las abscisas representa el tiempo en el que la longitud del periodo es medida, el cual va de 15 a 30 horas. El eje de las ordenadas mide la amplitud del ritmo, el cual es evaluado por el gráfico mediante los niveles de significancia denotadas por las líneas azul= 0.05%, línea verde= 0.01 y línea roja= 0.001%.

La figura 25 muestra la distribución del conjunto de datos obtenidos por medio de la representación gráfica de caja y bigotes.





**Figura 25. Gráfica de caja y bigotes.** Diagrama de caja y bigote que muestra la dispersión y simetría de los datos a lo largo de los 6 cambios de luz oscuridad del grupo L.NSQ. Los puntos fuera de la caja muestran casos extraordinarios fuera de la media.

Para evaluar si existen diferencias estadísticamente significativas en la expresión de la actividad locomotora cada 4 horas, se realizó una ANOVA de medidas repetidas. Los resultados se presentan en la sección 8.5.3.

Adicionalmente los datos fueron evaluados con el análisis Lomb-Scargle, para mayores detalles ver la sección 8.5.2.

## **8.3 Animales con L. posterior al NSQ**

---

A continuación, en las siguientes secciones, se mostrarán los cortes histológicos y posteriormente, se mostrará el análisis de la actividad.

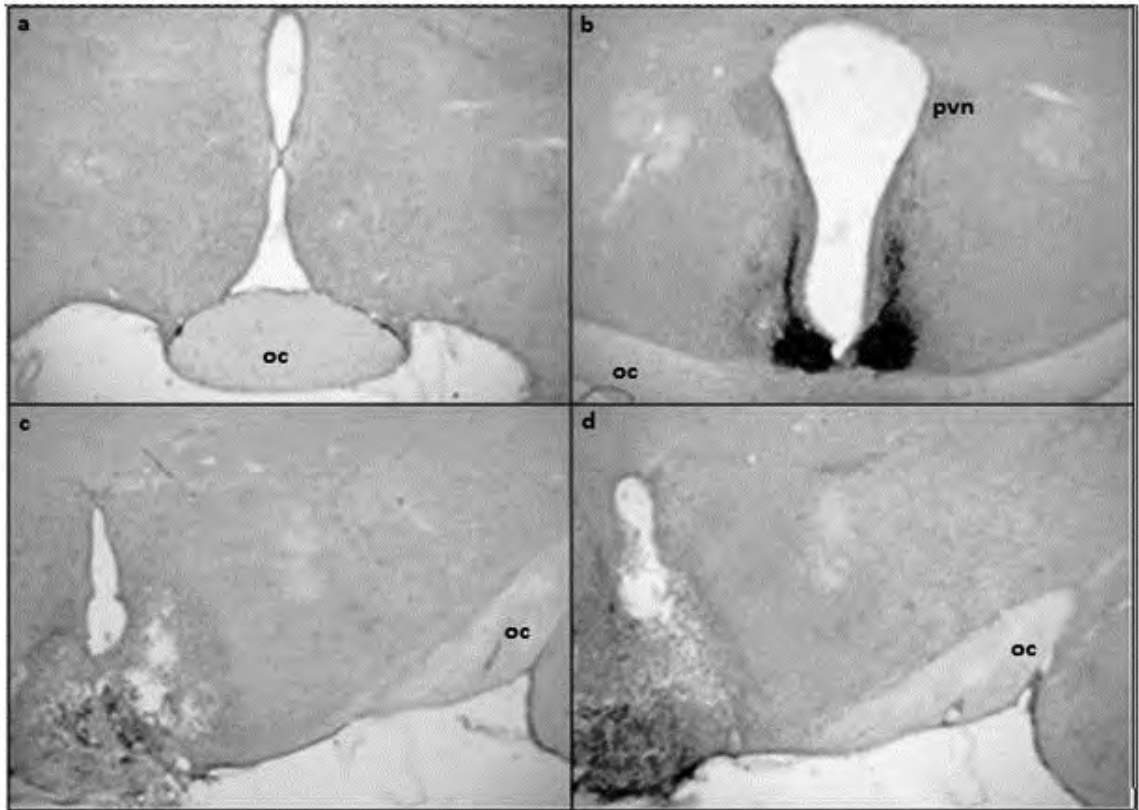
### **8.3.1 Cortes Histológicos e inmunohistoquímica de L. posterior al NSQ**

La Figura 26 muestra los cortes histológicos con el inmunomarcaje para VIP. La lesión afectó el área retroquiasmática (Rh) y la zona más rostral al Núcleo Arqueado (ARC).

## Lesión posterior

- Inmunohistoquímica para VIP

## Rostral



## Caudal

**Figura 26. Cortes inmunohistoquímicos.** Cortes coronales de una región significativa de la lesión posterior al NSQ. Se muestra la presencia de neuronas positivas de VIP, confirmando que la lesión no afectó el NSQ. Nótese la presencia del NSQ. a) OC-quiasma óptico, región frontal al NSQ. b) Se observa la tinción del NSQ, nótese la presencia total del NSQ. En c) y d) se observa la lesión realizada en el Rh- Área Retroquiasmática en la zona más caudal y que logra afectar al ARC. PVN-núcleo paraventricular.

La Figura 26 muestra de manera representativa al grupo de animales con L. posterior. En ella puede observarse la presencia total del NSQ, y que la lesión fue realizada en una región posterior al núcleo supraquiasmático

### **8.3.2 Análisis de la actividad locomotora**

A continuación en las siguientes secciones se presentan los resultados del comportamiento de la actividad locomotora de los animales con L. posterior al NSQ, ante los tres tipos distintos de fotoperiodos inducidos.

### **8.3.3 Los animales con L. posterior presentan una organización de la actividad locomotora en L/O**

A continuación en las Figuras 27 y 28, se muestran los resultados del presente grupo, es importante recordar que este grupo de animales presentaron una desorganización de la actividad locomotora en condiciones de oscuridad constante a pesar de mantener su NSQ intacto.

Como se observa en la Figura 27, el grupo de animales presentaron sincronización del ritmo de actividad locomotora ante el ciclo de luz/oscuridad. La Figura 27-b muestra el porcentaje de actividad promedio por cada periodo de luz y oscuridad, siendo del 34% durante las 12 horas de luz y del 66% de actividad durante el periodo de 12 horas de oscuridad.

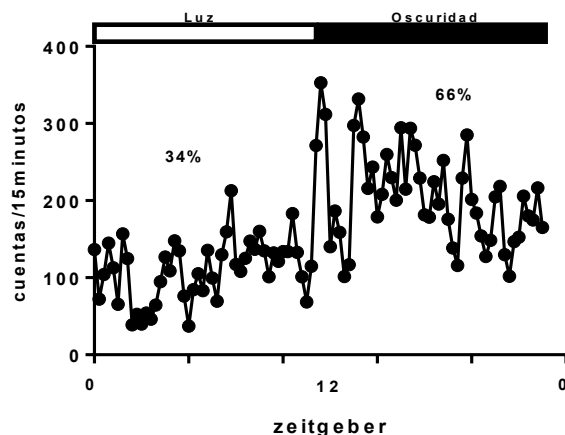
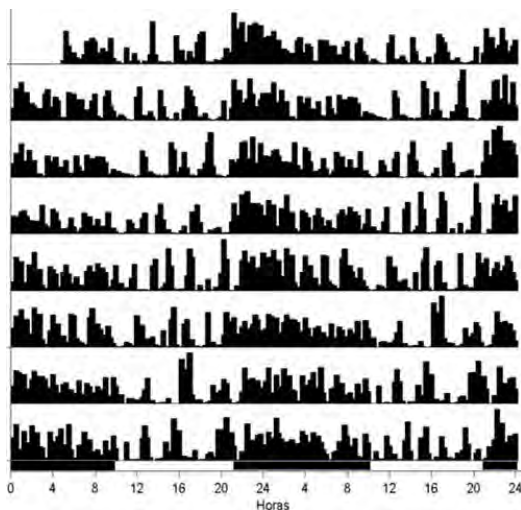
La Figura 28 muestra el periodograma por  $\chi^2$  correspondiente a los datos del actograma anterior. En él, se muestra que existe un ritmo de actividad locomotora con un periodo cada 24 horas el cual es estadísticamente significativo.

Ciclo L/O 12:12

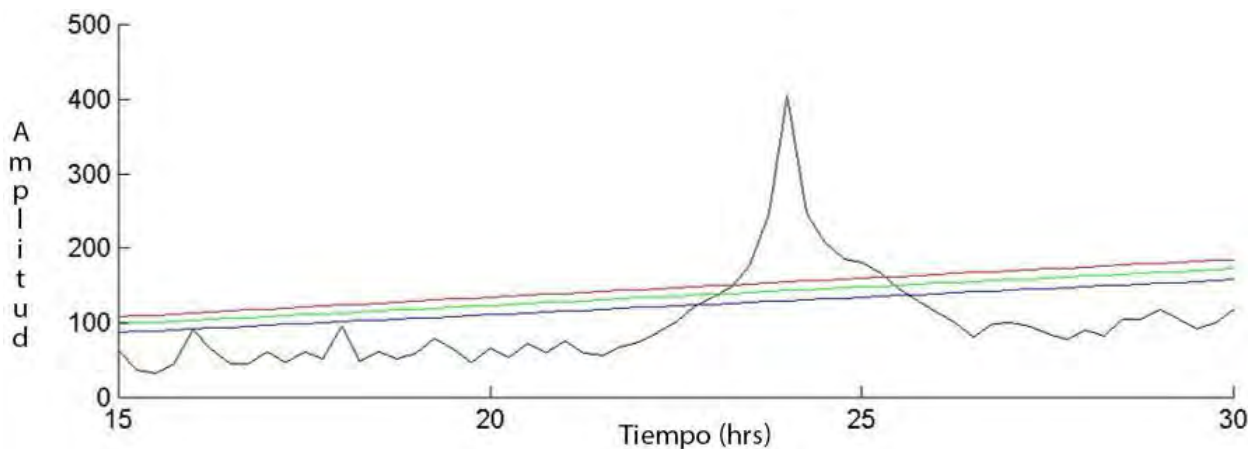
Promedio N=3

A. Actograma

B. Comportamiento de los datos

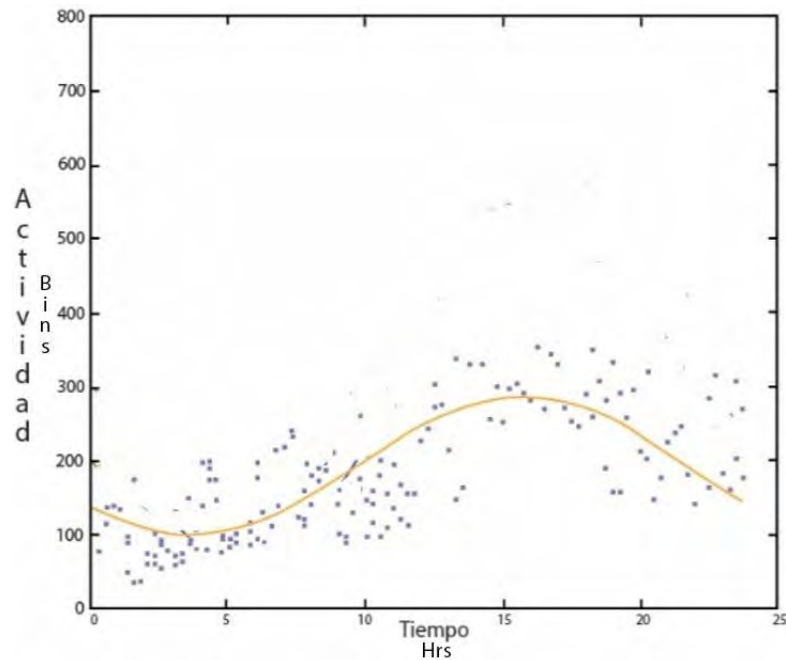


**Figura 27. Actograma y tendencia de los datos.** Actograma doble-plot que muestra un patrón de organización de la actividad locomotora en un ciclo L/O una vez realizada la lesión posterior al NSQ. Cada línea horizontal representa un día. La barra sin color representa la fase de luz. La barra negra representa la fase de oscuridad. b) Nótese la tendencia marcada en un patrón de organización de la actividad locomotora, la cual se acumula hacia el periodo de oscuridad. La barra sin color representa 12 horas luz. La barra negra representa 12 horas de oscuridad.



**Figura 28. Periodograma  $\chi^2$ .** Datos de actividad locomotora obtenidos del actograma de la figura anterior. Distribución de la longitud del periodo o periodograma  $\chi^2$ . El eje de las abscisas representa el tiempo en el que la longitud del periodo es medida, el cual va de 15 a 30 horas. El eje de las ordenadas mide la amplitud del ritmo, el cual es evaluado por el gráfico mediante los niveles de significancia denotadas por las líneas azul= 0.05%, línea verde= 0.01 y línea roja= 0.001%.

Un análisis cosinor, figura 29, fue realizado para evaluar los parámetros del ritmo biológico. Se obtuvieron los siguientes datos: un mesor de 328.6, una amplitud de 272.9 y una acrofase de 17.55. La amplitud fue contrastada por una ANOVA respecto a las demás amplitudes de los grupos experimentales.



**Figura 29. Análisis cosinor.** Gráfica que muestra el comportamiento sinusoidal del grupo con lesión posterior, en condiciones de luz/oscuridad.

Para mayores detalles consultar la sección 8.5.1.

### 8.3.4 Los animales con L. posterior presentan una desorganización de la actividad locomotora en condiciones de *Oscuridad constante*.

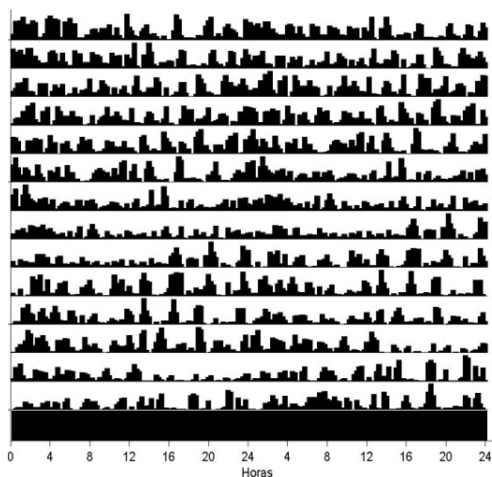
La Figura 30 muestra el actograma de actividad locomotora. La Figura 30-b muestra la tendencia de los datos, en ella se logra observar el 47% de la actividad en el periodo de CT0 a CT12, y el 53% de la actividad de CT12 a CT0, lo cual indica que la actividad de estos organismos se encuentra totalmente desorganizada, pues no existe un patrón circadiano. La Figura 31 muestra el periodograma  $\chi^2$  correspondiente a la actividad de bajo condiciones constantes de oscuridad. En él se observa la falta un patrón circadiano significativo de actividad

locomotora con una  $p < 0.05$  de que éste se presente, corroborándose así que estos animales se encuentran arrítmicos.

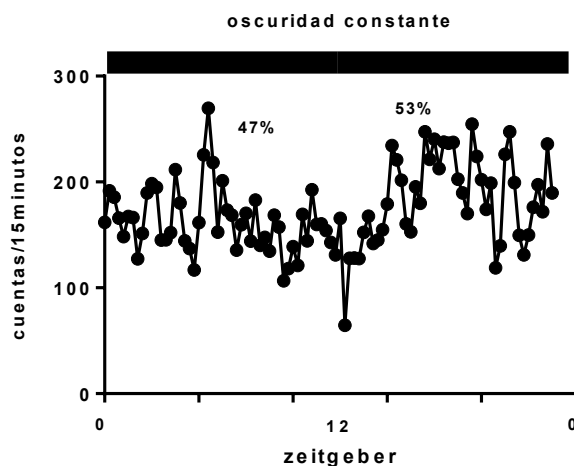
Oscuridad constante

Promedio N=3

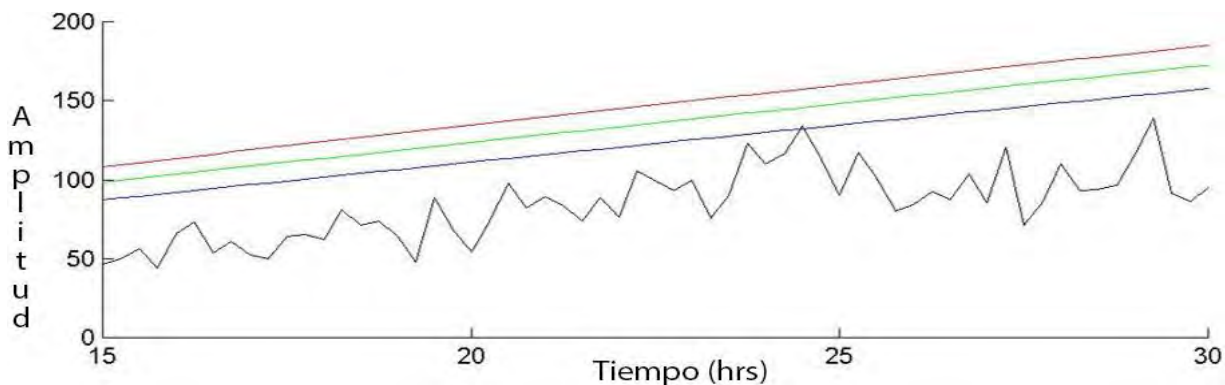
A. Actograma



B. Comportamiento de los datos



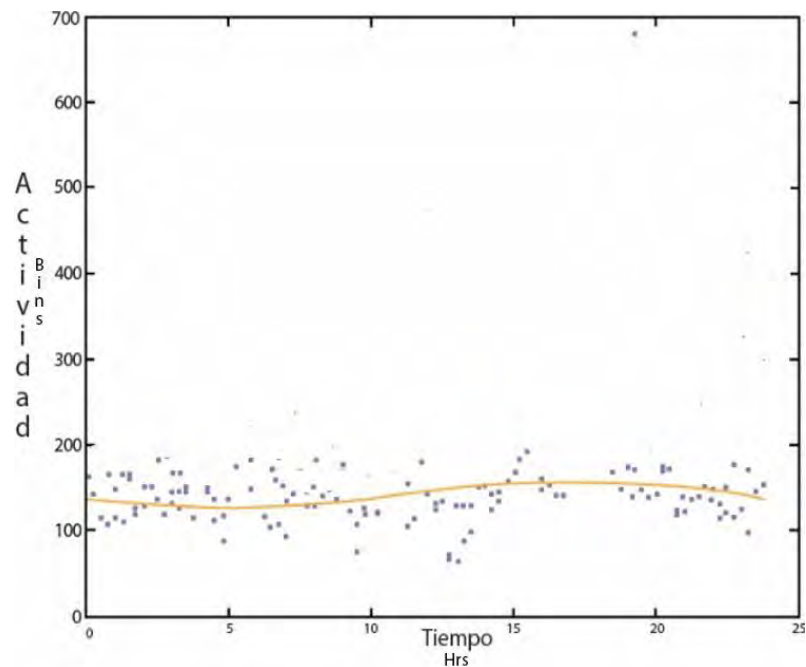
**Figura 30. Actograma y tendencia de los datos.** A) Actograma que representa la actividad locomotora en condiciones de oscuridad constante. Nótese la ausencia de corrimiento libre, característico de los animales con NSQ intacto. B) Cuantificación de la actividad locomotora del actograma anterior. Nótese la cantidad de actividad en porcentaje que va de ct 0 a ct 12 y la de ct 12 a ct0.



**Figura 31. Periodograma.** Datos de actividad locomotora obtenidos del actograma de la figura anterior-(A). Distribución de la longitud del periodo o periodograma  $\chi^2$ . El eje de las abscisas

representa el tiempo en el que la longitud del periodo es medida, el cual va de 15 a 30 horas. El eje de las ordenadas mide la amplitud y la fuerza (robustness) del ritmo, el cual es evaluado por el gráfico mediante los niveles de significancia denotados por las líneas azul= 0.05%, línea verde= 0.01 y línea roja= 0.001%.

Un análisis cosinor fue realizado, figura 32 obteniendo los siguientes datos: un mesor de 173.1, una amplitud de 23.1y una acrofase de 20.67. La amplitud fue evaluada por ANOVA de una vía con respecto a las demás amplitudes de los demás grupos experimentales. Los resultados se muestran en la sección.



**Figura 32. Análisis cosinor.** Comportamiento de los datos evaluado por el análisis cosinor del grupo L.posterior en condiciones de oscuridad constante.



