

**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA  
FACULTAD DE CIENCIAS**



**"CARACTERIZACION DEL NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO  
Y TRACTO RETINOHIPOTALÀMICO COMO SISTEMA  
CIRCÁDICO DEL CONEJO. "**

**T E S I S**

**que para obtener el grado de Doctora en  
Ciencias Biológicas**

**PRESENTA**

**la M. en C. MARÍA REBECA TOLEDO CÁRDENAS**

**DIRECTOR: DR. MARIO CABA VINAGRE**

**ASESOR: DR. RAÚL AGUILAR ROBLERO**

**ASESOR: DR. ENRIQUE CANCHOLA MARTÍNEZ**

**Enero del 2005**

**El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Excelencia del CONACyT y cuenta con el apoyo del mismo Consejo, con el convenio No. PPF-20-93.**

**Esta tesis se realizó con el apoyo de los donativos CONACyT 34652-N, J000-0686 y del NIH/Fogarty, R01TW006636-01 otorgados al Director de la misma, Dr. Mario Caba-Vinagre, Investigador a cargo del Laboratorio de Biología de la Reproducción del Instituto de Investigaciones Biológicas de la Universidad Veracruzana.**

**La autora de la presente tesis, contó con el apoyo de la beca, No. 160300, otorgado por CONACYT.**

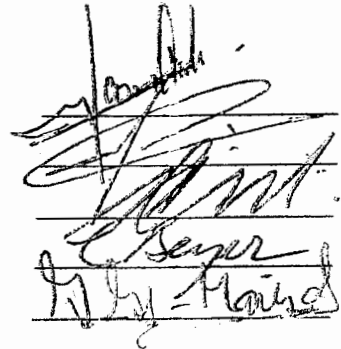
El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de Iztapalapa y Xochimilco aprobó la Tesis que presentó

**María Rebeca Toledo Cárdenas**

El día 31 de enero del 2005.

Jurado:

Director: Dr. Mario Salvador Caba Vinagre  
Asesor: Dr. Raúl Aguilar Roblero  
Asesor: Dr. J. Enrique Canchola Martínez  
Sinodal: Dr. Carlos Beyer Flores  
Sinodal: Dra. Gabriela González Mariscal Muriel



Handwritten signatures of the jury members over horizontal lines. The signatures are: a large signature at the top, followed by a signature that appears to be 'R. Aguilar', then 'C. Beyer', and finally 'G. González Mariscal Muriel'.

## **Agradecimientos**

### **A mis maestros:**

Al Dr. Mario Caba . Mario, te estoy muy agradecida por lo aprendido en tu laboratorio a través de estos años. Gracias también, porque tu constancia y dedicación al trabajo me han mostrado que todo esfuerzo, tiene como fruto la excelencia académica.

Al Dr, Raúl Aguilar Roblero. Investigador del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Gracias por sus críticas siempre constructivas y sus excelentes sugerencias a mi trabajo. Por las facilidades para mi estancia en el IFC, donde sus enseñanzas y tiempo de calidad académica compartidos fueron muy fructíferos.

Al Dr. Enrique Canchola. Investigador del Departamento de Biología de la Reproducción UAM-I. Por su orientación, entusiasmo y comentarios cordiales y amables hacia mi trabajo.

Al Dr, Carlos Beyer. Investigador y Director del Centro de Investigación en Reproducción Animal (CIRA, CINVESTAV-UAT) Ixtacuixtla, Tlax.

A la Dra. Gabriela González-Mariscal. Investigadora del Centro de Investigaciones en Reproducción Animal (CIRA, CINVESTAV-UAT) Ixtacuixtla, Tlax.

Dr. Beyer, Dra, Gabriela, mi sincero agradecimiento por el apoyo y las facilidades para mi estancia en el CIRA durante las primeras etapas de mi trabajo, y sobre todo por su orientación y espíritu crítico pero siempre amable hacia mi trabajo, con mi admiración y respeto.

A la Dra. Carolina Escobar Briones. Investigadora de la Facultad de Medicina de la UNAM. Dra. mi especial agradecimiento para usted, ya que de forma desinteresada, pero muy profesional, aportó invaluable y excelentes comentarios a mi trabajo.

## **A la Universidad Veracruzana:**

Instituto de Investigaciones Biológicas de la UV, bajo la Dirección del M. en C. Gilberto Silva López. Por el apoyo y las facilidades otorgadas por parte del Instituto a tu cargo para poder realizar mi investigación.

Bioterio de la Facultad de Medicina de la UV, a cargo de la Bióloga Mercedes Acosta. Su cuidado hacia los animales y su formalidad en el trabajo siempre fueron determinantes para el éxito de mis experimentos. Muchas gracias bióloga.

## **A mis amigos:**

Al personal académico del CIRA, a los cuales considero mis compañeros y amigos, especialmente a Evelia, Ma. De los Angeles, Rosario y Antonio por su apoyo en las primeras etapas de mi trabajo.

A Violeta Luna, mi apoyo directo con la UAM-I. Viole, sabes sembrar amistad con tu forma de apoyar a los demás...con mi afecto.

Al Dr. Jorge Manzo. Agradezco tu gentileza al orientarme en la parte estadística de mi trabajo, por nuestra amistad de tantos años.

Para Karen, Paola, Kaissa, Yael, Elvira y Claudia; alumnas, compañeras y amigas de laboratorio, por su ayuda y compañía durante este tiempo compartido.

A la Dra. Maria de Jesús Roviroso y el M. en C. Francisco García. Amigos de toda la vida, compañeros incondicionales en mi trabajo, quienes también me han enseñado el valor del trabajo, pero sobre todo, el valor de la una sincera amistad.

A Estela, porque somos amigas.

**Con amor para mi familia.**

**Dedico esta tesis a mi esposo Gilberto Silva y a mi hijo Kevin, por su apoyo, comprensión y amor, siempre han sido mi fuerza para seguir adelante.**

**A mi madre, Dolores Cárdenas y mi abuela Maria Ramos,  
a mis hermanos, Antonio, Leticia e Ivonne,  
gracias por estar siempre conmigo**

## RESUMEN

Estudios cronobiológicos en conejo indican que esta especie presenta ritmos biológicos en diversas conductas como amamantamiento, excreción de orina y heces fecales, entre otros. Sin embargo, la estructura que rige la expresión de los ritmos circádicos en mamíferos, el núcleo supraquiasmático (NSQ), ha sido poco estudiada en esta especie. Por otra parte, no existen estudios del tracto retinohipotalámico (TRH), la vía de entrada directa de la información fótica, desde la retina al NSQ. Esta información es necesaria para sincronizar al NSQ al ciclo ambiental luz-oscuridad.

En la presente tesis se realizaron 4 experimentos, primeramente se caracterizó el TRH tanto de conejos adultos como de neonatos y se determinó si existían diferencias ontogenéticas en sus proyecciones hacia el NSQ y otras regiones hipotalámicas. En los siguientes experimentos se estudió la expresión de la proteína Fos en las condiciones de luz-oscuridad, oscuridad constante, y la respuesta a pulsos de luz en el NSQ de sujetos adultos.

En el primer experimento, se utilizaron conejos Nueva Zelanda blancos en los días postnatales 1 (P01;n=6), 9 (P09;n=4) y adultos (n=5). Los sujetos se perfundieron 3 días después de la aplicación intraocular unilateral de  $\beta$ -toxina de cólera ( $\beta$ -TC) y los cerebros se cortaron en un criostato (50 $\mu$ m). Las secciones se procesaron por el método de inmunocitoquímica utilizando anticuerpos contra  $\beta$ -TC y el complejo ABC. Posteriormente, las secciones se analizaron bajo el microscopio óptico y cámara lucida. En los tres grupos, se observó el marcaje del trazador de la  $\beta$ -TC con una densidad similar bilateral a lo largo de todo el núcleo. Sin embargo en P09 y adultos se observa una tendencia contralateral particularmente en la porción media (en un sentido antero-posterior) del núcleo y ventral hacia el quiasma óptico. La inmunorreactividad a  $\beta$ -TC, se observó en otras estructuras retinorreipientes como la hojuela intergeniculada, el núcleo geniculado lateral dorsal y ventral, el colículo así como áreas hipotalámicas adyacentes, siendo más evidente en los animales P09 y adultos. Estos resultados indican que el TRH está presente desde la edad P01 hasta el adulto aunque hay un marcaje importante del TRH que podría asociarse al momento de la apertura de los párpados el cual ocurre alrededor de P09.