### 8.3.5 Los animales con L. posterior presentan *masking* bajo el CUD

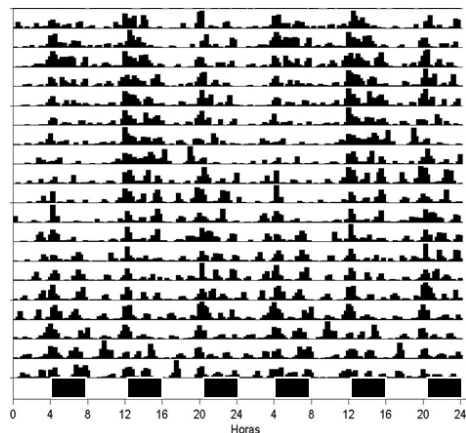
A continuación se muestran los resultados del grupo de animales con lesión posterior al NSQ bajo un ciclo ultradiano.

La Figura 33-a, muestra la expresión de la actividad locomotora ante los periodos ultradianos de luz/oscuridad. En él se logra observar la disminución de la actividad locomotora en los momentos donde la luz estaba presente (color amarillo) en comparación de los momento de oscuridad (color gris) donde se logra observar un disparo de la actividad.

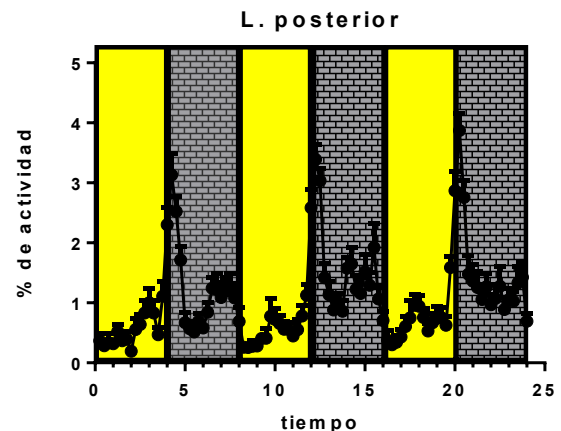
La Figura 34, muestra el periodograma en análisis por  $\chi^2$  correspondiente a los datos del actograma de la figura. Se puede observar dos periodos significativos a las 16 y 24 horas, momentos en los que corresponden periodos de oscuridad.

N=3

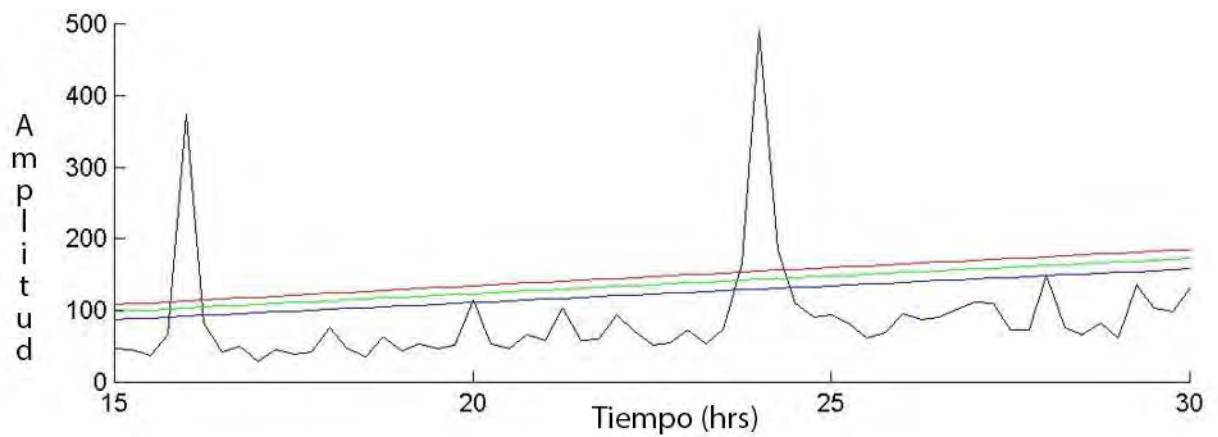
A. Actograma



B. Comportamiento de los datos

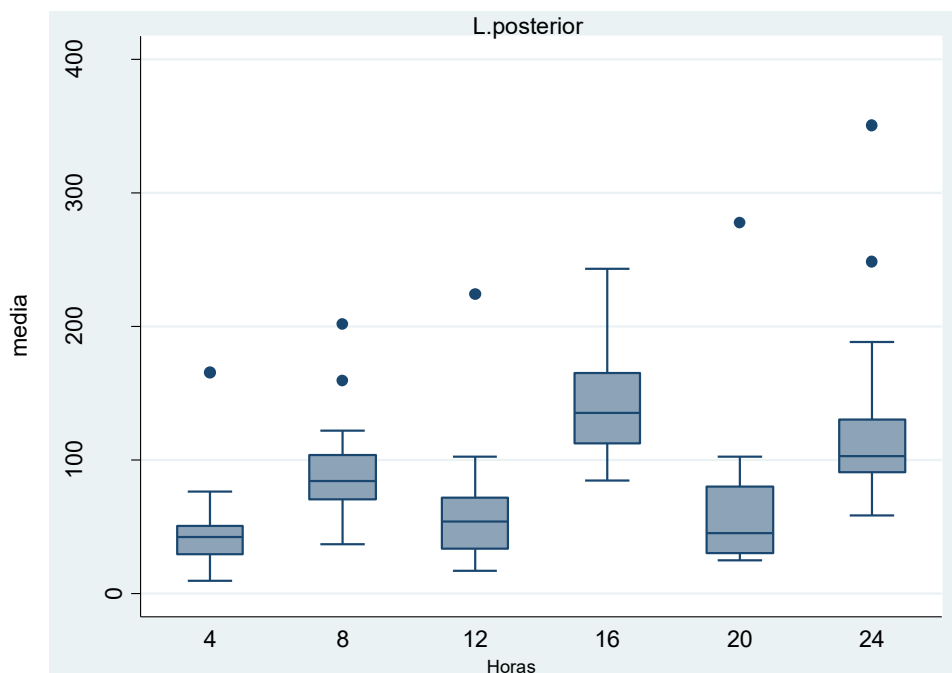


**Figura 33. Actograma y tendencia de los datos.** Representación de la actividad locomotora en condiciones de un CUD. Obsérvese que los animales muestran una respuesta por los periodos cortos de luz y por los periodos cortos de oscuridad. B) Comportamiento de los datos. Las barras blancas representan los periodos de luz (4hrs/una). Las barras negras representan los periodos de oscuridad (4hrs/una). Los datos se encuentran normalizados.



**Figura 34. Periodograma  $\chi^2$ .** Datos de actividad locomotora obtenidos del actograma de la figura anterior. Distribución de la longitud del periodo o periodograma  $\chi^2$ . El eje de las abscisas representa el tiempo en el que la longitud del periodo es medida, el cual va de 15 a 30 horas. El eje de las ordenadas mide la amplitud del ritmo, el cual es evaluado por el gráfico mediante los niveles de significancia denotadas por las líneas azul= 0.05%, línea verde= 0.01 y línea roja= 0.001%.

La Figura 35, muestra la distribución del conjunto de datos obtenidos, por medio de la representación gráfica de caja y bigotes.



**Figura 35. Gráfica de caja y bigotes.** Diagrama de caja y bigote que muestra la dispersión y simetría de los datos a lo largo de los 6 cambios de luz oscuridad del grupo L. posterior. Los puntos fuera de la caja muestran casos extraordinarios fuera de la media.

Para evaluar si existen diferencias estadísticamente significativas en la expresión de la actividad cada 4 horas, se realizó una ANOVA de medidas repetidas. Los resultados se muestran en la sección 8.5.3.

Adicionalmente los datos fueron evaluados con el análisis Lomb-scargle, para mayores detalles, ver la sección 8.5.2.

## 8.4 Animales con L. parcial del NSQ

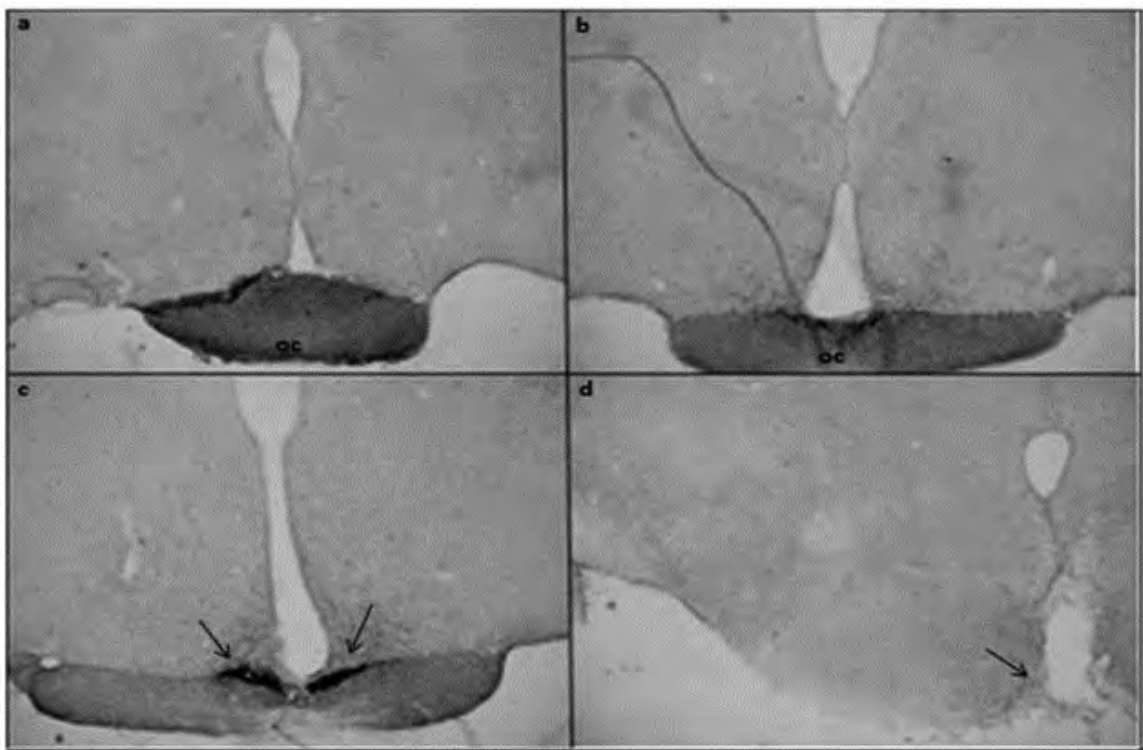
A continuación se presenta el grupo de animales con L. parcial del NSQ. Este tipo de lesión sólo afectó parcialmente al reloj biológico dejando remanentes los cuales fueron precisados con las inmnohistoquímicas correspondientes.

### 8.4.1 Inmunohistoquímica para CTB.

#### L. parcial de NSQ.

- Inmunohistoquímica para CTB

Rostral



Caudal

**Figura 36. Histología.** Cortes coronales de una región significativa de la lesión parcial al NSQ. Se muestra la tinción de neuronas positivas a CTB, confirmando la presencia de remanentes de NSQ. a) y b) OC parte frontal al NSQ. c) Las flechas muestran la presencia de NSQ. d) afectación de la lesión a una región posterior al NSQ. OC-quiasma óptico.

Como puede observarse en la figura anterior, la tinción para CTB revela la presencia de aferencias remanentes hacia el NSQ que no fueron eliminados durante la realización de la

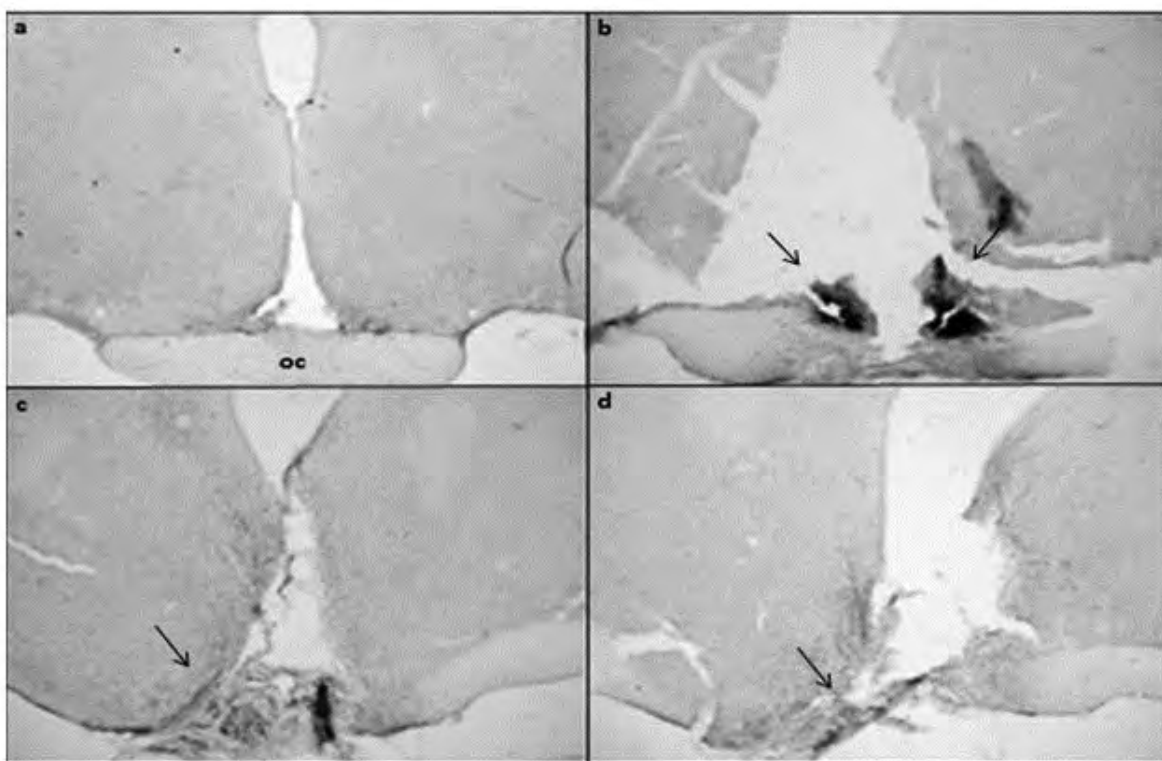
lesión. Las figuras se muestran en orden antero-posterior que van de a), hasta llegar a la figura d); que es la región más caudal. La Figura 36-c claramente muestra que el remanente de NSQ corresponde a la zona ventral, y que recibía directamente las señales de luz.

#### 8.4.2 Inmunohistoquímica para VIP

La Figura 37, muestra los cortes histológicos y la inmunohistoquímica para VIP, donde se puede observar la presencia de remanentes de NSQ.

- Inmunohistoquímica para VIP

**Rostral**



**Caudal**

**Figura 37. Histología.** Cortes coronales de una región significativa de la lesión parcial del NSQ. Se muestra la presencia de neuronas positivas de VIP, confirmando que la lesión no está completa: a) Oc-quiasma óptico, región frontal al NSQ. b) Las flechas muestran la presencia de remanentes de NSQ. En c) y d) las flechas muestran la lesión realizada en el Rh- Área Retroquiasmática.

Las Figuras se muestran en orden antero-posterior que van de a), hasta llegar a la Figura d); que es la región más caudal. Como puede observarse en la Figura 37, la tinción revela la

presencia del NSQ en b). En c) y d) se muestran las regiones más significativas que la lesión afectó, siendo esta el Rch.

### **8.4.3 Análisis de la actividad locomotora**

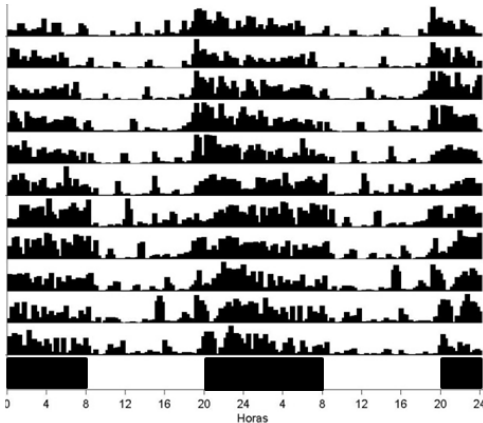
A continuación se presentan los resultados del comportamiento de la actividad locomotora de los animales con L. parcial al NSQ, ante los tres tipos distintos de fotoperiodos inducidos.

### **8.4.4 Los animales con L. parcial presentan una organización de la actividad locomotora en condiciones *L/O*.**

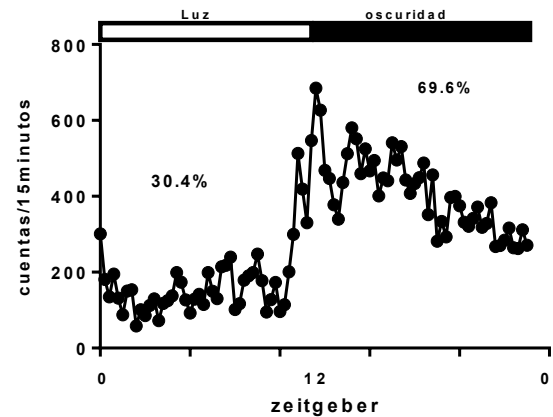
La Figura 38a muestra el actograma de la respuesta de la actividad locomotora bajo condiciones de luz/oscuridad. En él se puede apreciar la organización de la actividad locomotora durante el ciclo de 24 horas: 12 horas luz/ 12 horas oscuridad. En la Figura 38 b, se puede observar la gráfica con los porcentajes promedio expresados, 30.4% en las 12 horas de luz y el 69.9% en las 12 horas de oscuridad.

La Figura 39, muestra el periodograma en análisis por  $\chi^2$  correspondiente a los datos del actograma anterior. En él se puede observar un pico de actividad con un periodo de 24 horas estadísticamente significativo.

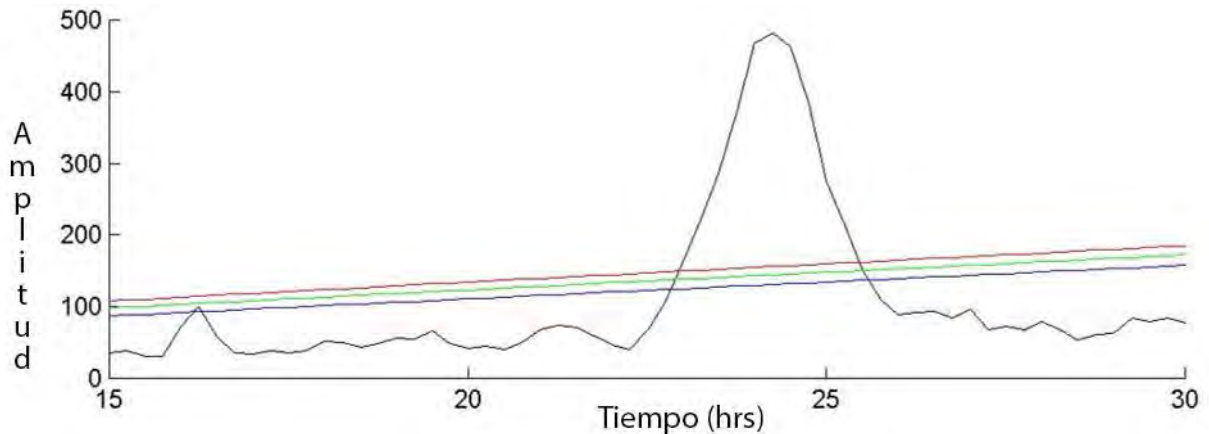
## A. Actograma



## B. Comportamiento de los datos

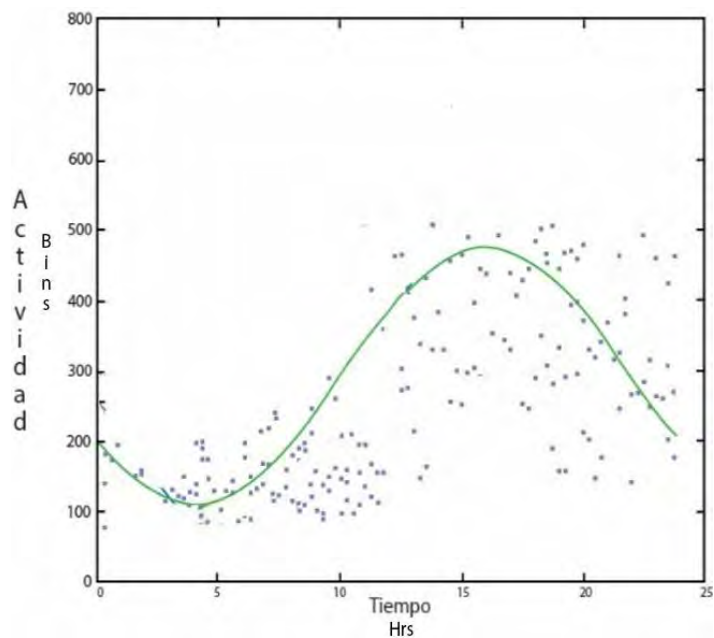


**Figura 38. Actogramas y tendencia de los datos.** Actograma doble-plot que muestra un patrón de organización de la actividad locomotora en un ciclo L-O posterior a una lesión parcial del NSQ. Cada línea horizontal representa un día. La barra sin color representa la fase de luz. La barra negra representa la fase de oscuridad. b) Nótese la tendencia marcada en un patrón de organización de la actividad locomotora, la cual se acumula hacia el periodo de oscuridad. La barra sin color representa 12 horas luz. La barra negra representa 12 horas de oscuridad.