En el segundo experimento, los animales fueron puestos en condición de luz-oscuridad, LD (12:12, encendido de la luz a las 07:00 am. ZT0). Se utilizaron conejas albinas de la cepa Nueva Zelanda, se perfundieron transcardialmente (con paraformaldehído, 4%) cada 4 horas, iniciando una hora después del encendido de la luz. En esta condición se utilizaron 6

grupos (uno para cada horario; n=4). Los cerebros se cortaron coronalmente (50  $\mu$ m) y las secciones se trataron con la técnica de inmunocitoquímica. La inmunorreactividad a Fos (ir-Fos) se observó en el microscopio de luz. En este y los siguientes experimentos se utilizaron secciones tratadas con tinción de Nissl para la delimitación citoarquitectónica del NSQ. Se observó un incremento significativo en el número de neuronas ir-Fos en ZT01 (hora geográfica [hg]-08:00 h) y ZT05 (hg-12:00 h) en comparación con los demás horarios. En el tercer experimento, los animales fueron expuestos a la condición de LD durante 7 días y posteriormente a la condición de oscuridad constante (DD) durante 3 días mas. Se formaron 6 grupos (uno para cada horario; n=4). El tejido se trató por medio del protocolo establecido y se observó un aumento significativo en CT07 (hg-16:00 h) en comparación con los demás horarios. Para el cuarto experimento se formaron 4 grupos (n=4) y los animales fueron sometidos a las condiciones de LD (7 días) y DD (3 días) donde se les aplicaron pulsos de luz (850 lux/30 min) en los horarios de CT03, CT11, CT15 y CT19. Los cerebros y el tejido se trataron con el protocolo establecido y se observó un número significativamente mayor de células ir-Fos en los horarios CT15 y CT19, el cual se presentó principalmente en el área ventrolateral del NSQ con respecto a CT03 y CT11.

En conclusión, se mostró que en el NSQ del conejo, existe un ritmo diurno de Fos en LD, un ritmo circadiano en DD y que solo el área ventrolateral del núcleo es foto-inducible durante la noche subjetiva con respecto a otras áreas del mismo.

El presente trabajo provee por primera vez datos acerca de la distribución de las fibras del TRH en diferentes edades del conejo así como de la anatomía funcional del NSQ en esta especie.

## ABSTRACT

Chronobiological studies in the rabbit indicates that this species presents circadian rhythms in nursing, and in urine and fecal excretions, among others. However, the suprachiasmatic nucleus (SCN) the main circadian clock in mammals had been little studied in the rabbit. On the other hand, there is no studies of the retinohypothalamic tract (RHT) the main entrance pathway from retina to the SCN. This information is necessary to synchronize SCN to enviromental light-dark cicle.

In this thesis we conducted four experiments. First, we characterized RHT in adults and neonatal rabbits to determine possible ontogenetic differences in their projections to the SCN and other hypothalamic regions. In the other experiments, we studied the expression of Fos protein in light-dark condition, constant dark and responce to a light pulse in the SCN adult subjects.

In the first experiment we used New Zealand white rabbits at postnatal day (PD) 1 (n=6), PD9 (n=4) and adults (n=5). Subjets were perfused 3 days latter of one unilateral intraocular injection of cholera toxin  $\beta$  subunit ( $\beta$ -CT) and brains were sectioned with a cryostat (50  $\mu$ m). Tissue was processed by immunocytochemistry with antibodies against  $\beta$ -CT and ABC methods and was analyzed with an optical microscope and camera lucida. In the tree groups we observed  $\beta$ -CT-immunorreactivity (-IR) with a similar bilateral distribution throughtout the nucleus. However at PD9 and in adults the density of fibers have a contralateral tendency in the ventral region of the nucleus, at medium level (in a rostro-caudal plane).  $\beta$ -CT-IR was observed in other retinorrecipient structures as in lateral geniculate nucleus, intergeniculate leafled and colliculus, as well as several hypothalamic areas and nuclei. In conclusion RHT is present since PD1; at PD9 around the time when the eyelides are open, there is an important increase of  $\beta$ -CT-IR in the SCN as well as in the other retinorrecipient areas.

In the second experiment subjects were exposed to a light-dark condition (LD; 12:12, lights on at 07:00 am, ZT0). Rabbit were perfused transcardially with paraformaldehyde (4%) every 4 hours, starting one hour after lights on. We used 6 groups (n=4 each group), and brains were cut (50  $\mu$ m) and processed for Fos-IR. To help in the cytoarchitectonic delimitation of the SCN in this and the following experiments alternate sections were Nissl stained. There was a significant increase in the number of Fos-IR neurons at ZT01 (08:00 h. geographical hour) and ZT05 (12:00 h. geographical hour). In the third experiment subjects were exposed 7 days to LD condition an then to constan darkness (DD) for 3 days. Tissue was processed for Fos-IR as mentioned above and we found a significant increase of Fos-IR, only at CT07 (16:00 h. geographical hour). In the fourth

experiment we exposed subjects to DD condition for 3 days and then to a light pulse (850 lux/30 min.) at CT03, CT11, CT15 and CT19 (n=4 each group). In the last two groups there was a significant increase of Fos-IR neurons in the ventrolateral area of the nucleus against CT03 and CT11 groups.

In conclusion, we found a daily rhythm of Fos in LD, a circadian rhythm in DD and a Fos photoinduction during the subjective night, only in the ventrolateral region of the nucleus.

This thesis report by the first time about retinohypothalamic tract in the rabbit and also about functional morphology of the SCN in this species.

## INDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Características generales del conejo para el estudio del ciclo circádico .....	1
1.2. Ritmos circádicos del conejo adulto en campo ..	1
1.3. Ritmos diarios en laboratorio .....	2
1.4. Ritmos circádicos y sincronización .....	3
2. ANTECEDENTES.....	5
2.1. Ritmos biológicos y su relación con el núcleo supraquiasmático (NSQ) .....	5
2.2. Fisiología del NSQ .....	10
2.3. Localización del NSQ .....	11
2.4. Población celular y divisiones .....	12
2.5. Características de los péptidos del NSQ.....	13
2.6. Neuropeptidos en el NSQ en la rata y el hámster .....	14
3. CARACTERISTICAS GENERALES EN LA FISIOLÓGÍA MOLECULAR DEL c-FOS.....	14
3.1. Jun, Fos y el complejo transcripcional AP-1 .....	14
3.2. c-Fos como marcador de actividad neuronal .....	16
3.3. Pulso de Luz .....	18
3.4. Curva de respuesta de fase .....	20
3.5. El NSQ como sistema multioscilandor .....	20
4. NSQ: VIAS VISUALES Y CONEXIONES .....	21
4.1. El tracto retinohipotalámico .....	21

4.2. El ojo y la retina, punto de partida del TRH.....	23
4.3. Células ganglionares y el TRH .....	25
4.4. Anatomía del TRH y sus áreas blanco .....	27
4.5. Patrones de distribución de las fibras del TRH .....	28
4.6. Ontogenia del TRH .....	29
4.7. Hojuela intergeniculada (HIG) y el tracto geniculohipotalámico (TGH) .....	30
4.8. Sistema visual y circádico en el conejo.....	31
5. JUSTIFICACIÓN .....	32
6. HIPÓTESIS .....	34
7. OBJETIVOS .....	35
7.1. Objetivo general	
7.2. Objetivos específicos	
8. MATERIAL Y METODO .....	36
8.1. Experimento 1. Referencia anatómica del NSQ por medio de la tinción de Nissl.....	36
8.2. Experimento 2. Caracterización del Tracto retinohipotalámico por medio de la inyección del trazador $\beta$ -Toxina del Cólera en conejos de diferentes edades .....	36
Grupo 1 .....	36
Grupo 2 .....	37
Grupo 3 .....	38
8.3. Experimento 3. Expresión de la proteína Fos en el NSQ en condición de luz-oscuridad (LD) .....	38
8.4. Experimento 4. Expresión de la proteína Fos en el NSQ en condición de oscuridad continua (DD) .....	38

8.5. Experimento 5.	
Inducción fótica de la proteína Fos en el NSQ .....	38
9 . TRATAMIENTO DEL TEJIDO.....	39
9.1. Perfusión .....	39
9.2. Inmunocitoquímica .....	39
9.3. Análisis del tejido .....	40
9.4. Análisis estadístico .....	41
10. RESULTADOS .....	41
10.1. Experimento 1.	
Caracterización anatómica del NSQ por medio de la tinción de Nissl .....	41
10.2. Experimento 2.	
Caracterización del Tracto retinohipotalámico por medio del trazador $\beta$ -Toxina del Cólera en conejos de diferentes edades .....	44
-Estructuras retinorecipientes fuera del NSQ: Núcleo Geniculado Lateral (NGL) .....	49
10.3. Experimento 3.	
Expresión de la proteína Fos en el NSQ en condición de luz-oscuridad (LD) .....	51
10.4. Experimento 4.	
Expresión de la proteína Fos en el NSQ en condición de oscuridad continua (DD) .....	51

10.5. Experimento 5.	
Inducción fótica (pulso de luz, PL)	
de la proteína Fos en el NSQ .....	54
-Comparación de la distribución de las	
células ir-Fos en LD, DD y pulso de luz	
(PL) dentro del NSQ.....	54
11. DISCUSIÓN .....	59
11.1. Anatomía general del NSQ en conejo .....	59
11.2. Tracto retinohipotalámico .....	59
11.3. Inmunoreactividad a la proteína	
Fos en LD.....	64
11.4. Inmunoreactividad a la proteína	
Fos en DD.....	66
11.5. Inmunoreactividad a la proteína	
Fos en condición de pulso de luz .....	67
12. CONCLUSIONES GENERALES.....	69
13. BIBLIOGRAFÍA .....	71

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Características generales del conejo para el estudio del ciclo circádico.

Para la mayoría de los mamíferos de zonas templadas la división del día y la noche, es la determinante medio ambiental más significativa para que se lleven a cabo adecuadamente sus actividades conductuales y fisiológicas. La importancia de este ciclo diario se refleja tanto en el patrón de ritmicidad circádica, como en la influencia que ejercen los cambios de estación en el fotoperíodo con respecto al desempeño conductual y reproductivo de estas especies (Hudson y Distel, 1989, 1990).

En particular, una aproximación integrada acerca de los fenómenos circádicos en mamíferos está dada por el conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*). El conejo es una especie clásica para la investigación en laboratorio y campo, ya que existe una gran cantidad de información disponible con respecto a su conducta y fisiología (Manning et al., 1994; Thompson y King, 1994). Como miembro de la clase *lagomorpha*, provee un útil complemento de comparación con otras especies, especialmente con roedores. Otra característica importante es que el conejo posee un gran número de especializaciones conductuales que lo hacen una especie apropiada para el estudio de los ritmos circádicos. En particular, su inusual patrón de cuidado maternal y la demanda de los críos hacia la madre proveen una excelente oportunidad para el estudio del desarrollo e inicio de la función circádica (Hudson y Distel, 1982; Hudson, 1998). A pesar de estas ventajas existe poca información generada dentro de los estudios cronobiológicos en esta especie. Probablemente, una de las razones sea la naturaleza dispersa en cuanto a la disponibilidad de la información, haciendo que pase desapercibida y solo forme parte de una vista general dentro de la biología circádica.

## 1.2. Ritmos circádicos del conejo adulto en campo.

Los conejos silvestres, son esencialmente nocturnos y diariamente despliegan un claro patrón de actividades. Generalmente, salen de sus madrigueras alrededor del crepúsculo, alimentándose en la noche y regresando a sus madrigueras temprano por la mañana (Villafuerte et al., 1994). Este ciclo conductual, está acompañado por claros cambios en varios parámetros fisiológicos incluyendo la concentración de ácidos grasos volátiles en el tracto alimenticio (Hennings y Hird, 1972), latido cardiaco (Eiserman, 1988; Eiserman et al., 1993 ) y defecación (Southern, 1942;

Stephens, 1952, revisado en: Jilge y Hudson, 2001). Por ejemplo, los conejos producen dos tipos de heces, las duras excretadas principalmente de noche, y las suaves denominadas también cecotropos las cuales son reingeridas directamente del ano, iniciando esta conducta alrededor del amanecer, al principio del periodo de descanso y continuando por algunas horas.

Además, la hembra lactante presenta un claro patrón diario de amamantamiento a sus críos con características muy particulares entre los mamíferos. Las crías, nacen en un nido previamente construido por la hembra, utilizando material disponible cerca del nido, así como de su propio pelo. Este nido es construido dentro de una madriguera separada, e inmediatamente después del parto, la hembra deja a los gazapos, cerrando la entrada y regresando únicamente para alimentarlos por unos escasos minutos una vez cada 24 hrs. Se ha comprobado que la primera alimentación la provee temprano por la mañana, justo antes del amanecer, este horario varía por unos minutos diariamente pasando de la luz a la oscuridad (González-Mariscal et al., 1994, 1996; Hudson, et al., 2000). Este cuidado materno tan limitado se ha interpretado como una estrategia para evitar el ataque de depredadores, ya que reduce el riesgo de que puedan localizar el nido y atrapar tanto a la hembra como a las crías, por lo que el tiempo que ésta permanece con los críos se reduce al mínimo (Zarrow, et al., 1965, Hudson y Distel, 1986).

Los ciclos biológicos también tienen influencia de manera importante en la conducta reproductiva de los conejos. Las fluctuaciones anuales están acompañadas de cambios muy importantes del medio ambiente lo que a su vez influye en el tamaño, morfología y apariencia en los órganos reproductivos tanto en machos (Boyd, 1985, 1986; Dahlback y Anderssen, 1981) como en hembras (Anderssen y Meurling 1977; Borg et al., 1978; Walter, et al., 1968 ).

### **1.3. Ritmos diarios en laboratorio.**

En esta especie, se observa que hay consistencia respecto a los ritmos observados en el campo con aquellos registrados en el laboratorio. Estos ritmos abarcan un amplio rango de mediciones tanto fisiológicas como conductuales en cautiverio, incluyendo a aquellos animales que son mantenidos bajo condiciones ambientales controladas para experimentación. Así, por ejemplo, está bien documentado que la actividad locomotora, la ingesta de agua y alimento, la excreción de orina y heces fecales ocurren principalmente en las horas de oscuridad (Van Hof, et al., 1971, Pivik, et al., 1986). Otra característica importante, es que los conejos son animales muy sensibles a las influencias externas o del medio, y las

influencias relacionadas con el cuidado de las colonias o manipulaciones experimentales demuestran que puede existir una predominancia a un patrón diurno de sus actividades (Jilge, 1991). Además de los ritmos conductuales diarios también se incluyen varios parámetros de ritmos fisiológicos tales como, estudios hematológicos (Fox y Laird, 1970), concentraciones de serotonina en tallo cerebral (Gingras et al., 1990), contenido y absorción de ácidos grasos volátiles (Vernay y Marty, 1984; Vernay, 1987), potenciales visuales evocados (Bobbert et al., 1978; Bobbert et al., 1990), presión intraocular (McLaren et al., 1996), inmunología (Vaitukaitis, 1981) y medición de emisión de feromonas tanto en la conducta sexual como en la conducta de amamantamiento (Hudson y Distel, 1990)

Un ejemplo claro de la influencia del fotoperíodo en esta especie, es la que se observa en la conducta de amamantamiento, ya que al igual que en el campo, en laboratorio (condiciones controladas), el amamantamiento toma lugar en la transición de la fase de luz y la fase oscura, cada día sin embargo se observa un ligero avance hasta que finalmente se produce enteramente dentro de la fase de oscuridad (Fox y Laird, 1970; Jilge, 1993). El parto por otro lado, usualmente ocurre por la mañana al principio del periodo de descanso. Este es extremadamente rápido y generalmente no dura más de 10 minutos. Esto sucede, justo cuando el útero es más sensible a la oxitocina secretada durante las horas tempranas de luz (Ferguson, 1941; Fuchs, et al., 1982). Por otro lado, en las horas menos sensibles a la hormona es cuando se lleva a cabo el amamantamiento. Particularmente, en este punto, por cuestiones experimentales en laboratorio, la hora de amamantamiento generalmente puede ser cambiada hacia la fase de luz con solo permitir a la hembra el acceso al nido a una hora determinada (Jilge, 1993)