**Figura 39. Periodograma  $\chi^2$ .** Datos de actividad locomotora obtenidos del actograma de la figura anterior. Distribución de la longitud del periodo o periodograma  $\chi^2$ . El eje de las abscisas representa el tiempo en el que la longitud del periodo es medida, el cual va de 15 a 30 horas. El eje de las ordenadas mide la amplitud del ritmo, el cual es evaluado por el gráfico mediante los niveles de significancia denotados por las líneas azul= 0.05%, línea verde= 0.01 y línea roja= 0.001%.

Un análisis cosinor, figura 40, fue realizado, obteniendo los siguientes parámetros: un mesor de 292.8, una amplitud de 186.1, y una acrofase de 15.97.



**Figura 40. Análisis cosinor.** Gráfica que muestra el comportamiento sinusoidal de los datos

Un análisis de varianza de una vía fue realizado evaluando la amplitud obtenida por el análisis de cosinor, respecto a las amplitudes de los demás grupos. Consultar la sección 8.5.1.

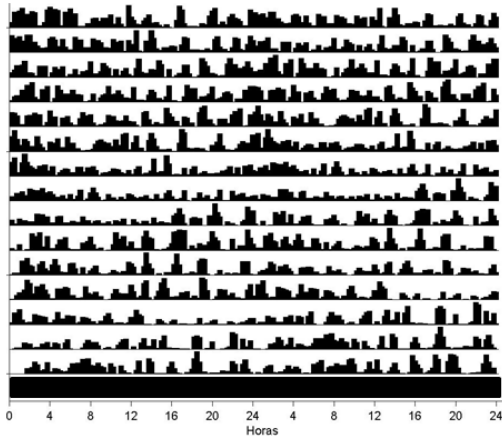
#### 8.4.5 Los animales con Lesión parcial presentan una desorganización de la actividad locomotora en *Oscuridad constante*.

La Figura 41 muestra el actograma del grupo de animales con L. parcial. Como se observa la actividad locomotora se encuentra totalmente desorganizada desde el inicio hasta el final de la ausencia de luz. La cuantificación de este actograma (Figura 41-b) muestra que el 48% de la actividad locomotora va de ct0 a ct12, y que el 52% de la actividad se presenta de ct12 a ct0.

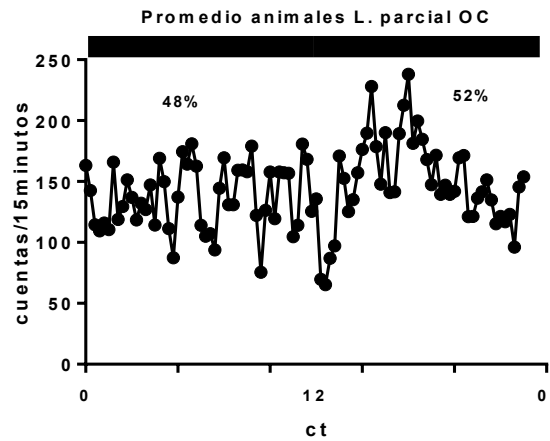
En la Figura 42 se muestra el periodograma  $\chi^2$  correspondiente a los datos del actograma anterior. Se puede observar que hay un pico que sobre pasa la línea azul 0.05% de significancia.



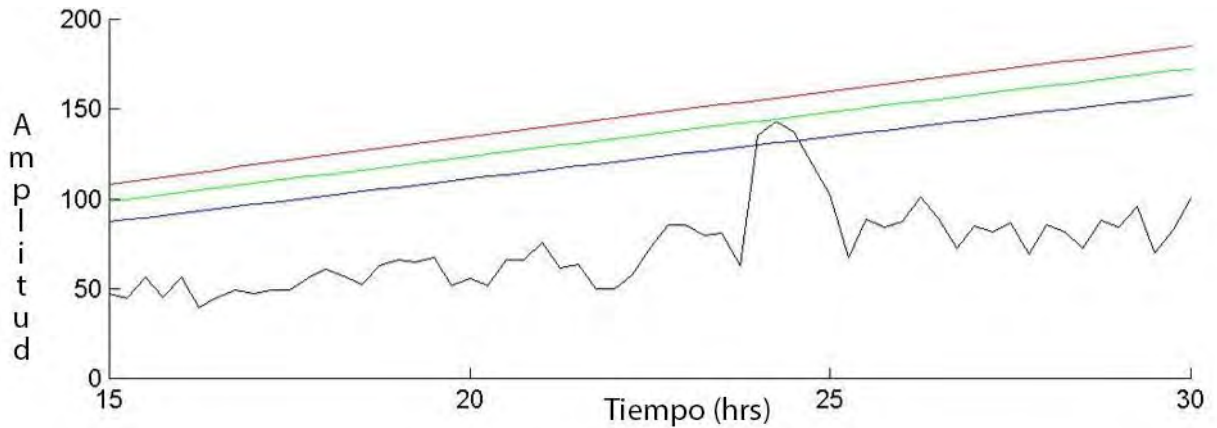
A. Actograma



B. Tendencia de los datos

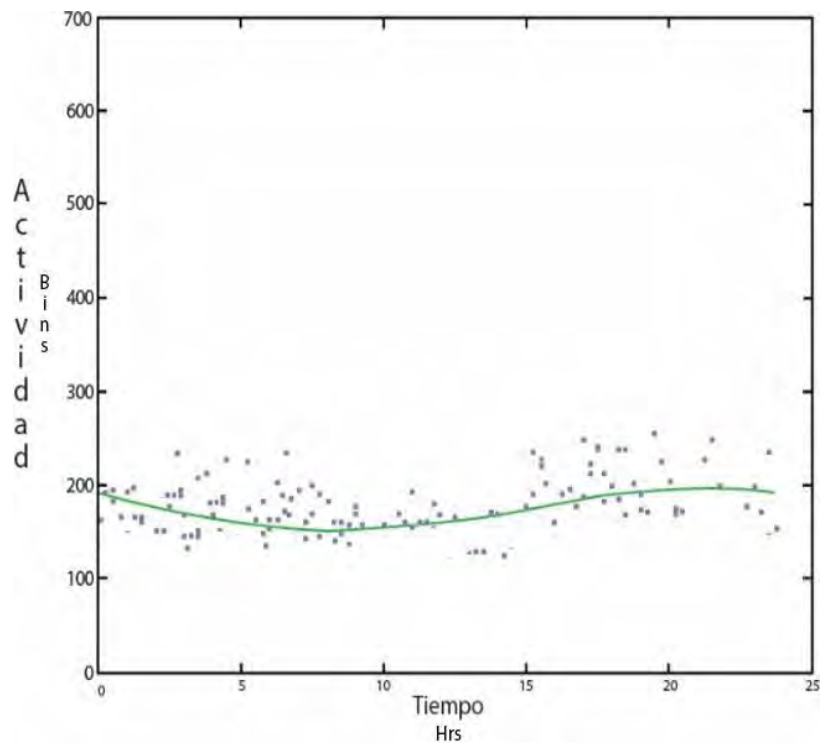


**Figura 41. Actogramas y tendencia de los datos** A) Actograma que representa la actividad locomotora bajo condiciones de oscuridad constante. Nótese la ausencia de corrimiento libre, característico de los animales con NSQ intacto. B) Cuantificación de la actividad locomotora del actograma anterior. Nótese la cantidad de actividad en porcentaje que va de ct 0 a ct 12 y la de ct 12 a ct. Ct-tiempo circadiano.



**Figura 42. Periodograma  $\chi^2$ .** Datos de actividad locomotora obtenidos del actograma de la figura anterior. Distribución de la longitud del periodo o periodograma  $\chi^2$ . El eje de las abscisas representa el tiempo en el que la longitud del periodo es medida, el cual va de 15 a 30 horas. El eje de las ordenadas mide la amplitud del ritmo, el cuál es evaluado por el gráfico mediante los niveles de significancia denotadas por las líneas azul= 0.05%, línea verde= 0.01 y línea roja= 0.001%.

Un análisis cosinor figura 43, fue realizado obteniendo los siguientes parámetros: un mesor de 142.9, una amplitud de 23.1 y una acrofase de 20.67.



**Figura 43. Análisis cosinor.** Grafica que muestra el comportamiento sinusoidal del grupo con lesión parcial del núcleo supraquiasmático..

Un análisis de varianza de una vía fue realizado evaluando la amplitud obtenida, respecto a las amplitudes de los demás grupos. Consultar la sección 8.5.1.

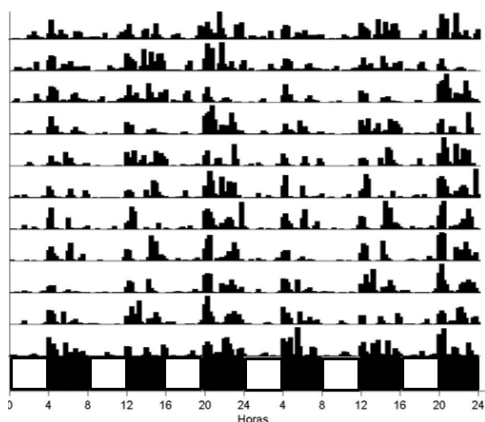
#### 8.4.6 Los animales con lesión parcial presentan *masking* bajo el CUD

La Figura 44-a, se muestra el actograma, en el cual se observa una respuesta por los periodos cortos de luz y los periodos cortos de oscuridad del ciclo ultradiano, inhibiendo su actividad durante las 4 horas de luz correspondientes que fueron inducidas, e igualmente respondieron ante los periodos de 4 horas de oscuridad siguientes incrementando su actividad, así durante las 24 horas durante 10 días. Lo mismo puede verse en la Figura 44-b, donde la gráfica muestra el incremento de la actividad (barras grises) y un decremento de la actividad (barras amarillas).

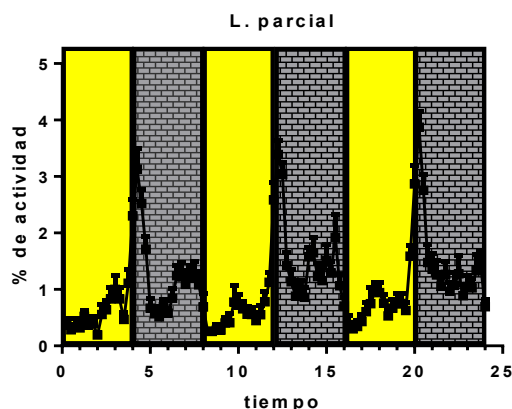
La Figura 45 muestra el periodograma en análisis  $\chi^2$  correspondiente a los datos de la figura. Se puede observar dos picos periódicos significativos a las 16 horas y a las 24 horas, correspondientes a dos de los momentos en donde los periodos de oscuridad habían sido inducidos, lo que corresponde a un incremento de la actividad locomotora.

N=3

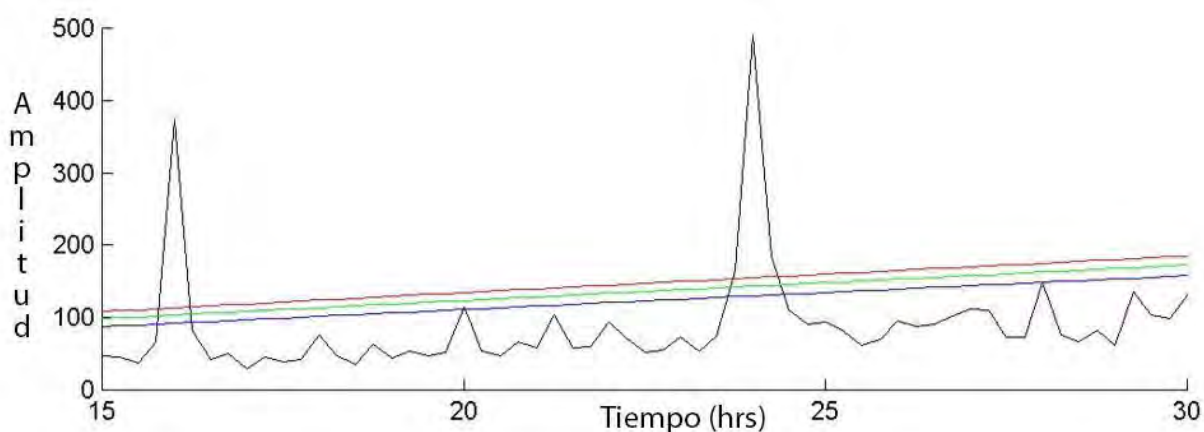
A. Actograma



B. Comportamiento de los datos

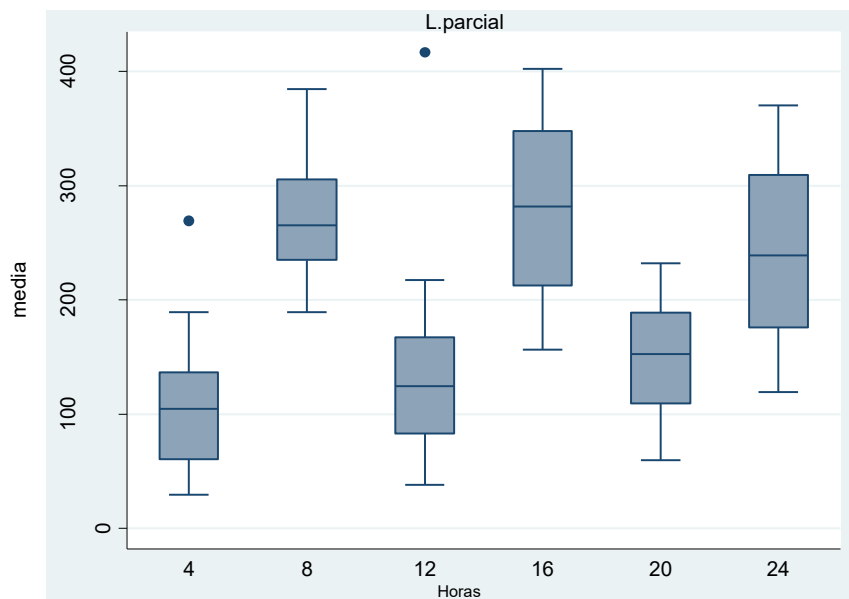


**Figura 44. Actograma y tendencia de los datos.** Actograma que representa la actividad locomotora en condiciones de un *CUD*. Obsérvese que los animales muestran una respuesta muy clara por los periodos cortos de luz y por los periodos cortos de oscuridad. Las barras blancas representan los periodos de luz (4hrs/una). Las barras negras representan los periodos de oscuridad (4 horas/una). B) Comportamiento de los datos. Las barras blancas representan los periodos de luz (4 horas/una). Los datos se encuentran normalizados.



**Figura 45. Periodograma  $\chi^2$ .** Datos de actividad locomotora obtenidos del actograma de la figura anterior. Distribución de la longitud del periodo o periodograma  $\chi^2$ . El eje de las abscisas representa el tiempo en el que la longitud del periodo es medida, el cual va de 15 a 30 horas. El eje de las ordenadas mide la amplitud del ritmo, el cual es evaluado por el gráfico mediante los niveles de significancia denotadas por las líneas azul= 0.05%, línea verde= 0.01 y línea roja= 0.001%.

La figura 46, muestra la distribución del conjunto de datos obtenidos por medio de la representación gráfica de caja y bigotes



**Figura 46. Gráfica de caja y bigotes.** Diagrama de caja y bigote que muestra la dispersión y simetría de los datos a lo largo de los 6 cambios de luz oscuridad del grupo Lesión parcial. Los puntos fuera de la caja muestran casos extraordinarios fuera de la media.

Para evaluar si existen diferencias estadísticamente significativas en la expresión de la actividad cada 4 horas, se realizó un ANOVA de medidas repetidas. Los resultados se muestran en la sección 8.5.3.

Adicionalmente, los datos fueron evaluados mediante el análisis Lomb scargle. Consultar la sección 8.5.2.

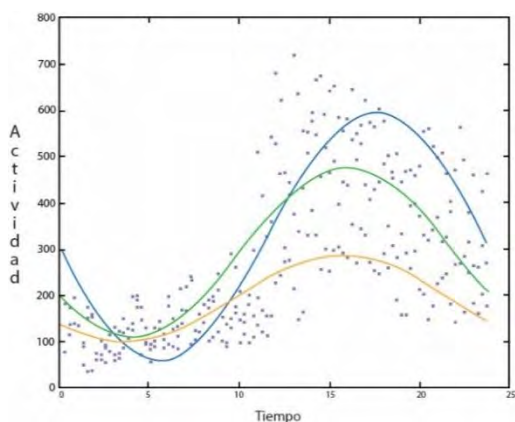
## 8.5 Análisis estadísticos

### 8.5.1 Análisis Cosinor

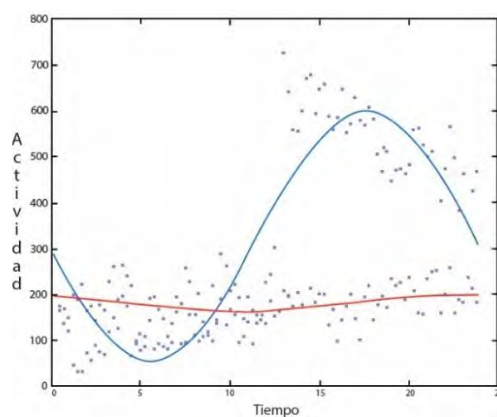
#### Análisis Cosinor para el ciclo L/O

A continuación se muestran los resultados obtenidos mediante el análisis de cosinor, haciendo una comparación entre los grupos experimentales vs. el grupo intacto, en condiciones de L/O, Figura 47.

a) *Intactos vs L.posterior vs L.parcial*



b) *Intactos vs L.NSQ*



**Figura 47. Gráficos comparativos. A)** Gráfica que muestra el comportamiento sinusoidal de los datos: Azul-Intactos. Verde-Lesión parcial. Anaranjado-Lesión posterior. **B)** Se muestra el contraste del comportamiento sinusoidal del grupo intacto-azul con respecto al del grupo L.NSQ-rojo.

Los parámetros obtenidos mediante este análisis, mesor, amplitud y acrofase se muestran en la Tabla 1. Un Análisis de varianza fue realizado, comparando las amplitudes obtenidas. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente sección.

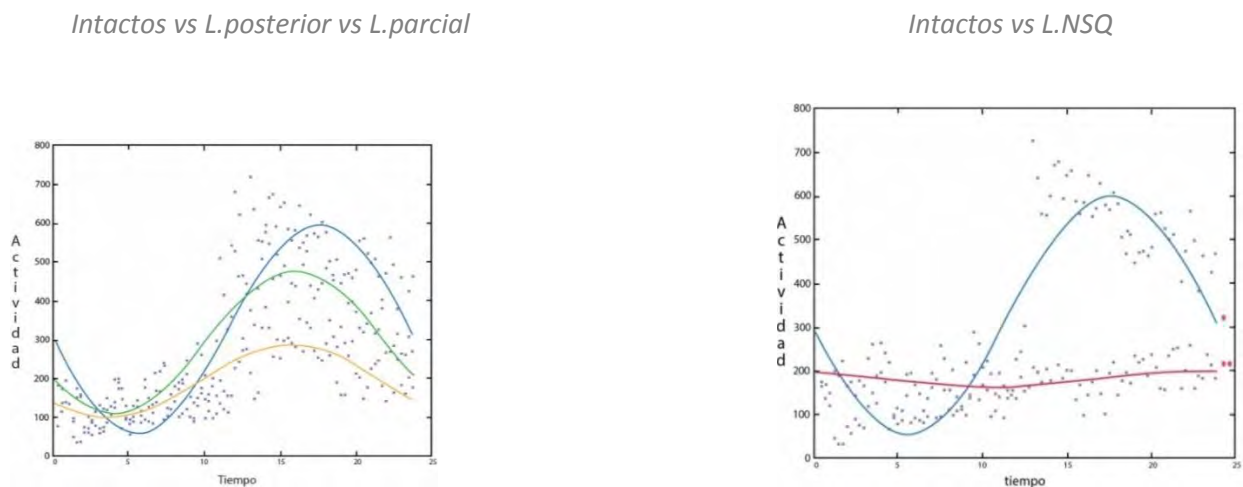
Intactos	Mesor: 328.6	Amplitud: 272.9	Acrofase: 17.55
L. NSQ	Mesor: 181.1	Amplitud: 18.1	Acrofase: 22.52
L.posterior	Mesor: 193.4	Amplitud: 95.1	Acrofase: 15.67
L. parcial	Mesor: 292.8	Amplitud: 186.1	Acrofase: 15.97

**Tabla 1. Parámetros rítmicos.** Se muestran los datos obtenidos por el análisis cosinor: Mesor, amplitud y acrofase,

## ANOVA de una vía ciclo L/O

A continuación se muestran los resultados obtenidos evaluando las amplitudes obtenidas mediante el análisis de cosinor. La Figura 48 muestra las gráficas comparativas obtenidas.