#### **1.4. Ritmos circádicos y sincronización.**

Existe un gran número de sincronizadores que influyen la conducta de los organismos. Entre los factores ambientales que más influyen sobre los ritmos circadianos, están el alimento y el ciclo luz-oscuridad. Por ejemplo, conejos mantenidos en condiciones de LD (12:12) sometidos a acceso al alimento en un horario restringido a 4 horas dentro de un período de 24 horas (4h/24h), presentan la mayor parte de sus despliegues conductuales alrededor del tiempo donde está disponible este recurso. Este despliegue se observa, aún cuando las 4h de acceso al alimento sea dado en el periodo de luz, ya que, temporalmente, los animales se vuelven diurnos (Jilge y Stähle, 1993). Por otra parte, cuando los animales son mantenidos en condiciones artificiales de luz continua (LL) y un horario de alimento 4h/24h, éstos nuevamente sincronizan su actividad locomotriz, consumo de agua, alimento, excreción de orina y heces fecales alrededor

de este horario. Finalmente, cuando el alimento es reinstalado *ad libitum* se observa que persiste la actividad alrededor del horario al que se les había restringido por varios días (Jilge et al., 1987; Jilge, 1991). En el curso de la sincronización, se observa un importante componente de actividad anticipatoria a la llegada del alimento (Jilge et al., 1987). Estos experimentos proveen una fuerte evidencia de que el conejo, como muchas otras especies de mamíferos (Stephan, 1986; Lax et al., 1999; Mistlberger y Marchant, 1999) poseen un oscilador sincronizado por el alimento. Sin embargo, poco se sabe acerca de los mecanismos neurales que controlan esta sincronización. En este sentido, se ha demostrado, que el sistema de sincronización por alimento es independiente del oscilador de sincronización por luz el cual está asociado con el NSQ, ya que la sincronización por alimento ocurre aún en animales con lesión en el NSQ (Mistlberger, 1992; Marchant y Mistlberger 1997). Cualquier patrón diario que se estudie bajo condiciones ambientales donde no existan sincronizadores externos, muestran y representan un verdadero ritmo circádico endógeno, por lo que sus ritmos dan lugar al corrimiento espontáneo (Hörnigke y Batsch, 1977; Hörnigke et al., 1984; Jilge et al., 1987; Kennedy et al., 1994). En este fenómeno se presenta un periodo estable y una mínima variabilidad diaria, la cual se exhibe claramente dentro de los siguientes días de haberse implementado la condición constante (Jilge y Stähle, 1984). El periodo de corrimiento espontáneo o de libre curso de alguna manera es mayor a las 24 h y se incrementa conforme se incrementa la luz (Hörnigke y Batsch, 1977; Jilge y Stähle, 1993) lo cual esta de acuerdo con la regla de Aschoff (1960) que es típica para las especies nocturnas. Esta regla hace referencia a que entre los factores ambientales que influyen sobre los ritmos circadianos, debe darse un papel más destacado a la luz, la cual influye en la característica esencial de los fenómenos circadianos, el periodo, la relación que existe entre los periodos de actividad y reposo y el nivel de excitación del sistema. La relación entre la cantidad de luz y la actividad del organismo cambia según sea diurno o nocturno. Se ha propuesto que los organismos diurnos aumentan la frecuencia de tres parámetros: la relación entre el tiempo de actividad, el tiempo de reposo y el nivel de excitación, cuando reciben mayor cantidad de luz, en tanto que, en los organismos nocturnos, se reducen estos tres parámetros ante la misma situación ambiental. Esta generalización se conoce como la "regla de Ashoff" y, salvo muy raras excepciones, parece cumplirse en todos los organismos (Aschoff, 1960).

Bajo condiciones constantes de luz (LL) por ejemplo, la actividad locomotora, ingesta de agua y alimento, producción de heces fecales duras y la orina, permanecen en cierta sincronización en el conejo (Jilge, 1984). Sin embargo, en humanos se observa una des-sincronización de diferentes funciones internas en un 25% (Wever, 1979) y en ratas mantenidas en LL,

se observa también una importante pérdida de ritmicidad circádica (Mistlberger et al., 1990; Lax et al., 1999), pero en conejos esto no es tan claro (Jilge, 1984; Bobbert y Bruinvel, 1986). Para el conejo, la sincronización completa después de la restauración del horario de luz-oscuridad (LD), generalmente ocurre en dos pasos, con el tiempo la re-sincronización dependiente de la fase es una relación entre el sincronizador y el ritmo. Mientras que la sincronización se alcanza aproximadamente entre los días 14-20 a la luz, el regreso al patrón original nocturno en el cual se observa con una mínima variabilidad, se presenta en un lapso de 40-65 días (Jilge y Stähle, 1984). Sin embargo poco se sabe acerca del control neural de la entrada y sincronización por luz en conejos, la cual involucra presumiblemente al tracto retinohipotalámico (TRH) y al núcleo supraquiasmático (NSQ) como esta bien establecido para una gran variedad de especies de mamíferos (Moore, 1993, Lucas y Foster, 1999).

Es evidente que el conejo, está claramente organizado como sistema circádico, siendo por lo tanto una especie que puede ser ampliamente utilizada tanto a nivel conductual como fisiológico. Hasta ahora se sabe que existe una clara ritmicidad en un gran número de parámetros fisiológicos y conductuales en presencia de diferentes sincronizadores y en ausencia de estos, ya que en condiciones constantes, estos ritmos permanecen sincronizados por largos periodos de tiempo. Por otra parte, el conejo no solo posee osciladores independientes para la sincronización por luz y alimento, sino que su tiempo de parto y consecuentes visitas de la madre para alimentar una vez al día a las crías, parecen estar también influenciadas por factores endógenos que pueden operar de manera autónoma (Allingham et al., 1998). Sin embargo muy poca información está disponible sobre la fisiología y los mecanismos que se llevan a cabo en la mayoría de estos procesos claramente establecidos en el tiempo y sincronizados por la luz (Jilge y Hudson 2001).

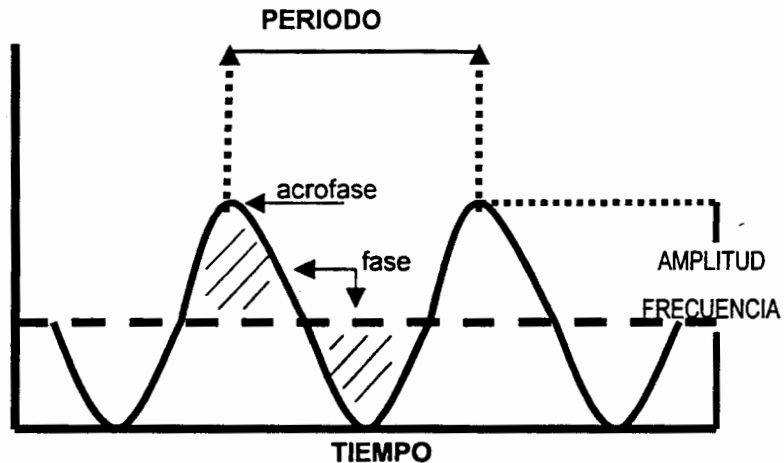
## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. Ritmos biológicos y su relación con el núcleo supraquiasmático.**

Se considera que la ritmicidad es una propiedad fundamental de la materia viva, la cual está presente desde los organismos simples hasta los complejos y su expresión varía de acuerdo con las características particulares de la especie. Estas fluctuaciones son actividades básicas de la vida animal y nos referimos a ellas colectivamente con el término de *Ritmos Biológicos*, por lo tanto los ritmos biológicos son variaciones en las conductas y funciones del individuo que se repiten a intervalos regulares. La

frecuencia de los ritmos en la naturaleza cubre un amplio espectro de unidades de tiempo ya que se pueden observar ritmos que oscilan una vez por fracción de segundo (actividad eléctrica neuronal) hasta los que oscilan una vez por año (hibernación). En este sentido, los ritmos biológicos pueden ser caracterizados en base a cinco parámetros principalmente (Figura 1) El *período* ( $\tau$ ) de un ritmo es el tiempo transcurrido para completar un solo ciclo y se estima en función a la distancia que existe entre un punto de fase (cresta) y el siguiente punto de fase idéntico (la siguiente cresta), 2) la *fase* se refiere a un valor instantáneo de una variable rítmica en un tiempo fijo (cualquier punto ascendente o descendente de los brazos de la cresta), 3) la *frecuencia* se refiere al número de veces que un ritmo se repite en un tiempo determinado, y se expresa como el recíproco del período, 4) *el valor promedio* de un ritmo se define como su nivel promedio en unidades apropiadas, dado sobre un período o al menos un ciclo (la media aritmética de todos los valores instantáneos de una variable oscilante dentro de un período) y 5) la *amplitud* de un ritmo se define como la distancia entre una cresta y la media, medidas en unidades apropiadas (diferencia entre el máximo (o mínimo) y el valor de la media en una oscilación sinusoidal) (Aschof, 1981; Figura 1).

Figura 1. Representación gráfica de los componentes de los ritmos biológicos (adaptado de Granados-Fuentes et al., 1995)



Para los seres vivos, los ritmos más evidentes, son aquellos que oscilan con una frecuencia que corresponde a los ciclos ambientales. En este sentido, uno de los cambios ambientales más evidentes es el que resulta de la rotación de la Tierra sobre su propio eje. Las conductas de actividad y reposo, ingesta de comida, agua, etc. se coordinan con la alternancia del día y la noche. Por otro lado, muchos procesos tales como los fisiológicos o bioquímicos también oscilan con una frecuencia similar a la del día solar (Minors y Waterhouse, 1981). Todas estas fluctuaciones que son actividades básicas de la vida animal forman colectivamente a los

ritmos biológicos. En general la mayoría de estos ritmos se denominan circadianos. Se ha propuesto que los *ciclos circadianos* expresan la organización temporal de los procesos fisiológicos y conductuales para una óptima adaptación al medio ambiente (Armstrong y Chesworth, 1987). De este modo existen ritmos que se repiten con una frecuencia cercana a la de los diferentes fenómenos geofísicos, por ejemplo, las mareas, el ciclo luz-oscuridad, el ciclo lunar, el ciclo anual, etc. Dichos fenómenos biológicos reciben, por lo tanto, el nombre de ritmos circamareales, circadianos, circalunares, y circanuales, respectivamente. Así, se les denomina con el prefijo latino *circa* (cerca o alrededor de) seguido del sufijo correspondiente al ciclo ambiental con el que se sincronizan (Halberg, 1959, revisado en: Escobar y Aguilar-Roblero, 2002).

Otra clasificación de los ritmos biológicos, se ha basado en la frecuencia con que se repite el suceso y se han tomado como referencia a los ritmos circadianos. Así, se denominan ritmos *ultradianos* a aquellos que tienen una frecuencia mayor a uno por día, es decir que ocurren más de una vez durante ese lapso, mientras que se denominan *infradianos* a los que presentan una frecuencia menor a un ciclo por día (Figura 2).

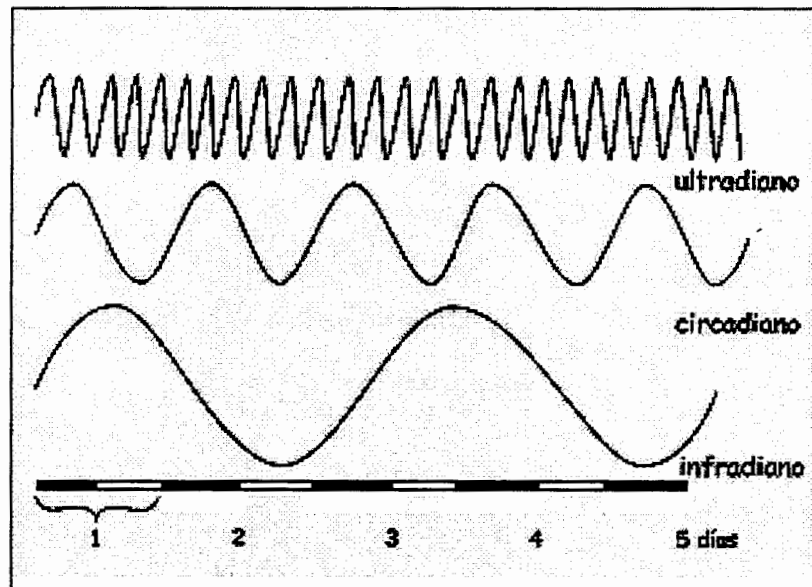


Figura 2. Representación gráfica de la frecuencia propia de los ciclos ultradianos, circadianos e infradianos (tomado de Aguilar-Roblero y Escobar-Briones, 2002)

De acuerdo con lo anterior, es importante enfatizar que los ritmos biológicos no son simplemente la respuesta a fenómenos ambientales cíclicos, si no que, también son procesos endógenos generados por el organismo mismo. Cuando los ritmos biológicos se estudian en condiciones experimentales

constantes, aislados de señales de tiempo, se presentan con una frecuencia cercana (aunque no necesariamente igual) a la que poseen en el entorno natural; en estas circunstancias se considera que los ritmos se expresan *en libre curso u oscilación espontánea (free running)*. (Redman et al., 1983; Harrington y Rusak, 1986; Figura 3 B)

Ya que en condiciones naturales, la frecuencia del ritmo es igual a la de los ciclos geofísicos con los que se relaciona, entonces se dice que están sincronizados con el medio. Esto es, a pesar de su naturaleza endógena, los ritmos circadianos se ajustan constantemente a ciclos ambientales, como, por ejemplo el de luz-oscuridad, de tal forma que el período que manifiestan es de 24-h (Figura 3 A). En este sentido, se utiliza el concepto de Zeitgeber que se atribuye a aquellos estímulos ambientales que son capaces de imponer fase y periodo a un ritmo y el término es sinónimo de sincronizador. Este término proviene del vocablo alemán “el que da el tiempo (Halberg, 1959 ; Aschoff, 1964; Kornhauser, et al., 1990). Por lo tanto, *la sincronización* es la condición en la cual el período endógeno y la fase del oscilador se ajustan al período y la fase del estímulo cíclico externo. Su importancia radica en que permite el ajuste o adecuación del tiempo biológico con el geofísico.

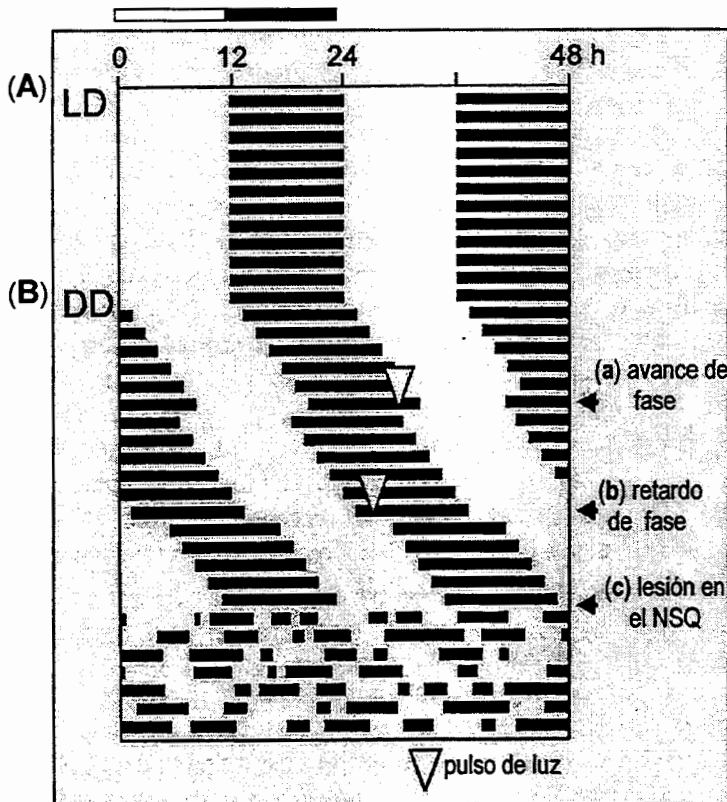


Figura 3. En el ciclo diurno (A) existe un marcador de tiempo que ajusta el tiempo biológico con el geofísico con una exactitud de 24 h. En el ritmo circadiano de “libre curso o corrimiento espontáneo” (B) se expresa el ritmo endógeno del animal, siendo cercano a las 24 h. En este periodo se pueden presentar “adelantos” o “retrasos” de fase si se aplica un estímulo en un momento determinado. (Adaptado de: Van Esseveldt, et al., 2000).