El análisis de varianza (ANOVA) tabla 2 para las amplitudes obtenidas mediante el análisis de cosinor muestra que existe diferencia significativa entre los grupos  $F(3,10)=4.99$ ;  $p<0.05$ ). Una prueba post hoc de Tukey muestra que las amplitudes son significativamente diferentes sólo entre los grupos intactos y L.NSQ



**Figura 48. Comparación de las amplitudes entre los grupos experimentales y el grupo control.** Se realizaron comparaciones de las amplitudes de cada grupo utilizando una ANOVA de una vía y posteriormente una prueba post hoc de Tukey.  $p<0.05$ , las diferencias encontradas se han marcado con asteriscos.

Tabla de análisis ANOVA	Datos
F	4.990
Valor de P obtenido	0.0227
Valor de P	*
Existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias? ( $P < 0.05$ )	Si
R cuadrada	0.5995

**Tabla 2. Resultados ANOVA.** Se muestran los valores para el ANOVA  $p<0.05$ .

### Post hoc prueba de Tukey de comparaciones múltiples.

En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos una vez realizada la prueba tukey.

	Diferencias de la media	I.C del 95%	Significativo?	Resumen	Valor ajustado de P
<b>Control vs. L.NSQ</b>	232.3	16.70 a 447.9	Si	*	0.0343
<b>Control vs. L. posterior</b>	176.4	-10.30 a 363.2	No	ns	0.0653
<b>Control vs. L. parcial</b>	87.77	-98.97 a 274.5	No	ns	0.5059
<b>L. NSQ vs. L. posterior</b>	-55.89	-297.0 a 185.2	No	ns	0.8912
<b>L. NSQ vs. L. parcial</b>	-144.6	-385.6 a 96.52	No	ns	0.3135
<b>L. posterior vs. L. parcial</b>	-88.67	-304.3 a 127.0	No	ns	0.6072

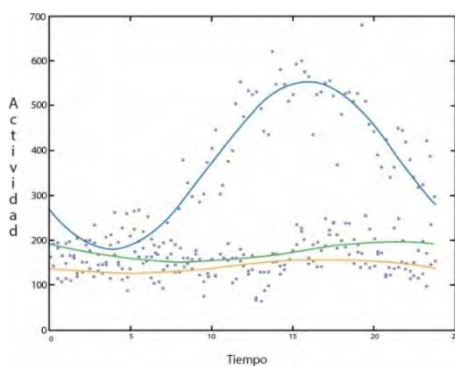
**Tabla 3. Resultados ANOVA post hoc.** Se muestran los valores post hoc y las comparaciones entre todos los grupos experimentales en L/O.

Por medio de este análisis se determinó que existe una diferencia significativa entre el grupo control y el grupo L. NSQ, no así entre los grupos control y L. parcial y L. posterior.

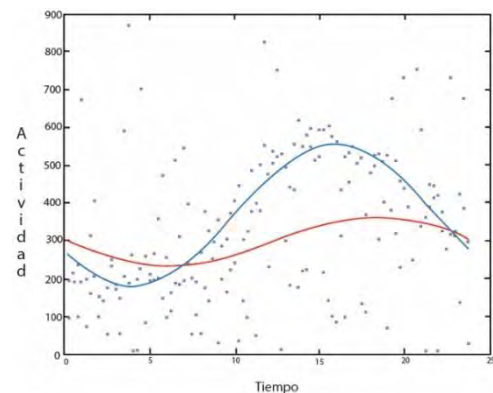
### Análisis Cosinor para O.C

A continuación se muestran los resultados obtenidos mediante el análisis de cosinor, haciendo una comparación entre los grupos experimentales vs. el grupo intacto, en condiciones OC. En la Figura 49 se muestran las gráficas obtenidas por el análisis.

a) *Intactos vs L.parcial vs L. posterior*



b) *Intactos vs L.NSQ*



**Figura 49. Gráfica comparativa.** **A)** Se muestra el contraste del comportamiento sinusoidal del grupo **Intacto-azul**, con respecto a los grupos **L. parcial-verde** y **L. posterior-anaranjado**. Nótese la diferencia cualitativa de las amplitudes con respecto al grupo Intacto-azul. **B)** Se muestra el contraste del comportamiento sinusoidal del grupo intacto con respecto al del grupo L. NSQ. Intacto-azul. L. NSQ-rojo.

En la Tabla 4 se muestran los resultados obtenidos de los parámetros rítmicos: mesor, amplitud y acrofase mediante el análisis de cosinor.

<b>Intactos</b>	<b>Mesor: 367.2</b>	<b>Amplitud: 186.6</b>	<b>Acrofase: 15.93</b>
<b>L.NSQ</b>	Mesor: 391.2	Amplitud: 70.9	Acrofase: 23.42
<b>L. posterior</b>	Mesor: 173.1	Amplitud: 23.1	Acrofase: 20.67
<b>L. parcial</b>	Mesor: 142.9	Amplitud: 14.8	Acrofase: 16.95

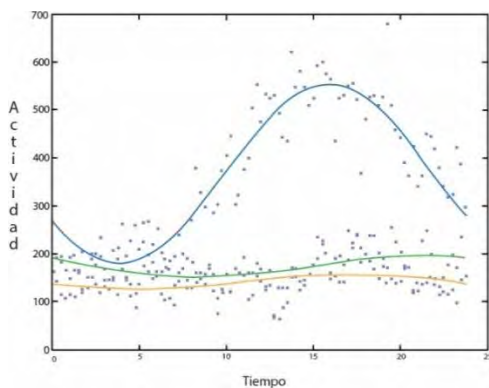
**Tabla 4 Parámetros rítmicos.** Se muestran los datos obtenidos por el análisis cosinor: Mesor, amplitud y acrofase

Para determinar las diferencias significativas entre los grupos experimentales y el grupo control, se realizó un análisis de sus amplitudes mediante el análisis ANOVA de una vía y posteriormente se evaluaron estos resultados mediante una prueba post hoc con la prueba de Tukey.

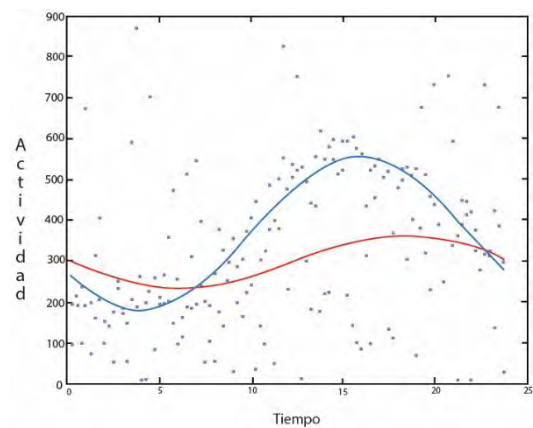
### ANOVA de una vía O.C

A continuación se muestran los resultados obtenidos evaluando las amplitudes obtenidas mediante el análisis de cosinor. El análisis de varianza (ANOVA) para las amplitudes obtenidas, Tabla 5, muestra que existe una diferencia significativa entre los grupos  $F(3,9)=11.73$ ;  $p<0.05$ . Una prueba post hoc de Tukey muestra que las amplitudes de los animales experimentales son significativamente diferentes a el grupo control. La Figura 50 se muestra las gráficas obtenidas con el análisis.

a) Intactos vs L.parcial vs L. posterior



b) Intactos vs L.NSQ



**Figura 50. Comparación de las amplitudes entre los grupos experimentales y el grupo control.** Comparación de las amplitudes entre los grupos experimentales y el grupo control. Se realizaron comparaciones de las amplitudes de cada animal utilizando una ANOVA de una vía y posteriormente



una prueba post hoc de Tukey.  $p < 0.05$ , los tres grupos experimentales en rojo, verde y anaranjado, son estadísticamente diferentes con respecto al grupo intacto.

Tabla de análisis	Datos
<b>Resumen ANOVA</b>	
F	11.73
Valor de P	0.0018
Valor de P representativo	**
Hay diferencias estadísticamente significativas entre las medias? (P < 0.05)	Si
R cuadrada	0.7963

**Tabla 5. Resultados ANOVA.** Se muestran los valores para el ANOVA  $p < 0.05$ .

### Post hoc prueba de Tukey de comparaciones múltiples.

En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos una vez realizada la prueba tukey.

Prueba de Tukey					
Alpha	0.05				
Tukey's multiple comparisons test	Diferencias entre medias	I.C del 95%.	Significativo?	Summary	Adjusted P Value
intactos vs. NSQ X	174.5	16.10 a 332.8	Si	*	0.0310
intactos vs. L. posterior	209.4	72.26 a 346.5	Si	**	0.0046
intactos vs. L. parcial	222.3	63.95 a 380.7	Si	**	0.0079
NSQ X vs. L. posterior	34.95	-142.1 a 212.0	No	ns	0.9243
NSQ X vs. L. parcial	47.85	-146.1 a 241.8	No	ns	0.8659
L. posterior vs. L. parcial	12.90	-164.1 a 189.9	No	ns	0.9955

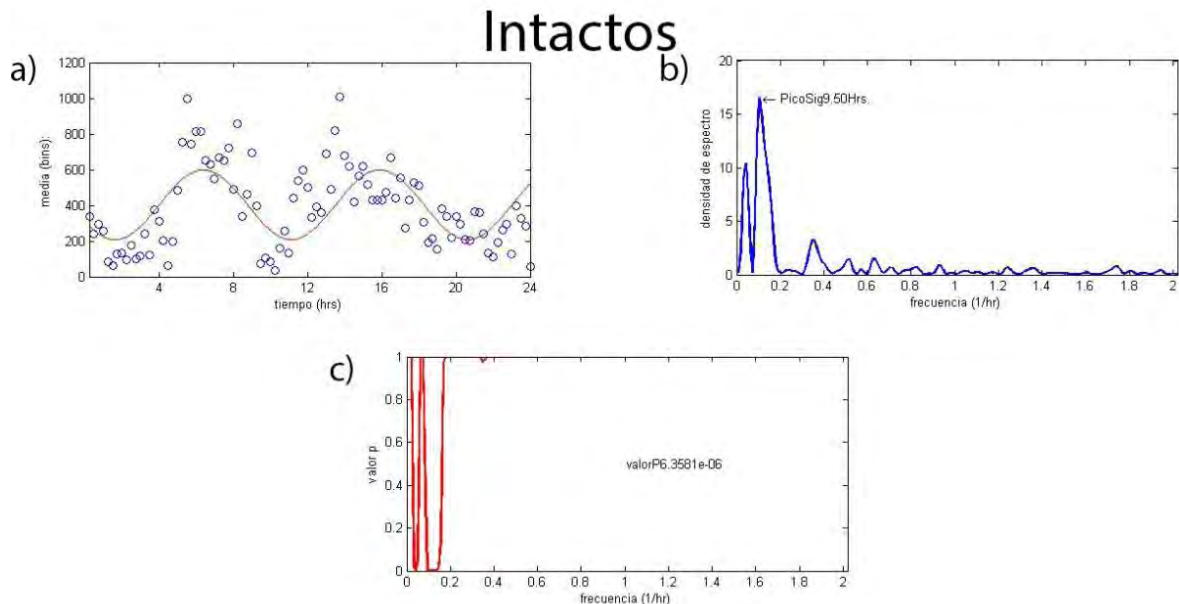
**Tabla 6. Resultados ANOVA post hoc.** Se muestran los valores post hoc y las comparaciones entre todos los grupos experimentales en OC.

Por medio de este análisis se determina que existe una diferencia significativa entre los grupos L.NSQ, L.parcial y L.posterior con respecto al grupo intacto, no así entre los 3 grupos experimentales.

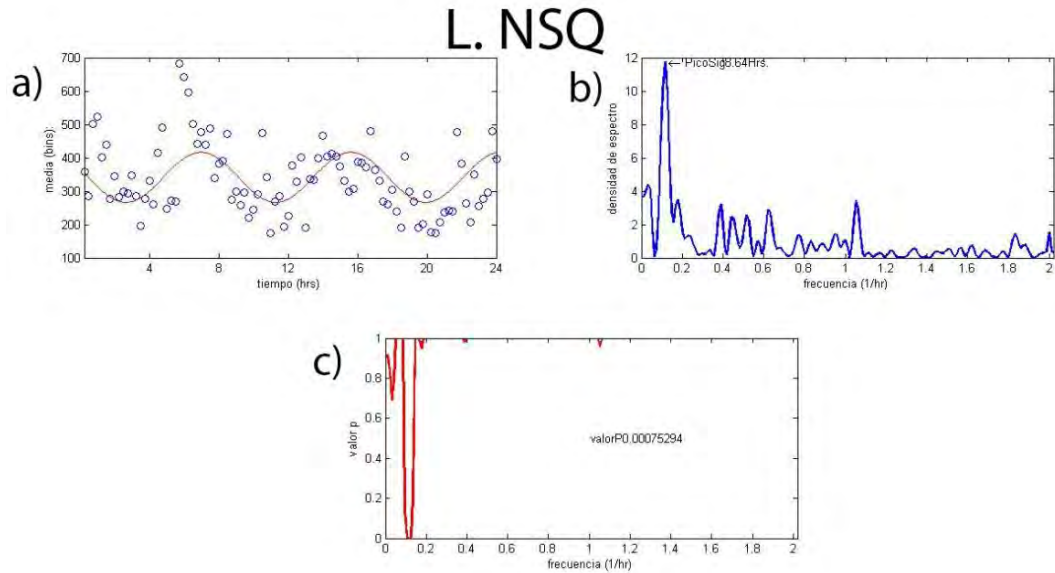
## 8.5.2 Análisis Lomb-Scargle

A continuación se muestran los resultados obtenidos mediante el análisis Lomb-Scargle realizados en Matlab para los datos obtenidos bajo el fotoperiodo ultradiano 4 horas luz 4 horas oscuridad.

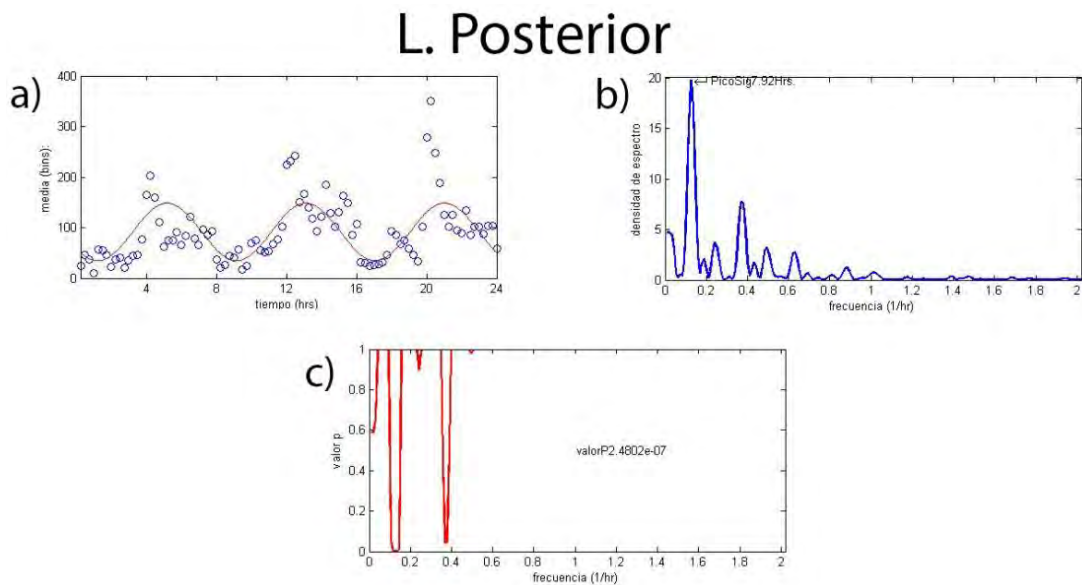
El análisis de Lomb-Scargle es una herramienta que permite detectar la presencia o ausencia de un ritmo ultradiano, así como su nivel de significancia. En el presente análisis se realizaron 3 gráficos por grupo, correspondientes a la frecuencia del ritmo, el pico de significancia y el ajuste de la media de los datos durante las 24 horas, ajustando una senoide para evidenciar la respuesta de la actividad cada que se realizaban cambios de luz-oscuridad, es decir cada 4 horas que fue el ciclo ultradiano diseñado para el presente trabajo.



**Figura 51. Análisis Lomb-Scargle.** A) **Comportamiento de los datos** Ajuste sinusoidal del comportamiento de los datos en respuesta a los estímulos ultradianos de L/O. B) **Frecuencia**. Gráfica que muestra la frecuencia de los animales intactos bajo el fotoperiodo ultradiano, el valor más alto corresponde a la frecuencia en horas en la que se repite un ciclo, siendo de 9.5 horas. C) **Significancia estadística**. Se muestra la significancia estadística de la frecuencia  $p < 0.005$ .

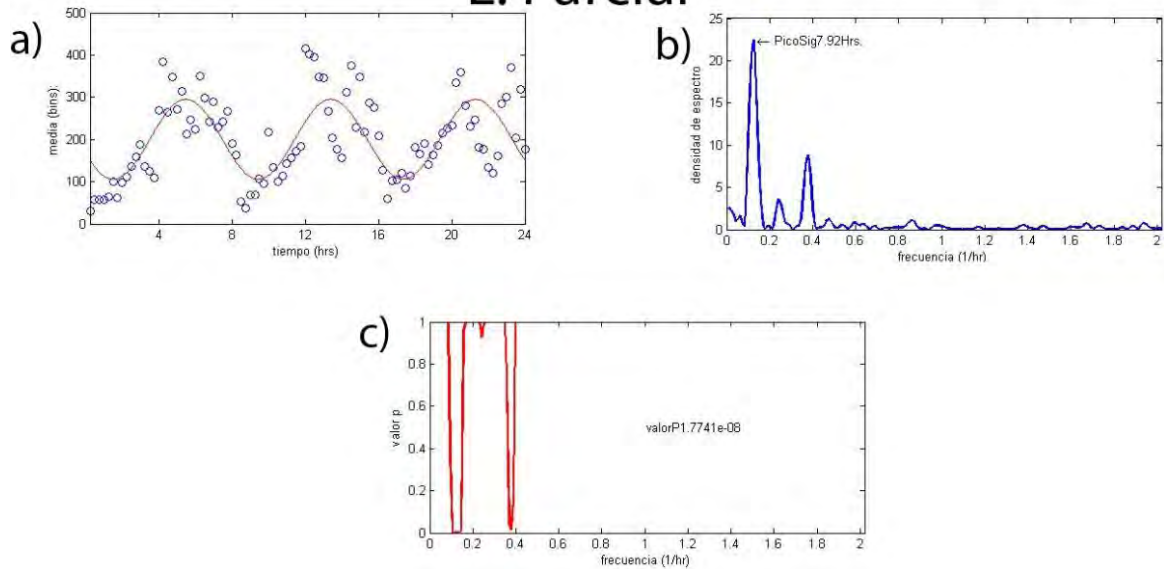


**Figura 52. Análisis Lomb-Scargle.** A) **Comportamiento de los datos** Ajuste sinusoidal del comportamiento de los datos en respuesta a los estímulos ultradianos de L/O. B) **Frecuencia.** Gráfica que muestra la frecuencia de los animales intactos bajo el fotoperiodo ultradiano, el valor más alto corresponde a la frecuencia en horas en la que se repite un ciclo, siendo de 8.64 horas. C) **Significancia estadística.** Se muestra la significancia estadística de la frecuencia  $p < 0.005$ .



**Figura 53. Análisis Lomb-Scargle.** A) **Comportamiento de los datos** Ajuste sinusoidal del comportamiento de los datos en respuesta a los estímulos ultradianos de L/O. B) **Frecuencia.** Gráfica que muestra la frecuencia de los animales intactos bajo el fotoperiodo ultradiano, el valor más alto corresponde a la frecuencia en horas en la que se repite un ciclo, siendo de 7.92 horas. C) **Significancia estadística.** Se muestra la significancia estadística de la frecuencia  $p < 0.005$ .

## L. Parcial



**Figura 54. Análisis Lomb-Scargle.** A) **Comportamiento de los datos** Ajuste sinusoidal del comportamiento de los datos en respuesta a los estímulos ultradianos de L/O. B) **Frecuencia.** Gráfica que muestra la frecuencia de los animales intactos bajo el fotoperiodo ultradiano, el valor más alto corresponde a la frecuencia en horas en la que se repite un ciclo, siendo de 7.92 horas. C) **Significancia estadística.** Se muestra la significancia estadística de la frecuencia  $p < 0.005$ .

El análisis de Lomb-Scargle muestra que en todos los grupos existen respuestas ante los cambios ultradianos de L/O en la expresión de la actividad locomotora.

### 8.5.3 Análisis estadístico para CUD

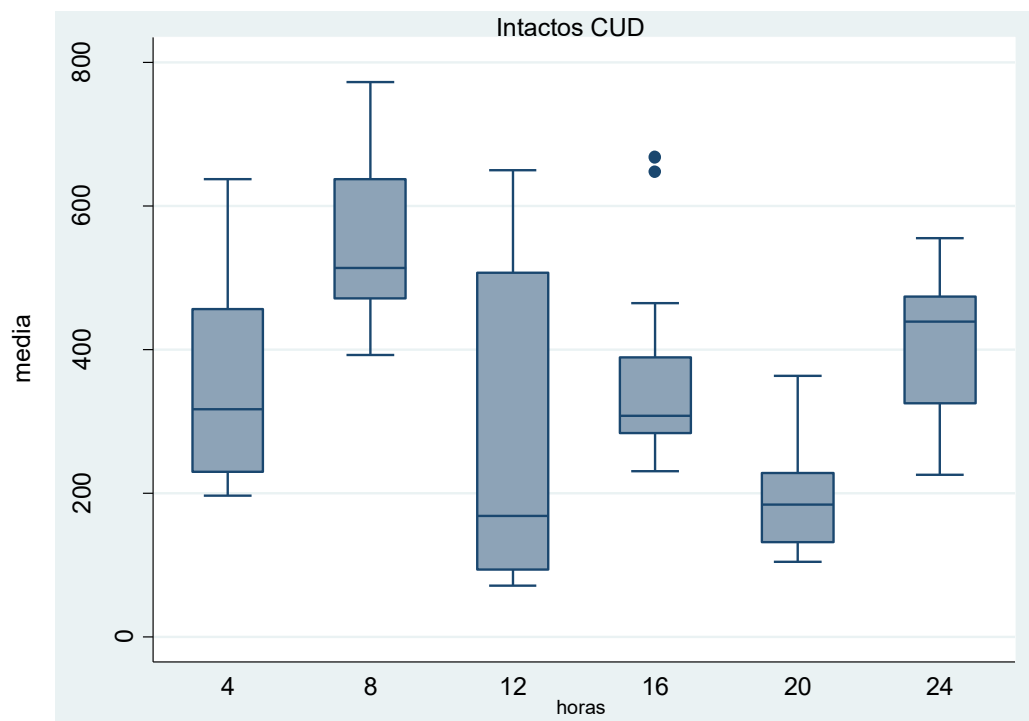
A continuación se presentan los resultados obtenidos durante el análisis estadístico de los animales bajo condiciones 4 horas luz- 4 horas oscuridad o CUD.

#### Intactos vs. L.NSQ

A continuación se presentan los resultados de los análisis estadísticos para el grupo Intacto y el grupo L.NSQ. En primera instancia se muestran los resultados por separado y posteriormente los gráficos comparativos con sus respectivos análisis

- **Intactos**

Para analizar la respuesta que ejerce la luz en la expresión de la actividad locomotora en los animales intactos, se realizó una ANOVA de medidas repetidas cuyos resultados se muestran en la Tabla 7. En la Figura 55 se muestra una gráfica de caja y bigotes con la distribución de los datos.



**Figura 55. Gráfica de caja y bigotes.** Diagrama de caja y bigote que muestra la dispersión y simetría de los datos a lo largo de los 6 cambios de luz oscuridad de los animales intactos. Los puntos fuera de la caja a las 16 horas muestran los casos extraordinarios fuera de la media.

Number of obs = 96      R-squared = 0.4928  
 Root MSE = 138.052      Adj R-squared = 0.3576

Source	Partial SS	df	MS	F	Prob > F
Model	1388932.93	20	69446.6467	3.64	0.0000
gpot	299677.24	15	19978.4827	1.05	0.4180
fotop	1089255.69	5	217851.139	11.43	0.0000
Residual	1429367.98	75	19058.2397		
Total	2818300.91	95	29666.3254		

**Tabla 7. ANOVA de medidas repetidas.** Los valores de comparación entre los diferentes fotoperiodos (fotop) indican que existen diferencias significativas entre ellos. Nivel de significancia  $p < 0.05$ .

El análisis de varianza, Tabla 7, muestra que existen diferencias significativas entre los fotoperiodos  $F = 11.43$   $p < 0.05$ . Una prueba post hoc de Bonferroni fue realizada, los resultados se muestran en la Tabla 8. Esta prueba indica que existen diferencias significativas entre las respuestas que expresan los animales pertenecientes al grupo de comparación ante los cambios de luz-oscuridad.

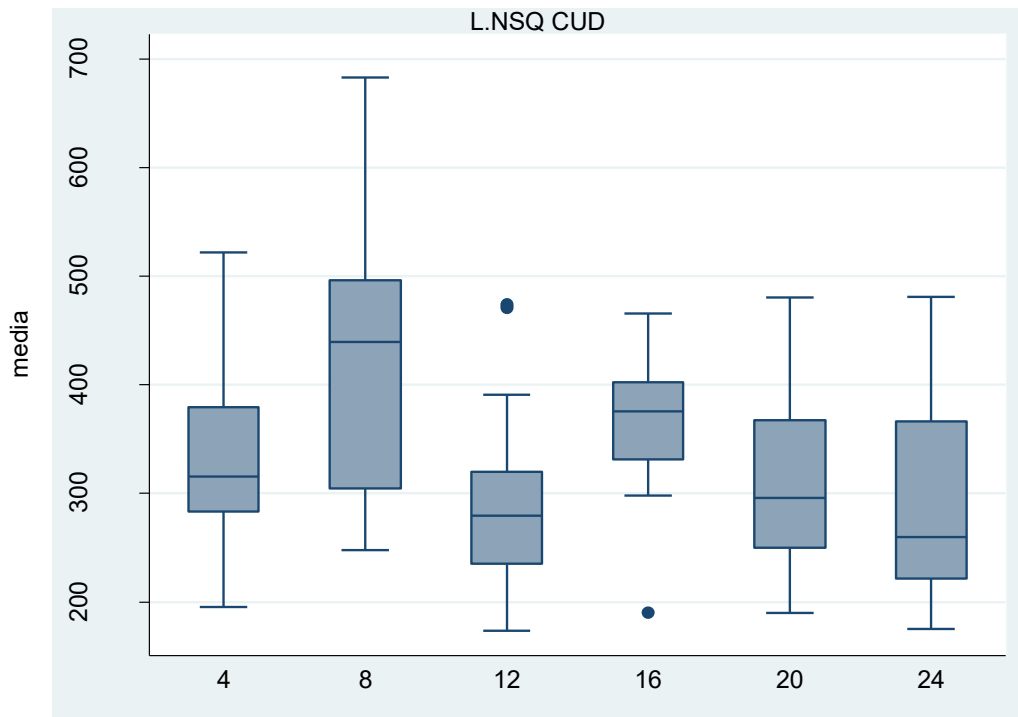
Comparison of media by fotop  
(Bonferroni)

Row Mean- Col Mean	4	8	12	16	20
8	222.937 *0.000				
12	-50.457 1.000	-273.395 *0.000			
16	46.2083 1.000	-176.729 0.008	96.6654 0.774		
20	-121.586 0.224	-344.523 *0.000	-71.1289 1.000	-167.794 0.014	
24	50.3828 1.000	-172.555 0.010	100.84 0.638	4.17448 1.000	171.969 0.011

**Tabla 8. Prueba de Bonferroni.** Se muestran las diferencias entre los 6 fotoperiodos con un nivel de significancia  $p < 0.05$  (asteriscos).

- L.NSQ

Para analizar la respuesta que ejerce la luz en la expresión de la actividad locomotora en los animales del grupo L.NSQ, se realizó una ANOVA de medidas repetidas cuyos resultados se muestran en la Tabla 9. En la Figura 56 se muestra una gráfica de caja y bigotes con la distribución de los datos.



**Figura 56. Gráfica de caja y bigotes.** Diagrama de caja y bigote que muestra la dispersión y simetría de los datos a lo largo de los 6 cambios de luz oscuridad del grupo L.NSQ. Los puntos fuera de la caja muestran casos extraordinarios fuera de la media.

Number of obs = 96 R-squared = 0.3274  
 Root MSE = 97.0635 Adj R-squared = 0.1480

Source	Partial SS	df	MS	F	Prob > F
Model	343880.827	20	17194.0413	1.83	0.0328
gpot	104779.443	15	6985.29618	0.74	0.7352
fotop	239101.384	5	47820.2768	5.08	0.0005
Residual	706598.8	75	9421.31734		
Total	1050479.63	95	11057.6803		

**Tabla 9. ANOVA de medidas repetidas.** Los valores de comparación entre los diferentes fotoperiodos (fotop) indican que existen diferencias significativas entre ellos. Nivel de significancia  $p < 0.05$ .

El análisis de varianza, Tabla 9, muestra que existen diferencias significativas entre los fotoperiodos  $F=5.08$ ;  $p < 0.05$ . Una prueba post hoc de Bonferroni fue realizada, los resultados se muestran en la Tabla 10. Esta prueba indica que existen diferencias significativas entre las respuestas que expresan los animales pertenecientes al grupo experimental ante los cambios de luz-oscuridad, en al menos un par.

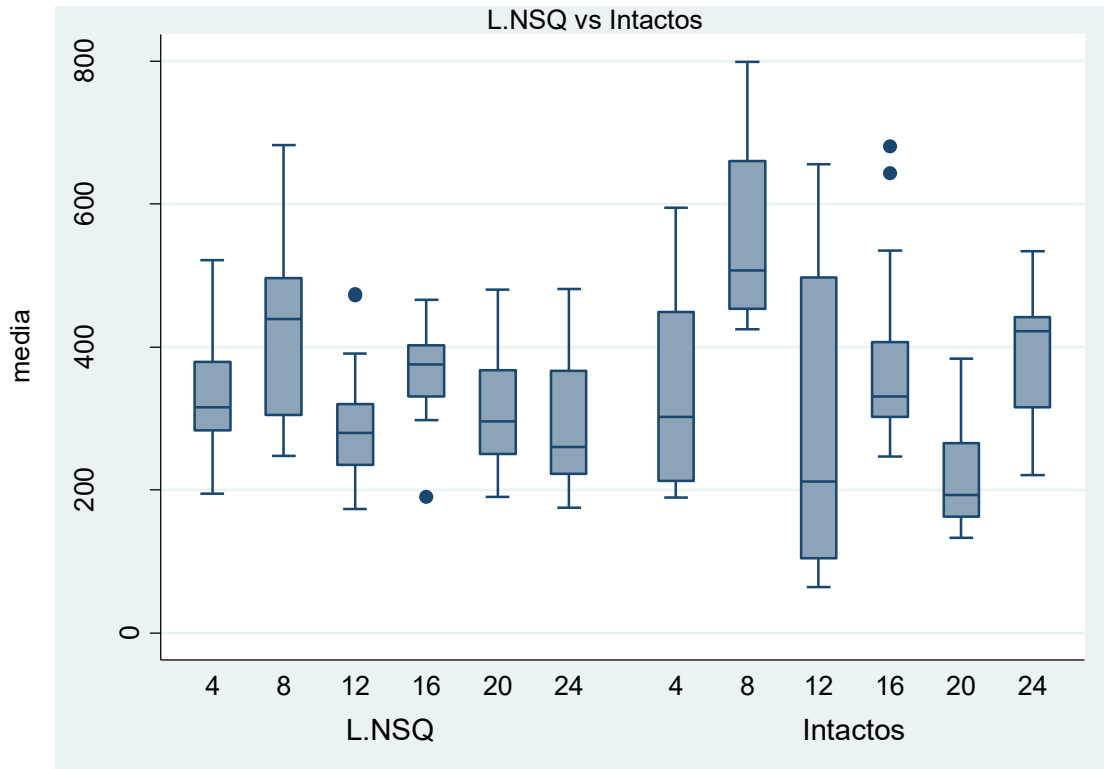
		Comparison of media by fotop (Bonferroni)				
Row Mean- Col Mean		4	8	12	16	20
8		94.2589 0.092				
12		-45.3393 1.000	-139.598 0.001			
16		19.9107 1.000	-74.3482 0.440	65.25 0.826		
20		-36.3482 1.000	-130.607 0.003	8.99107 1.000	-56.2589 1.000	
24		-48.2411 1.000	-142.5 0.001	-2.90178 1.000	-68.1518 0.679	-11.8929 1.000

**Tabla 10. Prueba de Bonferroni.** Se muestran las diferencias entre los 6 fotoperiodos con un nivel de significancia  $p < 0.05$  (asteriscos)



## Intactos vs. L.NSQ

A continuación se presentan los resultados del análisis del ANOVA de dos vías, que evalúan los fotoperiodos de ambos grupos y también analiza el factor lesión, Tabla 11. En la Figura 57 se muestra el comportamiento de los datos mediante un diagrama de caja y bigote.



**Figura 57. Gráfica de caja y bigotes.** Diagrama de caja y bigote que muestra la dispersión y simetría de los datos a lo largo de los 6 cambios de luz oscuridad de los animales L.NSQ y el grupo intactos. Los puntos fuera de las cajas muestran valores atípicos.

Number of obs = 192      R-squared = 0.3464  
 Root MSE = 113.699      Adj R-squared = 0.3064

Source	Partial SS	df	MS	F	Prob > F
Model	1233082.83	11	112098.439	8.67	0.0000
fotop	775383.878	5	155076.776	12.00	0.0000
lesion	61527.91	1	61527.91	4.76	0.0304
fotop#lesion	396171.038	5	79234.2077	6.13	0.0000
Residual	2326932.72	180	12927.404		
Total	3560015.55	191	18638.8248		

**Tabla 11. ANOVA de dos vías.** Los valores de comparación entre los diferentes fotoperiodos (fotop) indican que existen diferencias significativas entre ellos, así como entre la lesión realizada con respecto al grupo intacto,  $p < 0.05$ .

El análisis de varianza muestra que existen diferencias significativas entre los fotoperiodos  $F=12.00$ ;  $p < 0.05$ , no así para el factor lesión o la comparación intacto vs. L.NSQ. La Tabla 12 muestra que existen diferencias significativas entre los grupos L.NSQ y el grupo intacto.

Comparison of media by lesion (Bonferroni)	
Row Mean-	
Col Mean	L.NSQ
-----+	-----
Intactos	23.4113
	0.0304

**Tabla 12. Prueba de Bonferroni.** Se muestran las diferencias entre los 2 grupos, LNSQ e Intactos, con un nivel de significancia  $p < 0.05$ .

Para analizar las diferencias entre la expresión de la actividad entre ambos grupos o diferencias entre los fotoperiodos de ambos grupos, se realizó una prueba a posteriori conocida como distancia significativa honesta de tukey (*DSH*), siguiendo el método presentado en [Fowler et al; 1998](#); consultado en Salgado-Ugarte, 1992. Se construyó una matriz con los cálculos de las

medias por diferencia absoluta los cuales fueron los valores a comparar con el valor obtenido por la prueba DSH, descrita por la fórmula:

$$DSH = q_{\alpha, a, v} \sqrt{\frac{CM_{error}}{K}}$$

Donde  $\alpha$  es el valor de significancia (0.05), con  $a$  número de muestras y  $v$  grados de libertad del error y  $k$  el tamaño de la muestra. El valor de  $q$  se obtuvo de la tabla de porcentajes del rango studentizado para la DSH de Tukey, con cola superior de 5% (encontrado en [Guerra et al., 2005](#)), teniendo lo siguiente:

$$DSH = q_{0.05, 2, 180} \sqrt{\frac{CM_{error}}{K}} \quad DSH = 2.77 \left( \sqrt{\quad} \right)$$

$$DSH = 113.698$$

De esta manera el valor de DSH, se compara con los valores de la media que se encuentran la Tabla 13, siendo los valores mayores al valor de DSH estadísticamente significativos o diferentes.

Means, Standard Deviations and Frequencies of media lesion

fotop	L.NSQ	Intactos	Total
4	346.10417 89.526946 16	335.86458 141.32214 16	340.98438 116.48676 32
8	431.13542 141.8549 16	558.80208 125.84726 16	494.96875 146.99083 32
12	287.95833 76.78434 16	285.40755 219.04294 16	286.68294 161.46374 32
16	345.05208 68.723617 16	382.07292 129.50907 16	363.5625 103.70513 32
20	297.72917 91.30484 16	214.27865 72.666117 16	256.00391 91.575104 32
24	303.59375 102.89669 16	386.2474 97.094935 16	344.92057 106.99417 32
Total	335.26215 107.1194 96	360.44553 172.23915 96	347.85384 143.60407 192

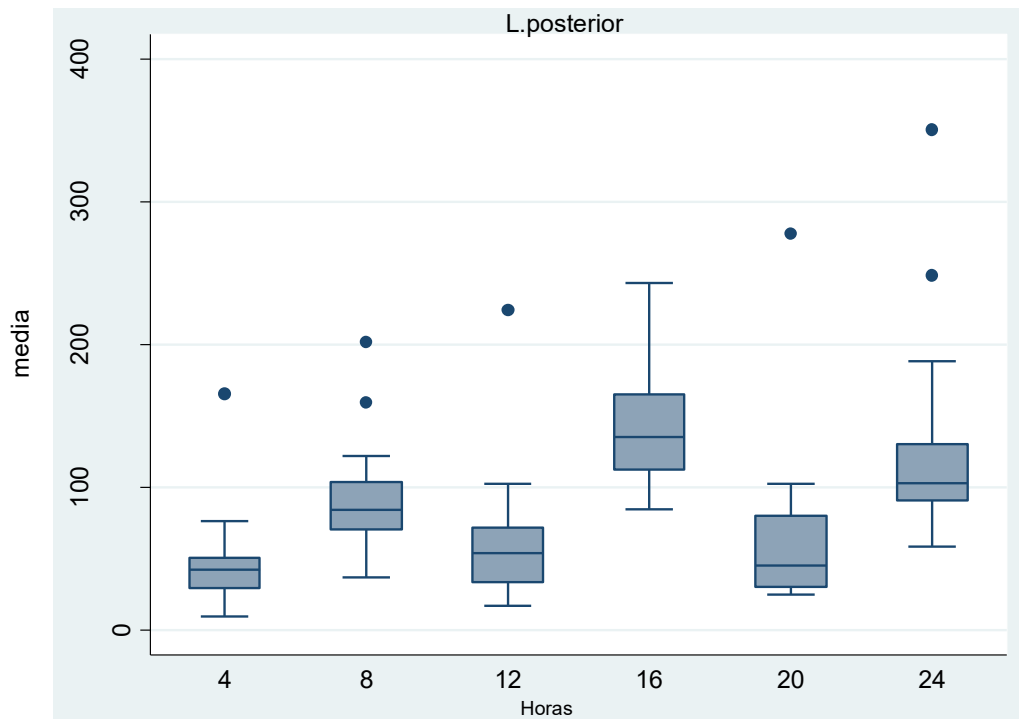
**Tabla 12. Medias y Prueba de Bonferroni.** Se muestran las medias, desviación estándar y grados de libertad respectivamente para entre los 6 fotoperiodos con un nivel de significancia  $p < 0.05$ . Los valores de la media se compararon con el valor de DSH, si  $\mu > DSH$ , hay diferencias significativas.

### L. parcial vs. L. posterior

A continuación se presentan los resultados de los análisis estadísticos para los grupos L. parcial y L. posterior, mostrando sus resultados por grupo y posteriormente haciendo una comparación entre ambos grupos.

- L. posterior

Para analizar la respuesta que ejerce la luz en la expresión de la actividad locomotora en el presente grupo, se realizó una ANOVA de medidas repetidas cuyos resultados se muestran en la tabla. En la figura 58, se muestra una gráfica de caja y bigotes con la distribución de los datos.



**Figura 58. Gráfica de caja y bigotes.** Diagrama de caja y bigote que muestra la dispersión y simetría de los datos a lo largo de los 6 cambios de luz/oscuridad del grupo L. posterior. Los puntos fuera de la caja muestran casos extraordinarios fuera de la media.

Number of obs = 96 R-squared = 0.4893  
 Root MSE = 50.4394 Adj R-squared = 0.3531

Source	Partial SS	df	MS	F	Prob > F
Model	182788.126	20	9139.40629	3.59	0.0000
gpot	58068.5612	15	3871.23741	1.52	0.1192
fotop	124719.565	5	24943.9129	9.80	0.0000
Residual	190809.927	75	2544.13236		
Total	373598.053	95	3932.61108		

**Tabla 14. ANOVA de medidas repetidas.** Los valores de comparación entre los diferentes fotoperiodos (fotop) indican que existen diferencias significativas entre ellos. Nivel de significancia  $p < 0.05$ .