De acuerdo con Pittendrigh (1993) la sincronización provee a los relojes biológicos un mecanismo por el cual los organismos son capaces de

reconocer la hora local, propiedad sin la cual éstos no tendrían relevancia adaptativa. Los fenómenos ambientales por lo tanto, funcionan como estímulos sincronizadores de los ritmos endógenos y siendo las variaciones de iluminación del ciclo día-noche las que presentan la mayor estabilidad en su período y fase los hace más predecibles y por lo tanto se consideran como la principal señal de sincronización ambiental. Las horas en la condición de libre curso se denominan con las letras CT que significan tiempo circadiano y las horas donde hay señal de sincronización ambiental se denominan con las letras ZT que significa tiempo del zeitgeber.

En los organismos, los ritmos circádicos se presentan a través de estructuras que funcionan como *un reloj biológico*. Este reloj, es la parte del sistema circádico que tiene la capacidad de generar una oscilación usada por el animal para medir el tiempo aún en ausencia de señales cíclicas ambientales. En particular, para los mamíferos el *núcleo supraquiasmático* (NSQ) es la estructura cerebral que funciona como el reloj principal que coordina a todo el organismo (Gillette y Tischaku, 1999). Este sistema circadiano está constituido también por otros osciladores, sin embargo el NSQ es el que sincroniza y dirige a la actividad rítmica de estos osciladores y en general la actividad de todo el organismo (Inouye, 1983; Figura 4).

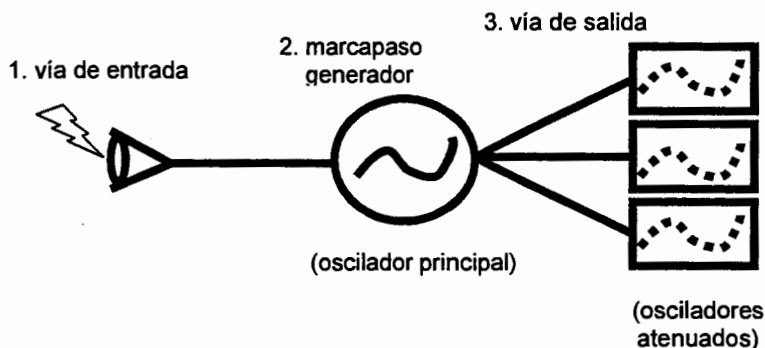


Figura 4. El sistema circadiano del NSQ consiste de 3 elementos: 1) vía de entrada, 2) marcapaso generador, 3) vía de salida (adaptado de Kriegsfeld et al., 2002)

Para entender la naturaleza endógena de los ritmos circádicos es necesario entender la existencia de los mecanismos fisiológicos encargados de generar y mantener la organización temporal del organismo (Halberg, 1959; Pittendrigh, 1993), los cuales conforman al denominado sistema circádico. Los procesos que regulan a este sistema son: 1) *Cronometría*, que se refiere a la generación de las oscilaciones involucradas en la función de reloj biológico; 2) *Sincronización* de la ritmicidad de los ritmos ambientales; 3) *Transmisión* de las oscilaciones a los sistemas efectores que expresan la ritmicidad y 4) *Acoplamiento* entre los osciladores del organismo para lograr su funcionamiento coordinado. El sistema circadiano también permite anticiparse y prepararse a eventos del ambiente que son

predecibles, las cuales son características importantes para su sobrevivencia.

Debido a la importancia demostrada del NSQ como el oscilador circádico en mamíferos, es de suponer que sus conexiones aferentes están involucradas en el proceso de sincronización. Las principales aferentes del núcleo se originan de la retina, la hojuela intergeniculada (HIG), el rafé dorsal y las áreas hipotalámicas adyacentes (Moore y Lenn, 1972). Algunas de estas vías también participan en diversos aspectos de la sincronización al ciclo de luz ambiental.

## **2.2. Fisiología del NSQ.**

En los primeros estudios realizados para localizar el marcador de tiempo circádico, se indicó que éste se ubicaba en el hipotálamo anterior, pero la localización precisa no era clara (Ritcher, 1967). Posteriormente, en base al método de trazador autorradiográfico, se demostró que existía una proyección directa desde la retina hasta el NSQ denominada tracto retinohipotalámico (TRH; Moore y Lenn, 1972), con lo cual se infirió que el NSQ era el lugar donde se localizaba el oscilador circádico. En subsecuentes experimentos se mostró que al realizar lesiones del NSQ, disminuían significativamente las funciones circádicas de parámetros tales como el ritmo de secreción de la corticosterona adrenal, la ingesta de líquidos y la actividad locomotora en roedores con lo que se incrementó la certeza de que la actividad circádica se localizaba en el NSQ (Moore y Eichler, 1972; Stephan y Zucker, 1972).

Posteriormente se demostró que el aislamiento del NSQ en animales intactos daba como resultado la pérdida del ritmo circádico en la actividad eléctrica de regiones cerebrales que lo rodeaban (Inouye y Kawamura, 1979, 1982; Meijer y Rietveld, 1989). Por otro lado, al realizar pruebas de la actividad multiunitaria electrofisiológica en el NSQ aislado se observó que el ritmo de disparo se mantenía oscilando durante varios días. Esto es, el NSQ aislado mantenía un ritmo intrínseco de actividad eléctrica, pero no así las zonas adyacentes separadas quirúrgicamente de él. La comprobación final de que el NSQ es el principal marcapaso se obtuvo realizando trasplantes del tejido, donde se demostró que la sobrevivencia del tejido proveniente del NSQ es crítico para la restauración de la ritmicidad cuando se ha lesionado el mismo (Drucker-Colín et al., 1984; ; Lehman et al., 1987; Aguilar-Roblero, et al., 1986, 1992, 1994). Aunque se realizaron otros estudios que confirmaban tal descubrimiento, todavía no era claro si el efecto del trasplante estimulaba la función perdida del animal lesionado o si presentaba el ritmo del hospedero. Posteriormente, se demostró que el

trasplante del NSQ fetal del hámster mutante *Tau* restauraba la ritmicidad en el hospedero pero con el período del donador (Ralph et al. 1990).

En base a estos datos se demostró que el NSQ es el marcapaso circádico responsable de proveer una organización temporal en las funciones del organismo ya que transmite la fase de muchos ritmos endócrinos y fisiológicos en el cuerpo y de otros osciladores que ahora se sabe están presentes en diferentes tejidos (Balsalobre et al., 1998). Con estos estudios se propuso que la organización funcional del NSQ y los medios por los cuales es regulado, dan lugar a que los elementos del medio interno estén organizados en una secuencia temporal apropiada para permitir al organismo una máxima adaptación hacia el medio externo (Gillette y Tischaku, 1999).

### **2.3. Localización del NSQ.**

El NSQ se distingue claramente en el cerebro ya que está localizado en las inmediaciones del área hipotalámica anterior, es bilateralmente pareado, (uno a cada lado del tercer ventrículo) y está formado por neuronas y fibras, localizadas sobre la parte superior del quiasma óptico (QO) (Card y Moore, 1989; Van den Pol, 1991). Las dimensiones y el número de neuronas en el núcleo puede variar dependiendo de la especie. En ratas, por ejemplo, se ha reportado que mide aproximadamente 300  $\mu\text{m}$  mediolateralmente, 300  $\mu\text{m}$  dorsoventralmente y 750  $\mu\text{m}$  rostrocaudalmente (Johnson, et al 1988), en hámsters, por otra parte, las medidas aproximadas son 300  $\mu\text{m}$ , 250  $\mu\text{m}$  y 650  $\mu\text{m}$  respectivamente (Johnson, et al 1988). En cuanto al número de células también se reportan variaciones que van desde 16000 células en roedores hasta 70 000 células en el humano (Buijs et al., 1998). El NSQ de los mamíferos, es pequeño en comparación con otros núcleos del área hipotalámica y en general presenta células pequeñas y ovals (12-15  $\mu\text{m}$  de diámetro), con neurófilos y elementos gliales, particularmente astrocitos (Van den Pol , 1981; Van den Pol y Tsujimoto, 1985).

En base a su estructura dendrítica, (marcadas con neurobiotina) se han identificado cuatro tipos de neuronas: monopolares, radiales, bipolares simples y bipolares rizadas (Jiang et al., 1997; Pennartz et al., 1998). Las células bipolares simples se presentan en mayor número y las radiales en menor cantidad. Las células bipolares simples son clasificadas como las neuronas eferentes del NSQ (Jiang et al., 1997; Pennartz et al., 1998). De manera interesante, no hay exocitosis dendrítica ni sináptica en comparación con la exocitosis dominante de las terminales axónicas. Utilizando la técnica del ácido tannico se ha observado una liberación dendrítica de los péptidos lo que al parecer es altamente relevante para los mecanismos de marcapaso del NSQ (Castel et al., 1996).

## **2.4. Población celular y divisiones.**

De acuerdo a estudios morfológicos y fisiológicos, el NSQ se ha dividido en un área rostral pequeña y un área caudal grande, las cuales a su vez están constituidas por un componente dorsomedial (DM, corteza) y un componente ventrolateral (VL, centro o núcleo) formados por poblaciones neuronales secretoras de péptidos (Moore, 1983). El componente DM se caracteriza por presentar neuronas pequeñas y alargadas, con núcleos grandes y pocos organelos. Estos grupos de neuronas están muy compactos y están interconectados por aposiciones somato-somáticas, dando como resultado cadenas de neuronas arregladas en una dirección antero posterior (Leak et al., 1999). La parte VL del NSQ se caracteriza por una gran cantidad de neuronas, las cuales son esféricas y tienen un citoplasma rico en organelos (Leak et al., 1999). Estas células tienden a estar separadas por células gliales que encapsulan completamente a las uniones sinápticas dentro del NSQ-VL (Güldner y Wolf, 1996) y se comunican unas con otras a través de uniones gap (Van den Pol 1980, Welsh y Reppert, 1996). Las neuronas de la porción VL del núcleo, son más abundantes sin embargo, en la porción DM se observa una mayor cantidad de sinápsis de tipo axo-somáticas y axo-dendríticas en comparación con la porción VL. Además de este conjunto celular, en el NSQ también se observa una gran cantidad de interneuronas y fibras que acentúan sus subdivisiones (Van den Pol y Tsujimoto, 1985; Moore, 1992). Otra característica anatómica importante presente en el NSQ es que recibe entradas visuales directas desde la retina principalmente hacia el área VL la cual manda proyecciones al área DM, esta a su vez, provee una gran cantidad de proyecciones hacia el resto del hipotálamo pero con escasas proyecciones al área VL (Moore, 1982, Moore y Silver, 1998).

A través de la técnica de inmunocitoquímica, ha sido posible localizar con mayor precisión la distribución y la naturaleza peptídica de los grupos neuronales que se concentran en las subdivisiones específicas mencionadas (Van der Pol y Tsujimoto, 1985; Moore, 1992). A pesar de que se han identificado una gran cantidad de péptidos en el NSQ, los que caracterizan al mayor grupo celular en la rata son cinco: arginina vasopresina (AVP), somatostatina (SS), péptido intestinal vasoactivo (VIP) péptido liberador de la gastrina (GRP), calbindina (CaB) y calretinina (CAR+). Particularmente en hámsters, se ha identificado a la calbindina (CaB) que pertenece a la misma familia de péptidos que la CAR+ como una subpoblación muy importante del NSQ (LeSauter y Silver 1999 ). Todos estos péptidos tienen una distribución discreta tanto en la zona DM como VL del núcleo.

En un principio, Vandensande y colaboradores (1975) describieron la distribución de las neuronas de arginina vasopresina (AVP). En sus estudios (como en posteriores) se confirmó que estas células están localizadas en una capa rostral que se dirige hacia la parte medial, central y caudal del NSQ. Otro grupo de neuronas que contienen calretinina (CAR+) se presentan lateral y dorsalmente dentro del área caudal del núcleo. Estos dos grupos de neuronas, por lo tanto, comprenden principalmente al área DM (Moore, 1996). Por otra parte, en la porción ventral del NSQ encima del quiasma óptico (QO), se observa un gran grupo de neuronas inmunorreactivas al péptido intestinal vasoactivo (VIP) con algunas de sus fibras intercaladas hacia el QO. Este grupo de neuronas, co-localizan con una pequeña población de neuronas del péptido liberador de la gastrina GRP (Moore, 1996) que en su conjunto representan al área VL (central) del NSQ. En cuanto a la distribución de las neuronas de CAR+ y CaB, esta no es tan clara en roedores, aunque existe una importante tendencia de distribución hacia el área dorsal, sin embargo en hámsters se ha comprobado que están localizadas principalmente en el área VL del NSQ, e inclusive a este conjunto celular se le considera un subnúcleo dentro del NSQ (LeSauter y Silver 1999).

## **2.5. Características de los péptidos del NSQ.**

La gran cantidad de péptidos que existen en el NSQ son conocidos como neuropéptidos o neuromoduladores (Van den Pol y Tujimoto, 1985; Watts and Swanson 1987; Card et al., 1988), estos, son liberados desde las terminales nerviosas y mandan la información hacia otras células blanco. Van den Pol (1991) menciona un hecho notable dentro de las características morfológicas intrínsecas del NSQ, y es que la mayoría de sus conexiones neuronales son intranúcleo. En estos estudios se postula que el 70% de las neuronas blanco quedan dentro del mismo NSQ. De ahí que el conocimiento de los valores del contenido de los péptidos dentro del NSQ, puede dar un significado a la diversidad celular dentro del marcador de tiempo circádico. Mas aún, los cambios en el contenido peptídico parecen mas bien ser derivados de cambios en los niveles del ácido ribonucléico mensajero (ARNm) (Inouye, 1996). Mientras que los niveles de ARNm, son regulados en parte por mecanismos celulares, se observa que existe una correlación entre la abundancia del péptido y su ARNm. Esto sugiere que la fluctuación circádica de los niveles del péptido es el resultado de la maquinaria intracelular dentro del NSQ. Cuando un neurotransmisor es caracterizado en el NSQ, este muestra oscilaciones circádicas bajo condiciones constantes de oscuridad, la posible fuente de esta oscilación podría ser trazada a lo largo de la cascada de sustancias neuroquímicas desde las moléculas hasta que se alcanza la red celular (Inouye, 1996).

## **2.6. Neuropéptidos en el NSQ de la rata y el hámster.**

La disposición anatómica y funcional del NSQ está presente en la mayoría de los mamíferos, sin embargo es evidente que no es igual en todas las especies. Las especies más estudiadas hasta el momento en este sentido han sido la rata y el hámster donde se observan similitudes significativas, pero también importantes diferencias. En cuanto a la distribución peptídica, el hámster, a diferencia de la rata, presenta neuronas de AVP con una distribución mas bien dispersa ya que, aunque están localizadas en la porción dorsal del núcleo, también se observan en las áreas media y VL del mismo. También existen neuronas de CAR+ dispersas prácticamente en el mismo sitio, pero en menor proporción que en la rata, como consecuencia, esta población forma una corteza parcial en el NSQ. Otra característica importante en el NSQ del hámster, es la presencia de neuronas inmunoreactivas a Fos por inducción de la luz en el área central, y en la misma región existe una densa población de células que contienen calbindina-D<sub>28K</sub> (CaB) formando un subnúcleo definido (Silver, et al., 1996) a diferencia de la rata donde este subnúcleo es menos evidente. A pesar de las diferencias entre estas especies estudiadas, los resultados obtenidos demuestran claramente que las subdivisiones existentes en el NSQ (centro y corteza) son tanto de forma como de función y que al parecer estas características están presentes en otras especies (Cassone et al., 1988) incluyendo al humano (Moore, 1992).