El análisis de varianza, tabla 14, muestra que existen diferencias estadísticamente significativas entre los fotoperiodos  $F=9.80$ ;  $p < 0.05$ . Una prueba post hoc de Bonferroni fue realizada, los resultados se muestran en la tabla 15. Esta prueba indica que existen diferencias significativas entre las respuestas que expresan los animales pertenecientes al grupo experimental ante cada estímulo de luz/oscuridad.

Comparison of media by fotop  
(Bonferroni)

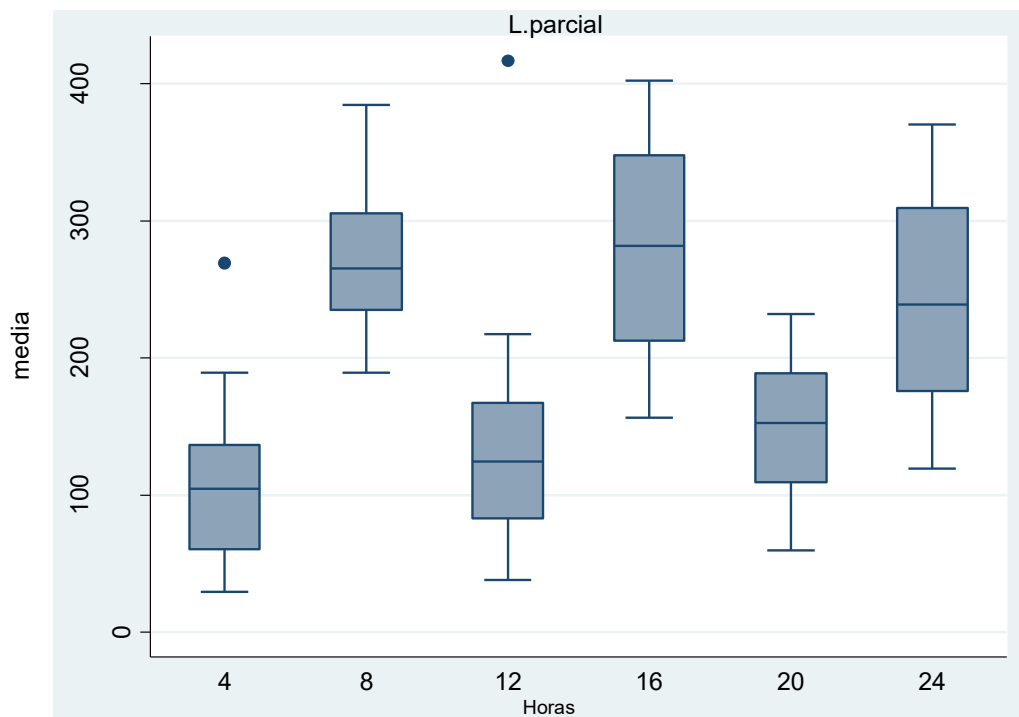
Row Mean- Col Mean	4	8	12	16	20
8	46.0893				
	0.226				
12	14.9554	-31.1339			
	1.000	1.000			
16	96.875	50.7857	81.9196		
	*0.000	0.114	*0.000		
20	18.2411	-27.8482	3.28572	-78.6339	
	1.000	1.000	1.000	*0.001	
24	83.433	37.3437	68.4777	-13.442	65.192
	*0.000	0.714	0.006	1.000	0.011

**Tabla 15. Prueba de Bonferroni.** Se muestran las diferencias entre los 6 fotoperiodos con un nivel de significancia  $p < 0.05$  (asteriscos).

- L. parcial

Para analizar la respuesta que ejerce la luz en la expresión de la actividad locomotora en el presente grupo se realizó una ANOVA de medidas repetidas

Para analizar la respuesta que ejerce la luz en la expresión de la actividad locomotora en el presente grupo, se realizó una ANOVA de medidas repetidas cuyos resultados se muestran en la tabla. En la Figura 59, se muestra una gráfica de caja y bigotes con la distribución de los datos.



**Figura 59. Gráfica de caja y bigotes.** Diagrama de caja y bigote que muestra la dispersión y simetría de los datos a lo largo de los 6 cambios de luz oscuridad del grupo L.parcial. Los puntos fuera de la caja muestran casos extraordinarios fuera de la media.

Number of obs = 96 R-squared = 0.5942  
 Root MSE = 70.0746 Adj R-squared = 0.4860

Source	Partial SS	df	MS	F	Prob > F
Model	539285.208	20	26964.2604	5.49	0.0000
gpot	85683.6245	15	5712.24163	1.16	0.3189
fotop	453601.584	5	90720.3167	18.47	0.0000
Residual	368284.234	75	4910.45645		
Total	907569.442	95	9553.36255		

**Tabla 16. ANOVA de medidas repetidas.** Los valores de comparación entre los diferentes fotoperiodos (fotop) indican que existen diferencias significativas entre ellos. Nivel de significancia  $p < 0.05$ .

El análisis de varianza, Tabla 16, muestra que existen diferencias significativas entre los fotoperiodos  $F=18.47$ ;  $p < 0.05$ . Una prueba post hoc de Bonferroni fue realizada, los resultados se muestran en la Tabla 17. Esta prueba indica que existen diferencias significativas entre las respuestas que expresan los animales antes los cambios de luz-oscuridad.

Comparison of media by fotop  
(Bonferroni)

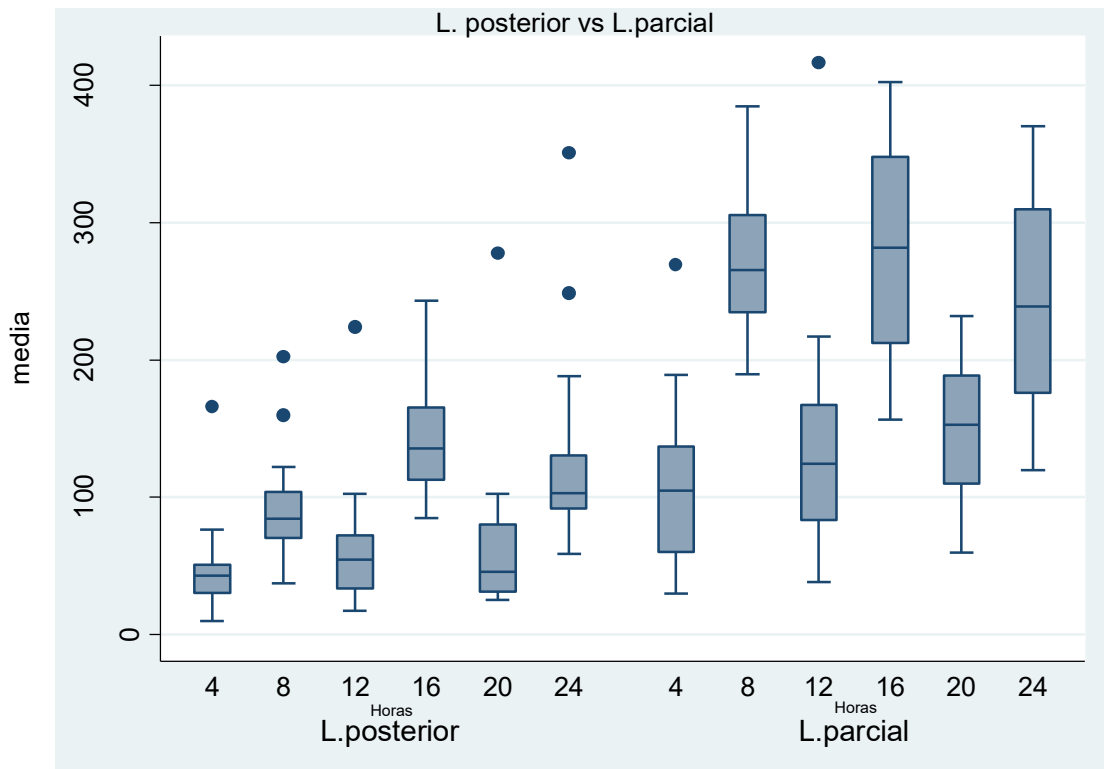
Row Mean- Col Mean	4	8	12	16	20
8	162.807				
	*0.000				
12	29.128	-133.679			
	1.000	*0.000			
16	174.049	11.2426	144.921		
	*0.000	1.000	*0.000		
20	40.8036	-122.003	11.6756	-133.246	
	1.000	*0.000	1.000	*0.000	
24	131.948	-30.8586	102.82	-42.1012	91.1443
	*0.000	1.000	*0.001	1.000	0.007



**Tabla 17. Prueba de Bonferroni.** Se muestran las diferencias entre los 6 fotoperiodos con un nivel de significancia  $p < 0.05$  (asteriscos).

## L. parcial vs. L. posterior

A continuación se presentan los resultados del análisis ANOVA de medidas repetidas, tabla 18, para comparar las diferencias que existen entre los fotoperiodos de ambos grupos y los resultados del ANOVA de una vía, tabla, que evalúa el factor lesión entre ambos grupos. En la Figura 60, se muestra el comportamiento de los datos mediante un diagrama de caja y bigote.



**Figura 60. Gráfica de caja y bigotes.** Diagrama de caja y bigote que muestra la dispersión y simetría de los datos a lo largo de los 6 cambios de luz oscuridad de los animales L. posterior y el L. parcial. Los puntos fuera de las cajas muestran valores atípicos.

Number of obs = 192      R-squared = 0.6203  
 Root MSE = 62.4876      Adj R-squared = 0.5971

Source	Partial SS	df	MS	F	Prob > F
Model	1148450.85	11	104404.623	26.74	0.0000
fotop	501075.272	5	100215.054	25.67	0.0000
lesion	570129.705	1	570129.705	146.01	0.0000
fotop#lesion	77245.8766	5	15449.1753	3.96	0.0020
Residual	702846.347	180	3904.70193		
Total	1851297.2	191	9692.6555		

**Tabla 18. ANOVA de dos vías.** Los valores de comparación entre los diferentes fotoperiodos (fotop) indican que existen diferencias significativas entre ellos, así como entre la lesión realizada con respecto al grupo intacto,  $p < 0.05$ .

El análisis de varianza, Tabla 18, muestra que existen diferencias significativas entre los fotoperiodos  $F=25.67$ ;  $p < 0.05$ , así como el factor lesión. Una prueba post hoc de Bonferroni fue realizada, los resultados se muestran en la Tabla 19. Esta prueba indica que existen diferencias significativas entre ambos grupos evaluando el factor lesión.

```

Comparison of media by lesion
      (Bonferroni)
Row Mean-|
Col Mean | L.posterior
-----+-----
L.parcia |    108.985
          |         0.000
  
```

**Tabla 19. Prueba de Bonferroni.** Se muestran las diferencias entre los 2 grupos, 1.LNSQ y 2. Intactos, con un nivel de significancia  $p < 0.05$

Para analizar las diferencias entre la expresión de la actividad entre todos los grupos o las diferencias entre los fotoperiodos de todos los grupos, se realizó la prueba a posteriori conocida como distancia significativa honesta de tukey (*DSH*), siguiendo el método presentado en Fowler *et al*; 1998 (consultado en [Salgado-Ugarte, 1992](#)).

$$DSH = q_{0.05, 2, 180} \sqrt{\frac{CM_{error}}{K}} \quad DSH = 2.77 \left( \sqrt{\quad} \right)$$

$$DSH = 70.663$$

El valor de DSH, se comparó con los valores de la media que se encuentran la tabla 14, siendo los valores mayores al valor de DSH estadísticamente significativos o diferentes.

Means, Standard Deviations and Frequencies of media lesion

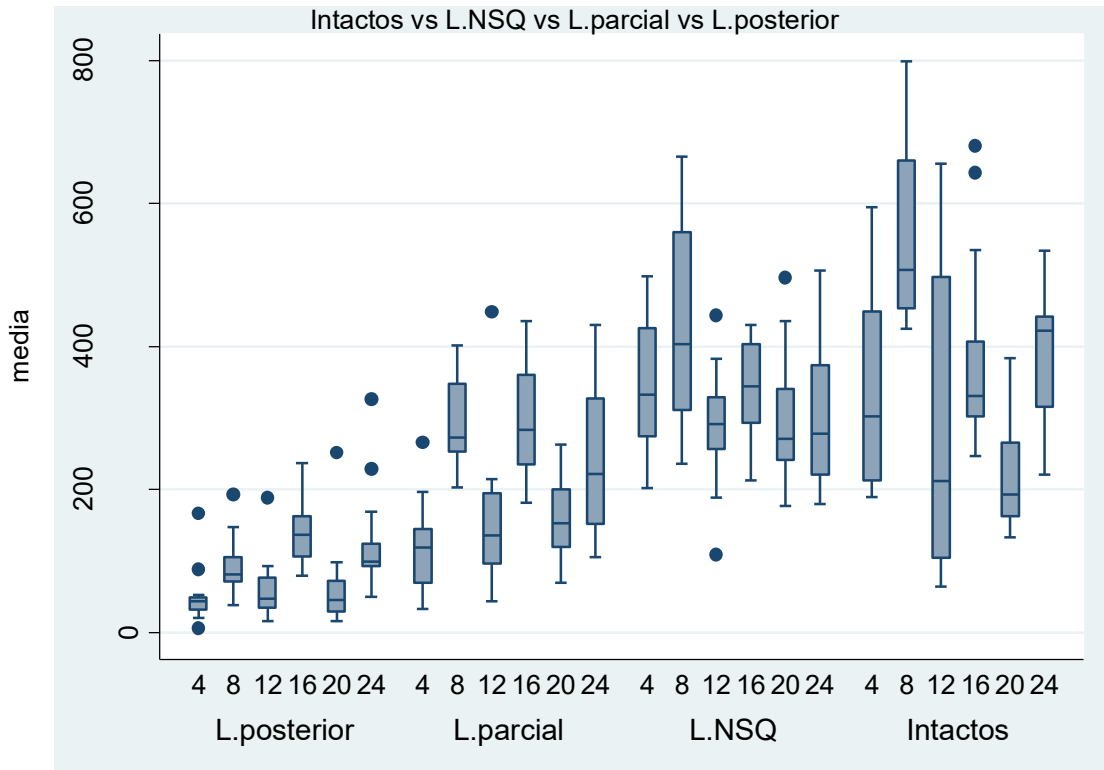
fotop	L.posterior	L.parcial	Total
4	47.754464 35.275571 16	*110.21577 60.600908 16	78.985118 58.188753 32
8	*93.84375 40.063226 16	*273.02232 54.463387 16	183.43304 102.45526 32
12	62.709821 48.857751 16	*139.34375 89.292099 16	101.02679 80.799324 32
16	*144.62946 45.444967 16	*284.26488 79.548718 16	214.44717 95.357233 32
20	65.995536 61.879257 16	*151.01935 52.224268 16	108.50744 70.979014 32
24	*131.1875 73.899283 16	*242.16369 81.224021 16	186.67559 94.93672 32
Total	*91.020089 62.710534 96	*200.00496 97.741304 96	145.51252 98.451285 192

**Tabla 20. Medias y Prueba de Bonferroni.** Se muestran las medias, desviación estándar y grados de libertad respectivamente para entre los 6 fotoperiodos con un nivel de significancia  $p < 0.05$ . Los valores de la media se compararon con el valor de DSH, si  $\mu > DSH$ , hay diferencias significativas (asteriscos).

### Intactos vs. L.NSQ vs. L. parcial vs. L. posterior

Se realizó una ANOVA bifactorial para poder analizar las diferencias entre cada uno de los 6 cambios de luz oscuridad a lo largo de las 24 horas, los resultados se muestran en la Tabla 13.

En la Figura 50, se muestra una gráfica de caja y bigotes con la distribución de los datos.



**Figura 61. Gráfica de caja y bigotes.** Diagrama de caja y bigote que muestra la dispersión y simetría de todos los grupos a lo largo de los 6 cambios de luz oscuridad de los animales L. parcial, L. posterior, L.NSQ e intactos. Los puntos fuera de las cajas muestran valores atípicos.

Number of obs = 384 R-squared = 0.6587  
 Root MSE = 96.3309 Adj R-squared = 0.6369

Source	Partial SS	df	MS	F	Prob > F
Model	6448461.87	23	280367.908	30.21	0.0000
fotop	1239239.76	5	247847.953	26.71	0.0000
lesion	4544249.32	3	1514749.77	163.23	0.0000
fotop#lesion	664972.786	15	44331.519	4.78	0.0000
Residual	3340672.66	360	9279.64627		
Total	9789134.53	383	25559.098		

**Tabla 21. ANOVA de dos vías.** Los valores de comparación entre los diferentes fotoperiodos (fotop) indican que existen diferencias significativas entre ellos, no así entre la lesión realizada con respecto al grupo intacto,  $p < 0.05$ .

Para analizar las diferencias entre la expresión de la actividad entre todos los grupos o las diferencias entre los fotoperiodos de todos los grupos, se realizó la prueba a posteriori conocida como distancia significativa honesta de tukey (*DSH*), siguiendo el método presentado en [Fowler et al; 1998](#) (consultado en [Salgado-Ugarte, 1992](#)).

$$DSH = q_{0.05,4,360} \sqrt{\frac{CM_{error}}{K}} \quad DSH = 3.63 \left( \sqrt{\quad} \right)$$

$$DSH = 142.756$$

El valor de *DSH*, se comparó con los valores de la media que se encuentran en la Tabla 22, siendo los valores mayores al valor de *DSH* estadísticamente significativos o diferentes.

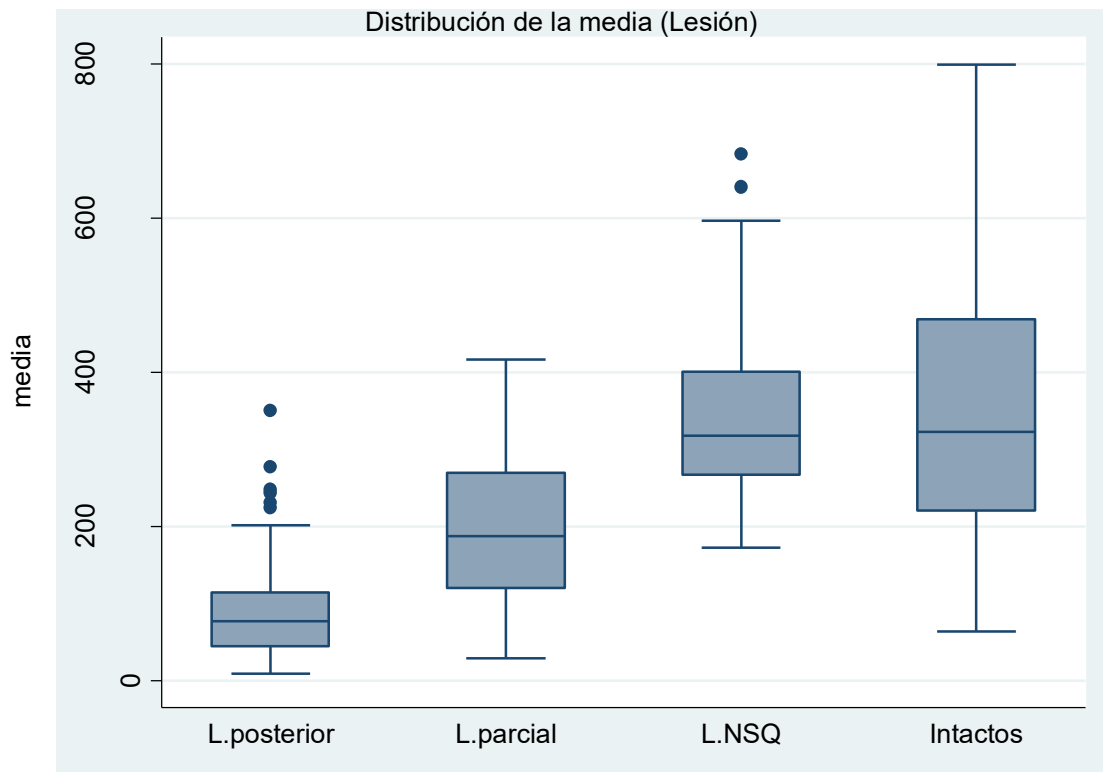
Means, Standard Deviations and Frequencies of media lesion					
fotop	L.posteri	L.parcial	L.NSQ	Intactos	Total
4	48.578125 36.115126 16	117.70486 58.45462 16	*346.10417 89.526946 16	*335.86458 141.32214 16	212.06293 159.03569 64
8	92.156251 37.640366 16	*293.875 58.015873 16	*431.13542 141.8549 16	*558.80208 125.84726 16	343.99219 200.23279 64
12	59.791667 42.15048 16	*155.3125 95.335205 16	*287.95833 76.78434 16	*285.40755 219.04294 16	197.11751 157.23647 64
16	141.11979 43.899633 16	*300.36111 84.186043 16	*345.05208 68.723617 16	*382.07292 129.50907 16	292.15148 125.85246 64
20	60.359376 57.256682 16	*163.67361 58.985867 16	*297.72917 91.30484 16	*214.27865 72.666117 16	184.0102 111.15837 64
24	122.90104 67.795858 16	*239.56597 94.990083 16	*303.59375 102.89669 16	*386.2474 97.094935 16	263.07704 131.94228 64
Total	87.484375 58.866625 96	*211.74884 102.97158 96	*335.26215 107.1194 96	*360.44553 172.23915 96	248.73523 159.87213 384

**Tabla 22. Medias y Prueba de Bonferroni.** a) Se muestran las medias, desviación estándar y grados de libertad respectivamente para entre los 6 fotoperiodos con un nivel de significancia  $p < 0.05$ . Los valores de la media se compararon con el valor de DSH, si  $\mu > DSH$ , hay diferencias significativas (marcadas con asteriscos).

Para determinar las diferencias significativas en el factor lesión se realizó un ANOVA de una vía (Tabla 23) y una prueba post hoc de bonferroni (Tabla 24). Los resultados que se muestran en la tabla indican que no existen diferencias significativas entre el grupo Intacto y el grupo L.NSQ  $p > 0.05$ . En la Figura 62 se muestra el comportamiento de los datos (media) mediante un diagrama de caja y bigote.

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	4544249.32	3	1514749.77	109.75	0.0000
Within groups	5244885.2	380	13802.3295		
Total	9789134.53	383	25559.098		

**Tabla 23. ANOVA de una vía.** Los resultados indican que existen diferencias significativas entre los grupos y que al menos un par no es diferentemente significativo  $p < 0.05$ .



**Figura 62. Gráfica de caja y bigotes.** Diagrama de caja y bigote que muestra la dispersión y simetría de todos los grupos a lo largo de los 6 cambios de luz oscuridad de los animales L. parcial, L. posterior, L. NSQ e intactos para el factor lesión únicamente. Los puntos fuera de las cajas muestran valores atípicos.



Comparison of media by lesion  
(Bonferroni)

Row Mean- Col Mean	L.posteri	L.parcia	L.NSQ
L.parcia	124.264 0.000		
L.NSQ	247.778 0.000	123.513 0.000	
Intactos	272.961 0.000	148.697 0.000	25.1834 0.830

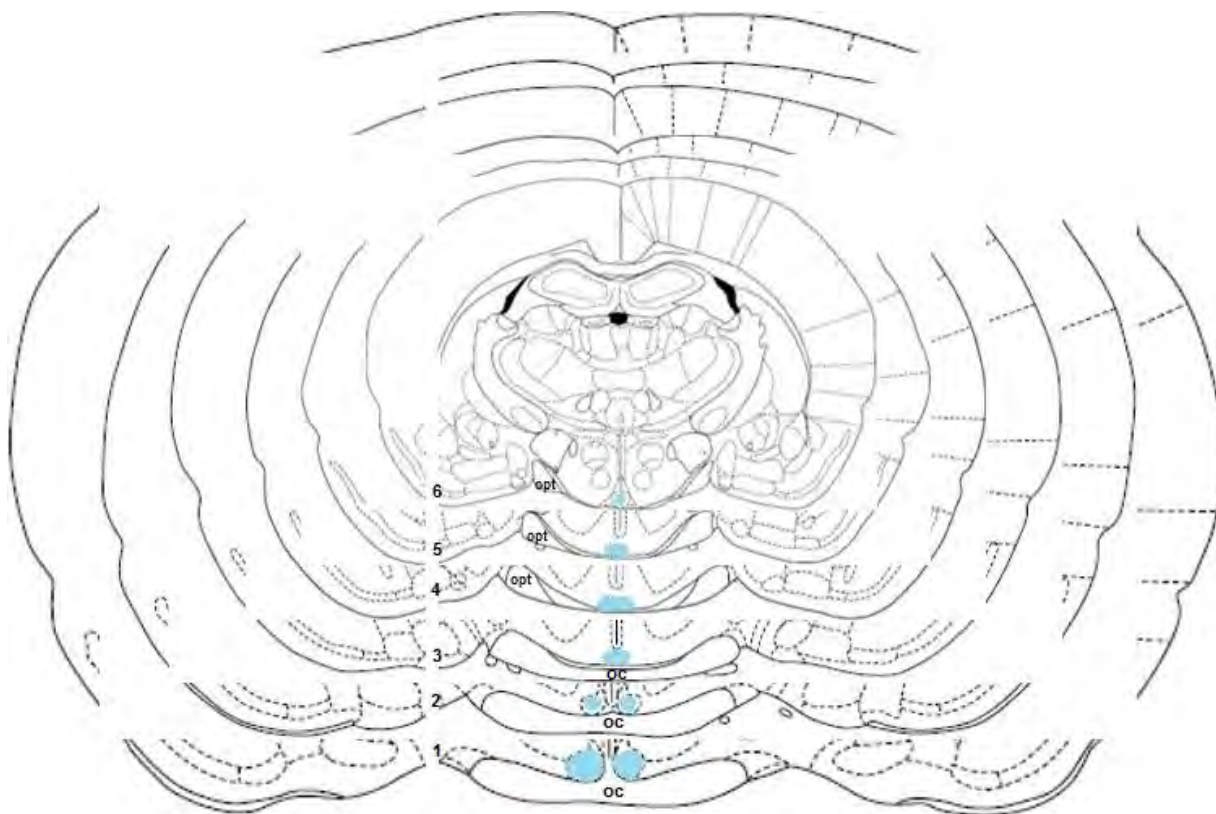
**Tabla 24. Prueba de Bonferroni.** Los resultados indican que existen diferencias significativas entre los grupos L. posterior, L. parcial, con respecto al grupo intacto, no así entre el grupo intacto y el grupo L. NSQ  $p < 0.05$ .

Los cambios ultradianos de luz-oscuridad, tienen un efecto directo (disminución) en la dispersión y nivel de la actividad locomotora, disminuyéndola para el caso de los grupos L. parcial y L. posterior. Para el caso de los grupos L.NSQ vs. Intactos y el factor lesión al hacer una comparación con el grupo L.NSQ, el ANOVA de una vía muestra que no existen diferencias significativas entre los valores medios de ambos grupos.

A partir del concepto de nivel, que expresa la posición en la cual se concentran los valores obtenidos dentro del intervalo de los datos, y del concepto de dispersión, el cual hace referencia a la semejanza entre los valores o con respecto a un valor determinado (la media) (Marsh 1988, citado en Salgado-Ugarte, 2013), se puede concluir con respecto a la comparación del grupo L.NSQ vs. Intactos, que el nivel de los datos entre ambos grupos es muy similar; no así la dispersión de los datos la cual es mucho mayor en el grupo Intacto, teniendo como consecuencia que el resultado de la ANOVA no muestra una diferencia significativa entre los grupos dado que se encuentran en el mismo nivel estadístico.

El hecho de que exista una mayor dispersión de los datos entre los animales intactos y no en los animales L.NSQ podría deberse a que la lesión está afectando directamente en la respuesta abrupta o aguda ante los cambios de luz-oscuridad, así por lo tanto la lesión tiene un efecto en la respuesta directa de la actividad locomotora ante cambios de luz-oscuridad (masking).

En el cuadro 1 se muestra un semblanza de los resultados obtenidos de los distintos grupos experimentales bajo las 3 diferentes condiciones de luz-oscuridad.



**Figura 63. Ilustración de lesiones.** Resumen de las diferentes tipos lesiones realizadas, marcando con azul las áreas que fueron eliminadas por las lesiones electrolíticas. 1. L.NSQ, 2. L. parcial el cual posee remanentes del núcleo que quedaron intactos. 3-6 L. posterior, lesión que eliminó el RCh y la zona más rostral del ARC. Para este tipo de lesión, debe recordarse que el NSQ se encontraba totalmente intacto. OC-quiasm óptico, opt-tracto óptico (Imágenes modificadas de: Paxinos y Watson, 1998).

INTACTOS			L. NSQ		
OC	L/O	CUD	OC	L/O	CUD
<i>Free running</i>	<i>Ritmo</i>	<i>Masking</i>	<i>Sin ritmo</i>	<i>Sin ritmo</i>	<i>Sin ritmo</i>

L. POSTERIOR			L. PARCIAL		
Oc	L/O	CUD	OC	L/O	CUD
<i>Sin ritmo</i>	<i>Masking</i>	<i>Masking</i>	<i>Sin ritmo</i>	<i>Masking</i>	<i>Masking</i>

**Cuadro 2.** Resumen de los resultados obtenidos de los cuatro grupos experimentales bajo las tres condiciones de luz oscuridad. OC: Oscuridad constante, L/O: luz-oscuridad, CUD: Ciclo ultradiano.

## 9. Discusión

---

Los presentes resultados concuerdan con la hipótesis planteada: “Si el NSQ es un reloj endógeno que interacciona con la luz medioambiental ajustando su ciclo interno en un proceso llamado sincronización, entonces la lesión completa del NSQ provocará la desaparición de la sincronización por luz y se alterará la expresión de la actividad locomotora, lo que conducirá a la desaparición del efecto de masking”. Adicional a esto, los presentes resultados aportan y muestran por primera vez la pérdida del control endógeno en la expresión de la actividad locomotora a causa de lesiones electrolíticas que abarcan el RCh y la zona rostral del ARC a pesar de que los animales experimentales poseen un NSQ intacto.

Los datos del presente trabajo contrastan con lo reportado por [Redlin y Mrosovsky \(1999\)](#). Dicho trabajo presenta la idea sobre que el NSQ no es necesario para que el efecto de enmascaramiento se presente. En el intento de explicar de qué forma se medía este efecto, existen diversos trabajos que lo han abordado desde diversos puntos de vista: por medio de la participación de conos, bastones y melanopsina ([Thompson et al., 2008](#)), en animales deficientes de conos y bastones, ([Mrosovsky et al., 2001](#)), con lesiones de la IGL, como modulador a las señales de luz ([Redlin et al., 1999](#)), y con lesiones de la corteza visual ([Redlin et al., 2003](#)) por mencionar algunos, sin embargo no se ha logrado determinar qué región o regiones se encuentran directamente implicadas en el proceso de enmascaramiento, siendo el NSQ el candidato más apropiado debido a que es el núcleo principal que recibe las señales de luz y a que es el generador principal que ejerce las respuestas de los ritmos circadianos, así como su expresión o control de fase.

[Li et al. \(2004\)](#), mostraron que el efecto de enmascaramiento no se presenta bajo ningún fotoperiodo si el NSQ era eliminado, tal y como el presente trabajo lo muestra. El hecho de haber obtenido resultados distintos entre el presente trabajo y lo mostrado por [Redlin y Mrosovsky et al. \(1999\)](#), no puede ser precisado sin embargo a continuación se presentan sus diferencias.

Con respecto al estudio y análisis de las lesiones realizadas, [Redlin y Mrosovsky \(1999\)](#), realizaron tinciones con violeta de cresilo (Nissl) en los cortes histológicos, lo cual consiste en la adición de un colorante que se une a las regiones basófilas de las células. Sin embargo, esta técnica se limita a mostrar la zona lesionada física y visualmente. La importancia de realizar análisis inmunohistoquímicos radica en su capacidad de localizar moléculas específicas mediante el empleo de anticuerpos. En el presente trabajo se realizaron inmunohistoquímicas

para VIP y para el trazador antero-retrogrado CTB, este último para poder precisar que no existieran remanentes de fibras que comunicaran las señales fóticas provenientes del medioambiente, ni tampoco secreciones del neurotransmisor VIP, y así confirmar que la lesión fue total. Trabajos como los de [Satinoff y Posser \(1988\)](#), [Buijs et al. \(1993\)](#), y [Scheer \(2002\)](#), han mostrado la importancia de verificar por examinación inmunohistoquímica los tejidos en cuestión para un neurotransmisor como VIP, el cual es esencial para la señalización y acoplamiento entre las neuronas del NSQ y su correcta oscilación endógena, además de ser una señal precisa acerca de la entrada de luz en el organismo por su localización retinocipiente. Adicionalmente se ha resaltado la importancia del receptor a VIP llamado VPAC2 cuya pérdida deviene en el déficit funcional en la expresión de los ritmos circadianos ([Aton et al., 2005](#)).

En cuanto al análisis de la actividad locomotora en el estudio de [Redlin y Mrosovsky \(1999\)](#), se evaluó la respuesta de los animales ante los estímulos de luz por medio de la rueda para correr, mostrando si estos animales inhibían o no su actividad o el uso de esta rueda representado por medio de actogramas. En el presente trabajo, la actividad fue registrada por medio de sensores, los cuales capturan el movimiento (bins) cada minuto, lo cual asegura un mayor registro y sensibilidad del comportamiento de los animales experimentales a diferencia de la rueda para correr que únicamente registra la actividad si el animal usa o no este aparato. Sin embargo, esto podría no tener una gran diferencia como si lo es el análisis histológico, ya que [Li et al \(2004\)](#), evaluó la actividad locomotora con la rueda para correr con una sensibilidad de 1min por recolección de movimiento o bins, con lo cual se obtuvo un panorama amplio sobre el comportamiento de los animales, como lo es el uso de sensores de movimiento usados en este trabajo.

Para ambos trabajos se tomó como referencia lo propuesto por [Borbély y Huston \(1974\)](#), que consiste en el uso de un fotoperiodo que precisa y diferencia el efecto de enmascaramiento al proceso de sincronización. Este análisis corresponde a un ciclo ultradiano de luz-oscuridad. La única distinción entre el presente trabajo y el de [Redlin y Mrosovsky N \(1999\)](#), es la duración de los ciclos ultradianos elegidos, 4:4 y 3.5:3.5, respectivamente. La elección de este fotoperiodo fue precisada con el fin de cubrir a lo largo de 6 cambios de luz-oscuridad, 4 horas cada uno, 24 horas por día, respetando el ciclo ultradiano en cuestión. En los resultados mostrados por [Redlin y Mrosovsky \(1999\)](#), se incluyeron animales con lesión de NSQ cuya actividad o uso de la rueda para correr se vio afectada de manera que inhibían su actividad durante los tiempos donde la luz se presentó, no así en el presente trabajo.

Fue el periodograma  $\chi^2$  el análisis utilizado para precisar la existencia de un posible patrón periódico en los animales L.NSQ total y en todos los grupos analizados en el presente trabajo. Este análisis es una modificación del análisis de Enright por Solokolove y Bushell, el cual aporta al anterior análisis un nivel de significancia. En el presente trabajo se muestran tres niveles de significancia: 0.05, 0.01, y 0.001. Este tipo de análisis usualmente se utiliza para la determinación de las posibles ritmicidades intrínsecas durante condiciones de corrimiento libre provocadas bajo condiciones de oscuridad constante. Este método ha sido el mejor aceptado para la determinación de periodos circadianos, por su capacidad de discernir y analizar sobre aquellos datos que suelen ser demasiado variables o azarosos (Refinetti, 1993). Por otra parte, el análisis elegido y presentado en Redlin y Mrosovsky (1999), consta del análisis espectro de poder, también conocido como análisis de Fourier, el cual está diseñado para datos muestreados no secuenciales o desiguales en el tiempo, así como para las diferentes formas que pueden tomar los datos en las señales periódicas. Este análisis realiza un cálculo que muestra la significancia de diferentes frecuencias de datos cronológicos y finalmente muestra la periodicidad que se encuentra intrínseca (Blackman y Tukey, 1958; Refinetti *et al.*, 2007). Se ha discutido sobre la precisión de análisis que ofrece este método, el cual no posee una resolución adecuada para las series de datos analizados en el estudio de la biología circadiana (Refinetti *et al.*, 2007).

En resumen, lo mostrado por Redlin y Mrosovsky (1999) es una idea que contrasta con el presente trabajo y concuerda con lo mostrado por Li *et al.* (2004). Para dichos autores no hay duda de que el NSQ no es necesario para el efecto de masking, sin embargo los análisis histológicos no son mostrados en su publicación. Para Li *et al.* (2004), su explicación es sostenida bajo la evidencia de que sus lesiones dañaron o se extendieron hacia la zona paraventricular (SPV), el cual se ha sugerido, es un núcleo de relevo importante del NSQ (Watts y Swanson 1987), así como algunos trabajos han mostrado que podría encontrarse implicado en el proceso de masking y que esta zona responde a los estímulos de luz (de la Iglesia y Schwartz, 2002; Kramer *et al.*, 2001). El presente trabajo no puede ajustarse a esta explicación debido al tamaño de la lesión, sin embargo sería importante evaluar esta propuesta en futuros trabajos.

Por otra parte, el presente trabajo muestra evidencias concisas sobre las lesiones realizadas y corrobora con inmunomarcajes y análisis de periodicidad la ausencia tanto del NSQ como la falta de respuesta del organismo ante los estímulos de luz, por lo cual se propone que el NSQ es necesario para que el efecto de enmascaramiento se presente.

Los resultados obtenidos por los grupos L. parcial y L. posterior, como ya ha sido mencionado, aportan una importante evidencia: que remanentes de NSQ posterior a una lesión, son suficientes para mostrar masking.

El análisis histológico e inmunohistoquímico reveló que la lesión provocada en el grupo L. parcial eliminó de forma parcial el NSQ y se extendió hasta la zona RCH y la zona rostral del ARC. En cuanto al grupo L. posterior, la lesión afectó el RCH manteniendo al NSQ totalmente intacto.

En primera instancia por inspección de actogramas ambos grupos mostraron un comportamiento totalmente arrítmico en condiciones de Oscuridad constante, lo cual fue corroborado mediante los periodogramas  $\chi^2$ , verificando así la falta de un patrón significativo de actividad cada 24 horas, sin embargo estos mismos grupos modificaron la expresión de su actividad cuando el fotoperiodo fue cambiado al ciclo L/O, mostrando un patrón organizacional desde el primer día del cambio de fotoperiodo, destinando principalmente su actividad al periodo de oscuridad, como lo hacen los animales intactos. Estos resultados muestran que ambos grupos se ven influenciados directamente por la luz y que la respuesta expresada es un efecto de enmascaramiento, debido a que el efecto de enmascaramiento es la respuesta producida por dicho estímulo y esta respuesta es abrupta e inmediata ([Aschoff, 1988](#)).

Estos resultados se asemejan a lo reportado por [Li et al. \(2012\)](#), en animales con eliminación del receptor a leptina mediante la inyección del agente tóxico saporina (leptina conjugado con saporina Lep-Sap) en el núcleo ARC, cuyos patrones de alimentación mostraron una organización aparente durante el fotoperiodo L/O y este mismo patrón fue eliminado cuando el fotoperiodo L/O fue cambiado a condiciones DD, así como lo reportado en [Wiater et al. \(2013\)](#), en animales con inyección de Lep-Sap en el ARC, los que presentaron un patrón organizacional de su actividad locomotora en los periodos de L/O no así cuando estos mismos animales se encontraron en condiciones de oscuridad constante.

Durante la exposición de los animales experimentales al fotoperiodo ultradiano, los grupos L. parcial y L. posterior mostraron una inhibición de su actividad por la fase de luz y un incremento de su actividad en la fase oscura de manera inmediata, mostrando que estos grupos de animales son totalmente sensibles a los estímulos de luz, aún más a lo observado en el grupo de animales intactos, donde el efecto de la luz en la actividad no es tan aguda, corroborando así que lo observado en el cambio O.C a L/O era también un efecto de enmascaramiento.

Tomando como base las anteriores evidencias, se sugiere que la lesión interrumpió una vía de comunicación fundamental hacia otros núcleos implicados en la generación del ritmo endógeno

de actividad, o bien que se trate de una interacción intrínseca entre el ARC y el NSQ para las oscilaciones endógenas del NSQ.

En la literatura son escasos los estudios sobre la participación del RCH y del ARC en la señalización y estabilización de los ritmos endógenos de actividad.

En el presente trabajo se propone que el RCH es una vía de paso necesaria para la señalización subsecuente hacia otros núcleos, para la correcta oscilación endógena de la actividad locomotora. Algunos estudios en hamsters han logrado caracterizar y describir la conexión de las señalizaciones provenientes de la retina, las cuales atraviesan el RCH (Canteras *et al.*, 2011; Morin, 1999), extendiéndose hasta el SPZ y el PVN (Jhonson *et al.*, 1988). También existen estudios donde se caracteriza su participación en los efectos que ejerce la luz entrante; por ejemplo el RCH contiene el receptor pre sináptico a serotonina 5-HT<sub>1B</sub> por el cual, la serotonina modula las señales de luz ejerciendo así un efecto de ajuste de los ritmos circadianos, mitigando las entradas de luz que se dirigen al NSQ, reduciendo así los cambios de fase que puedan producirse bajo los efectos que ejerce la luz (Morin, 1999).

Con el trazador anterógrado *Phaseolus vulgaris* leucoaglutinin (PHAL-L), se ha mostrado la participación del área retroquiasmática basal (RCH<sub>b</sub>) en el inicio del proceso inhibitorio nocturno de la producción de melatonina, debido a que su lesión provoca que el proceso inhibitorio por la fotoestimulación inducida de fotoperiodos de corta duración desaparezca. También se ha mostrado que el RCH<sub>b</sub> posee proyecciones directas hacia la zona parvicelular del PVN, el hipotálamo lateral LH, la zona ventromedial del hipotálamo, el ARC, la IGL, la columna intermediolateral (IMLN) de la espina dorsal a nivel torácico}, probablemente de esta forma el RCH<sub>b</sub> controla la secreción de melatonina a nivel del sistema simpático (Ribeiro-Barbosa *et al.*, 1999). Con estas evidencias se muestra que el RCH se ve directamente influenciado por las señales de luz y que forma el sistema circadiano.

La relación existente entre el RCH y el ARC, zonas que fueron lesionadas en el presente trabajo, han sido descritas por trabajos anteriores. Posterior a una inyección directa del trazador H-prolina en el RCH, se demostró que el RCH posee proyecciones que son dirigidas hacia el ARC y el NSQ ventromedial (Swanson y Cowan, 1975). En cuanto al ARC, ha sido reportada la recepción de proyecciones del NSQ y del RCh (Chronwall, 1985).

En general se conoce al ARC por ser un núcleo implicado en los procesos metabólicos homeostáticos, sin embargo poco se ha tomado en cuenta sobre su participación en los procesos de actividad locomotora, o en los procesos de sueño-vigilia. La lesión del ARC en el presente trabajo tuvo como consecuencia la pérdida de las oscilaciones endógenas de



actividad, así como también lo ya mostrado por [Wiater \(2013\)](#) en animales con eliminación del receptor a Leptina. Además de que también se ha mostrado que la restauración de la señalización de leptina en ratones con alelo nulo del receptor de leptina  $Lep^{neo/neo}$ , normaliza la actividad locomotora ([Copari et al., 2005](#)), mostrándose así la relación entre el ARC y la actividad locomotora. Probablemente el ARC, por medio de las señales metabólicas que posee, se encuentre implicado en la señalización para la correcta oscilación endógena de actividad locomotora así como de los ritmos de sueño-vigilia. Se ha mostrado que los neuropéptidos llamados hipocretinas u orexinas se encuentran implicados en la regulación de los ritmos de sueño-vigilia, las cuales se ha sugerido son la conexión entre los estados metabólicos y los estados de actividad-vigilia ([Sakurai T, 2005](#); [Tsujino et al., 2012](#); [Willie et al., 2001](#); [Yamanaka et al 2003](#)). Por ejemplo animales y seres humanos deficientes de estos neuropéptidos manifiestan estados de narcolepsia ([Chemelli, et al 1999](#); [Peyron et al. 1998](#)), así como también concuerda con el hecho de que el momento de mayor actividad de las orexinas se encuentra durante el estado de vigilia, cuando se da la búsqueda por alimento, donde existe una mayor actividad motora ([Mileykovskiy et al., 2005](#)). En modelos *in vitro* se ha demostrado que la orexina A induce un incremento de la tasa de disparo de las neuronas del locus coeruleus así como mediante inyecciones i.c.v de hipocretina1/orexina durante el periodo de luz, induce el estado de vigilia e incrementa la actividad locomotora, el consumo de alimento y la acción de beber agua ([España et al., 2002](#); [Hagan et al., 1999](#)).



## 10. Conclusiones

---

El presente trabajo muestra por vez primera la existencia de una vía de comunicación e interacción primordial entre el NSQ y el área retroquiasmática para el correcto control endógeno y la correcta expresión rítmica de la actividad locomotora. Una ruptura en esta interacción deviene en la falla total del control circadiano y endógeno de la actividad locomotora, dejando al organismo en cuestión operando plena y llanamente bajo los efectos inmediatos de luz o masking.

La lesión del área retroquiasmática tiene como consecuencia un efecto agudo en la expresión del efecto de enmascaramiento, además de disminuir la actividad promedio expresada, en comparación con el grupo intacto.

Por otra parte, sumándose a las observaciones ya reportadas en algunas publicaciones, este trabajo muestra la importancia y necesidad del NSQ para que el efecto de masking exista, mostrando que este efecto opera inminentemente bajo la tutela del reloj biológico.

# 11. Bibliografía

---

**Aguilar-Roblero R, Guadarrama P, Mercado C, Chávez J L.** 2004, El núcleo supraquiasmático y la glándula pineal en la regulación de los ritmos circadianos en roedores. *Temas selectos de neurociencias III*. Ed Javier Velázquez Moctezuma. UAM.

**Ángeles-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):324-334.

**Angelucci A, Clascá F, Sur M.** (1996). Anterograde axonal tracing with the subunit B of cholera toxin: a highly sensitive immunohistochemical protocol for revealing fine axonal morphology in adult and neonatal brains. *J Neurosci Methods*, 65(1):101-112.

**Aschoff J.** (1960). Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*, 25: 11-28.

**Aschoff J, Daan S.** (1981). The entrainment of circadian systems. *Handbook of behavioral neurobiology*. pp. 7-43, Volume 12 of the series.

**Asschoff J.** (1988). Masking of circadian rhythms by zeitgebers as opposed to entrainment. En: *Trends in chronobiology*, Ed. Hekkens W, Th JM, Kerkhof GA and Rietveld WJ, Pergamon Press, Oxford and New York, pp. 149-161.

**Aschoff J.** (1999). Masking and parametric effects of high-frequency light-dark cycles. *Jpn J Physiol.*, 49(1):11-18.

**Aschoff J, von Goetz C.** (1988). Masking of circadian activity rhythms in male golden hamsters by the presence of females. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 22:409-412.

**Aschoff J, von Goetz C.** (1988). Masking of circadian activity rhythms in hamsters by darkness. *J Comp Physiol A.*, 162(4): 559-562.

**Aton SJ, Colwell CS, Harmar AJ, Waschek J, Herzog ED.** (2005). Vasoactive intestinal polypeptide mediates circadian rhythmicity and synchrony in mammalian clock neurons. *Nat Neurosci.*, 8(4): 476-483.

**Bingham C, Arbogast B, Guillaume GC, Lee JK, Halberg F.** (1982). Inferential statistical methods for estimating and comparing cosinor parameters. *Cronobiologia* 9(4): 397-439.

**Blackman R.B, Tukey J.W.** (1958). The measurement of power spectra from the point of view of communications engineering-Part 1. *Bell Labs Technical Journal*. Volume 37, Issue 1, 185-282.

**Borbély AA, Huston JP.** (1974). Effects of two-hour light-dark cycles on feeding, drinking and motor activity of the rat. *Physiol Behav.*, 13(6): 795-802.

**Bothorel B, Barassin S, Saboureau M, Perreau S, Vivien-Roels B, Malan A, Pévet P.** (2002). In the rat, exogenous melatonin increases the amplitude of pineal melatonin secretion by a direct action on the circadian clock. *Eur J. neurosci*, 16(6):1090-1098.

**Brady J.** (1982). *Biological Timekeeping*. Cambridge University Press, Cambridge

**Buijs RM, Wortel J, Van Heerikhuize JJ, Feenstra MG, Ter Horst GJ, Romijn HJ, Kalsbeek A.** (1999). Anatomical and functional demonstration of a multisynaptic suprachiasmatic nucleus adrenal (cortex) pathway. *Eur J Neurosci.*, 11(5):1535-1544.

**Buijs RM, Kalsbeek A.** (2001). Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nat Rev Neurosci.*, 2(7): 521-526.

**Buijs RM, Kalsbeek A, van der Woude TP, van Heerikhuize JJ, Shinn S.** (1993). Suprachiasmatic nucleus lesion increases corticosterone secretion. *Am J Physiol.*, 264(6 Pt 2): R1186-R1192.

**Canteras NS, Ribero-Barbosa ER, Goto M, Cipolla-Neto J, Swanson LW.** (2011). The retinohypothalamic tract: comparison of axonal projection patterns from major targets. *Brain Res Rev.*, 65(2):150-183.

**Cardinali DP, Stern JE.** (1994). Peripheral neuroendocrinology of the cervical autonomic nervous system. *Braz J Med Biol Res.*, 27(3):573-599.

**Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, Elmquist JK, ScamellIT, Lee C, Richardson JA, Williams SC, Xion Y, Kisanuki Y, Fitch TE, Nakazato M, Hammer RE, Saper CB; Yanagisawa M.** (1999) Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell*, 98(4): 437-451.

**Chronwall BM.** (1985). Anatomy and physiology of the neuroendocrine arcuate nucleus. *Peptides*, 6 Suppl 2: 1-11.

**Coppari R, Ichinose M, Lee CE, Pullen AE, Kenny CD, McGovern RA, Tang V, Liu SM, Ludwig T, Chua SC Jr, Lowell BB, Elmquist JK.** (2005). The hypothalamic arcuate nucleus: a key site for mediating leptin's effects on glucose homeostasis and locomotor activity. *Cell Metab.*, 1(1): 63-72.

**De la iglesia HO, Schwartz WJ.** (2002). A subpopulation of efferent neurons in the mouse suprachiasmatic nucleus is also light responsive. *Neuroreport* 13(6): 857-860.

**Dibner C, Schibler U, Albrecht U.** (2010). The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annu Rev Physiol.*, 75: 517-549.

**Dibner C, Schibler U, Albrecht U.** (2010). The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annu Rev Physiol.*, 72:517-549.

**Dunlap J. Jenifer L, De Coursey P.J.** (2004). *Chronobiology. Biological timekeeping.* Sinauer Associates, Inc Publishers. Sunderland Massachusetts, USA.

**Eastman CI, Mistlberger RE, Rechtschaffen A.** (1984). Suprachiasmatic nuclei lesions eliminate circadian temperature and sleep rhythms in the rat. *Physiol Behav.*, 32(3):357-368.

**Ederi I.** (2010). Circadian rhythms. Temperatures communicate by. *Science*, 330(6002):329-330.

**Enright JT.** (1981). Data analysis. In: Aschoff, J., editor. *Biological Rhythms (Handbook of behavioral. Neurobiology).* Vol 4. New York: Plenum. pp- 1-39.

**España RA, Piahn S, Berridge CW.** (2002). Circadian-dependent and circadian-independent behavioral actions of hypocretin/orexins. *Brain Res.*, 943(2): 224-236.

**Fraser JT.** 1987. *Time. The familiar stranger.* University of Massachusetts Press. Amherst, MA, USA.

**Gander PH, Moore-Ede MC.** (1983). Light-dark masking of circadian temperature and activity rhythms in squirrel monkeys. *Am J. Physiol.*, 245(6): R927-R934.

**Golombek DA, Rosenstein RE.** (2010). Physiology of circadian entrainment. *Physiol Rev.*, 90(3): 1063-1102.

**Green DJ, Gillete R.** (1982). Circadian rhythm of firing rate recorded from single cells in the rat suprachiasmatic brain slice. *Brain Res*, 245(1):198-200.

**Gross G, Hendriks J.** (1982). Circadian rhythms in electrical discharge of rat suprachiasmatic neurons recorded in vitro. *Neurosci Lett*, 34(3):283-288.

**Guerra T, Marques Dos Santos MJ, Lopez Reynoso JM.** (2005). Cuaderno de problemas resueltos y propuestos de probabilidad y estadística. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. 2a Edic.

**Hagan JJ, Leslie RA, Patel S, Evans ML, Wattam TA, Holmes S, Benham CD, Taylor SG, Routledge C, Hemmati P, Munton RP, Ashmeade TE, Shah AS, Hatcher JP, Hatcher PD, Jones DN, Smith MI, Piper DC, Hunter AJ, Porter RA, Upton N.** (1999). Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increase arousal in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(19): 10911-10916.

**Hoffman GE, Smith MS, Verbalis JG.** (1993). c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol.*, 14(3):173-213.

**Inouye ST, Kawamura H.** (1979). Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic "island" containing the suprachiasmatic nucleus. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 76(11): 5962-5966.

**Johnson RF, Morin LP, Moore YR.** (1988). Retinohypotalamic projections in the hamster and rat demonstrated using cholera toxin. *Brain Res.*, 462(2): 301-312.

**Kalsbeek A, Palm IF, La Fleur SE, Scheer FA, Perreau-Lenz S, Ruitter M, Kreier F, Cailotto C, Buijs RM.** (2006). SCN outputs and the hypothalamic balance of life. *J Biol Rhythms*, 21(6):458-469.

**Klein DC, Weller JL.** (1972). Rapid light-induced decrease in pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Science*, 177(4048):532-533.

**Kramer A, Yang FC, Snodgrass P, Li X, Scammell TE, Davis FC, Weitz CJ.** (2001). Regulation of daily locomotor activity and sleep by hypothalamic EGF receptor signaling. *Science*, 294(5551):2511-2515.

**Li AJ, Wiater MF, Oostrom MT, Smith BR, Wang Q, Dinh TT, Roberts BL, Jansen HT, Ritter S.** (2012). Leptin-sensitive neurons in the arcuate nuclei contribute to endogenous feeding rhythms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 302(11): R1313-r1326.

**Li X, Gilbert J., Davis FC.** (2004). Disruption of masking by hypothalamic lesions in Syrian hamsters. *J. Comp Physiol A Neuroethol Sens neural Behav Physiol.*, 191(1): 23-30.

**Lomb N.** (1986). Least-squares frequency analysis of unequally spaced data. *Astrophys Space Sci.* 39: 447-462.

**Meijer JH, Rusak B, Gänshirt G.** (1992). The relation between light-induced discharge in the suprachiasmatic nucleus and phase shifts of hamster circadian rhythms. *Brain Res.*, 598(1-2): 257-263.

**Mileykovskiy BY, Kiyashchenko LI, Siegel JM.** (2005). Behavioral correlates of activity in identified hypocretin/orexins neurons. *Neuron*, 46(5): 787-798.

**Moore-Ede MC, Sulzman FM, Fuller CA.** 1982. *The clocks that time us: Physiology of the circadian timing system.* Cambridge, Harvard University Press.

**Moore RY.** (1972). A retinohypothalamic projection in the rat. *J Comp Neurol.*, 146(1): 1-14.

**Moore RY, Eichler VB.** (1972). Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res*, 42(1):201-206.

**Moore RY, Speh JC, Card JP.** (1995). The retinohypothalamic tract originates from a distinct subset of retinal ganglion cells. *J Comp Neurol.*, 352(3): 351-366.

**Moore R.** (1997). Circadian rhythms: basics neurobiology and clinical applications. *Annu Rev Med.*, 48: 253-266.

**Morin LP.** (1999). Serotonin and regulation of mammalian circadian rhythmicity. *Ann Med.*, 31(1): 12-33.

**Morgan JI, Curran T.** (1991). Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Neurosci.*, 14: 421-451.

**Mrosowsky N.** (1999). Masking: history, definitions, and measurement. *Chronobiol Int.*, 16(4):415-429.

**Mrosovsky N, Lucas RJ, Foster RG.** (2001). Persistence of masking responses to light in mice lacking rods and cones. *J Biol Rhythms*, 16(6):585-588.

**Nelson DE, Takahashi JS.** (1991). Sensitivity and integration in a visual pathway for circadian entrainment in the hamster (*Mesomicrotus auratus*). *J Physiol.*, 439: 115-145.

**Paxinos G, Watson C.** (1998). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* Academic Press, San Diego, 474.

**Pevet P, Challet E.** (2011). Melatonin: both master clock output and internal time-giver in the circadian clocks network. *J Physiol Paris*, 105(4-6): 170-182.

**Peyron C, Tighe D, van den Pol AN, de Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG, Kilduff TS.** (1998). Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neural systems. (1998). *J. Neurosci*, Dec 1; 18(23):9996-10015.

**Pittendrigh CS, Daan S.** (1976). A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. IV. Entrainment: Pacemaker as clock. *J comp Physiol*, 106(3), 291-331.

**Ralph MR, Foster RG, Davis FC, Menaker, M.** (1990). Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science*, 247(4945), 975-978.

**Ramos-Vara JA.** (2005). Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol.*, 42(4): 405-426.

**Redlin U, Cooper HM, Mrosovsky N.** (2003). Increased masking response to light after ablation of visual cortex in mice. *Brain Res.*, 965(1-2): 1-8.

**Redlin U, Mrosovsky N.** (1999). Masking of locomotor activity in hamsters. *J Comp Physiol A.*, 184(4): 429-437.

**Refinetti R.** (1993). Laboratory instrumentation and computing: comparison of six methods for the determination of the period of circadian rhythms. *Physiol Behav.*, 54(5): 869-875.

**Refinetti R, Kaufman CM, Menaker M.** (1994). Complete suprachiasmatic lesions eliminate circadian rhythmicity of body temperature and locomotor activity in golden hamsters. *J. Comp. Physiol A.*, 175(2):223-232.

**Refinetti R, Lissen GC, Halberg F.** (2007). Procedure for numerical analysis of circadian rhythms. *Biol Rhythms Res.*, 38(4): 275-325.

**Ribeiro-Barbosa ER, Skorupa AL, Cipolla-Neto J, Canteras NS.** (1999). Projections of the basal retrochiasmatic area: a neural site involved in the photic control of pineal metabolism. *Brain Res.*, 839(1): 35-40.

**Salgado-Ugarte.** (1992). Métodos estadísticos exploratorios y confirmatorios para el análisis de datos. Universidad Nacional Autónoma de México.

**Sakurai T, Nagata R, Yamanaka A, Kawamura H, Tsujino N, Muraki Y, Kageyama H, Kunita S, Takahashi S, Goto K, Koyama Y, Shioda S, Yanagisawa M.** (2005). Input of orexin/hypocretin neurons revealed by a genetically encoded tracer in mice. *Neuron.*, 46(2): 297-308.

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

**Scheer FA.** (2002). Cardiovascular control by the biological clock; neural and neuroendocrine mechanism in human and rat. Ph.D. Thesis. Amsterdam (The Netherlands): University of Amsterdam.

**Scheer FA, Ter Host GJ, van Der Vliet J, Buijs RM.** (2001). Physiological and anatomic evidence for regulation of the heart by the suprachiasmatic nucleus in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 280(3):H1391-H1399.

**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): 154-158.

**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):535-547.

**Schwartz WJ.** (2002). Suprachiasmatic Nucleus. *Curr Biol.*, 12(19): R644.

**Stephan FK, Zucker I.** (1972). Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 69(6): 1583-1586.

**Sujino M, Masumoto KH, Yamaguchi S, van der Horst GT, Okamura H, Inouye ST.** (2003). Suprachiasmatic nucleus grafts restore circadian behavioral rhythms of genetically arrhythmic mice. *Curr Biol.*, 13(8): 664-668.

**Swanson LW, Cowan WM.** (1975). The efferent connections of the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus. *J Comp Neurol.*, 160(1): 1-12.

**Thompson S, Foster RG, Stone EM, Sheffield VC, Mrosovsky N.** (2008). Classical and melanopsin photoreception in irradiance detection: negative masking of locomotor activity by light. *Eur J Neurosci.* 27(8): 1973-1979.

**Tsujino N, Sakurai T.** (2012). Circadian rhythm of leptin, orexin and ghelin. *Nihon Rinsho*, 70(7): 1121-11215.

**van Essevelt KE, Lheman MN, Boer GJ.** (2000). The suprachiasmatic nucleus and the circadian time-keeping system revisited. *Brain Res Brain Res Rev.*, 33(1): 33-77.



**Watts AG, Swanson LW, Sanchez-Watts G.** (1987). Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: I. Studies using anterograde transport of *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin in the rat. *J Comp Neurol.*, 258(2): 204-229.

**Welsh DK, Takahashi JS, Kay AS.** (2010). Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties. *Annu. Rev. Physiol.*, 72:551-577.

**Wiater MF, Li AJ, Dinh TT, Jansen HT, Ritter S.** (2013). Leptin-sensitive neurons in the arcuate nucleus integrate activity and temperature circadian rhythms and anticipatory responses to food restriction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 305(8): R949-R60.

**Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Yanagisawa M.** (2001). To eat or to sleep? Orexin in the regulation of feeding and wakefulness. *Annu Rev Neurosci.*, 24: 429-458.

**Yamanaka A, Beuckmann CT, Willie JT, Hara J, Tsujino N, Mieda M, Tominaga M, Yagami Ki, Sugiyama F, Goto K, Yanahisawa M, Sakurai T.** (2003). Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. *Neuron.*, 38(5): 701-713.

**Zeitler JM, Dijk DJ, Kronauer R, Brown E, Czeisler C.** (2000). Sensitivity of the human circadian pacemaker to nocturnal light: melatonin phase resetting and suppression. *J Physiol., Pt. 3:*695-702.