## **3. CARACTERÍSTICAS GENERALES EN LA FISIOLÓGÍA MOLECULAR DEL C-FOS**

### **3.1. Jun, Fos y el complejo transcripcional AP-1.**

En la última década, se han realizado estudios que han indicado que la expresión de los genes tempranos pueden reflejar cambios en la actividad celular. Uno de estos, el gene c-fos, ha sido particularmente útil para el estudio de esta actividad (Sheng y Greenberg, 1990; Schwartz et al., 1995, 2000). El c-Fos, es una fosfoproteína producto con un peso molecular de 55 kd y forma heterodímeros con las proteínas Jun (diferente forma de producto genético proveniente de la misma familia; Hoffman et al., 1995). Los genes jun y fos fueron identificados en un principio como los oncogenes v-jun y v-fos, presentes en el genoma del virus del sarcoma aviar 17 y de los virus FBJ y FBR. Los homólogos celulares de ambos oncogenes codifican proteínas que son factores de transcripción y dimerizan para formar el complejo de transcripción denominado AP-1 (Activating Protein-1; Curran et

al., 1988; François-Bellan et al., 1999, 2000 ). Cada uno de ellos se engloba en una familia de proteínas con actividad transcripcional más amplia: la familia Jun, formada por c-jun, junB y junD; y la familia Fos, formada por c-fos, fosB, fra-1 y fra-2 (Cohen y Curran, 1988). El factor AP-1 puede estar compuesto por homodímeros formados por dos miembros de la familia Jun o por heterodímeros entre un miembro de la familia Jun y un miembro de la familia Fos. No se forman homodímeros entre miembros de la familia Fos. AP-1 es un factor de transcripción que regula la expresión de genes inducidos por factores de crecimiento y promotores tumorales, como los ésteres de forbol. El complejo AP-1 se une a la secuencia de ADN TGACTCA desde donde regula la transcripción de los genes adyacentes, los cuales producen un complejo de proteína nuclear que se detecta con anticuerpos generados contra secuencias de c-Fos (Rauscher et al., 1988).

Las proteínas Fos y Jun presentan claras homologías estructurales, como son el dominio de unión al ADN y el dominio encargado de la actividad transcripcional. El dominio de unión al ADN presenta dos subregiones, una rica en aminoácidos básicos, responsable de la unión al ADN, y otra responsable de la dimerización, denominada cremallera de leucinas. La actividad biológica de las proteínas Jun y Fos está regulada por fosforilación. En el caso de Jun, la fosforilación de dos serinas situadas en la región aminoterminal, junto a la región d, induce un incremento de su actividad transcripcional. Esta fosforilación está mediada por la serina/treonina quinasa JNK (Jun N-terminal Kinase), que interacciona con Jun precisamente en la región d, en respuesta a distintos estímulos, como factores de crecimiento o señales de estrés. La proteína Fos también es activada por fosforilación por otras kinasas activadas por factores de crecimiento, como las ERKs. Las alteraciones que presentan las formas oncogénicas de estas proteínas impiden su regulación e incrementan su nivel de expresión, dando como resultado una actividad transcripcional permanente (François-Bellan et al., 1999, 2000) .

En general, la hipótesis de que los oncogenes nucleares juegan un papel central en los acontecimientos involucrados en la actividad celular implica que tanto su ARN mensajero como sus proteínas tienen una vida media muy corta. Por lo tanto, los cambios en la transcripción de estos genes dan lugar a rápidas fluctuaciones en los niveles de ARNm y su proteína (Sheng y Greenberg, 1990). El hecho de que la mayoría de las neuronas sintetizan c-Fos a niveles indetectables, principalmente, bajo condiciones basales, se relaciona con la observación de que una gran variedad de estímulos normales incrementa la producción de esta proteína, lo que permite la posibilidad de utilizar a c-Fos como un marcador en el estudio de la función neuronal.

### **3.2. c-Fos como marcador de actividad neuronal.**

En la investigación de fenómenos neuronales, se ha utilizado a la inmunocitoquímica como herramienta para identificar patrones de actividad neuronal en base a la detección de la proteína Fos. Esta actividad puede estar asociada con un ritmo de actividad endógena o bien a un estímulo. El gene c-fos que la produce, pertenece a la familia de los genes inmediatos tempranos (IEGs) que codifican para proteínas de enlace nuclear las cuales son expresadas rápida y transitoriamente en respuesta a una gran variedad de señales (Sheng y Greenberg, 1990). En la célula estos genes tempranos codifican para una gran cantidad de factores reguladores transcripcionales. Algunos de estos incluyen a los miembros de las familias Fos y Jun (Morgan y Curran, 1991). Se ha propuesto que los IEGs funcionan como terceros mensajeros mediando cambios en la expresión de los genes y convirtiendo las señales extracelulares de corto plazo a cambios intracelulares de largo plazo (Morgan y Curran, 1991; Robertson, 1992). La expresión de este gene no está necesariamente relacionada con la actividad electrofisiológica de las neuronas, sino mas bien con algunos cambios en su estado funcional, requiriendo la expresión del gene (Sagar et al., 1988). La falta o presencia de la expresión de la proteína c-Fos es un indicador confiable de cambio en la actividad neuronal (Chiasson et al., 1998, Rocha y Kaufman 1998). En este sentido, el control transcripcional de los procesos moleculares que constituyen a los mecanismos del reloj en los fenómenos circádicos juegan un papel importante.

En mamíferos, los pulsos de luz pueden estimular la expresión de proteínas reguladoras transcripcionales en el NSQ. Los estudios mas intensivos de estas proteínas han sido con c-Fos y JunB (Hastings et al., 1995, Kornhauser et al., 1996; Schwartz et al., 2000). En este caso, la luz que induce la expresión del gene c-fos en el NSQ tiene el mismo umbral, magnitud y fase dependencia que la luz que induce los cambios de fase o los ritmos conductuales u hormonales (Trávnícková et al., 1996). Una vez expresado el c-Fos afecta la transcripción de los genes blanco por enlaces que preferencialmente se unen a elementos reguladores de ADN específicos (AP-1) pero solo cuando está conformada como heterodímero, especialmente como un miembro de las proteínas de enlace del DNA de la familia Jun (François-Bellan et al., 1999, 2000). La expresión de las proteínas Jun, no está arreglada coordinadamente en el NSQ, lo que da como resultado la generación de complejos de enlace AP-1 con componentes proteínicos constantes y variables (François-Bellan et al., 2000; Takeuchi et al., 1993, Vogt y Bos, 1990). Por otra parte, JunD parece ser una mezcla constituida de complejos que se expresan tanto en

oscuridad como en luz, mientras que la proteína inductiva Fos y la proteína constitutiva JunB aparecen principalmente después de estimulación fótica. Se infiere por lo tanto, que la luz es el principal estímulo para la inducción de ARNm de c-fos y junB así como de sus proteínas en el NSQ. Esta inducción, también se correlaciona de manera importante con los efectos de la luz en los cambios de fase en el ritmo circádico, (Rusak y Zucker, 1979; Chambille et al., 1993). Además, prevenir la acumulación de las proteínas c-Fos y JunB con antisueros de oligonucleótidos, puede bloquear los cambios de fase inducidos por luz en ratas (Schwartz et al., 1996) esto, apoya la idea de que c-Fos y JunB juegan un papel esencial en los mecanismos que subyacen al reinicio fótico en el reloj circádico.

Otras propiedades en la expresión de c-Fos y JunB en el NSQ por efecto de la luz, es que tienden a una expresión regionalizada ya que se presentan principalmente en áreas del NSQ inervadas por la retina. En roedores por ejemplo, la entrada retinal se observa principalmente en el área ventral del núcleo donde también la expresión de Fos es más evidente. Por otra parte, en hámster, la entrada retinal se observa tanto en el área ventral como dorsal y la expresión de Fos es más dispersa, sin embargo, también se observa una tendencia hacia el área ventral del núcleo (Earnest, et al., 1990; Abe y Rusak 1994;). Estas áreas, inervadas preferencialmente por la retina, tienen entradas tanto directas, vía TRH como indirectas, vía la hojuela intergeniculada lateral (IGL) a través del tracto geniculohipotalámico (GHT; Earnest, et al., 1990).

Por otro lado, poco se sabe acerca de la expresión espontánea de c-Fos en el NSQ de roedores. Algunos estudios reportan que existe un incremento espontáneo en la expresión del ARNm durante la noche subjetiva tardía en el área VL del NSQ de ratas (Sutin y Kilduff 1992). En hámster, por otro lado, se describe que existe la expresión espontánea de la proteína c-Fos, la cual está restringida a la porción rostral del NSQ a la mitad del día subjetivo (Chambille et al., 1993). También se ha reportado que existe un ligero incremento en los niveles de la expresión de c-Fos durante el día, en el área dorsal del NSQ de rata *in vivo* (Earnest et al., 1990). Además, aunque se ha mostrado que la expresión de JunB incrementa espontáneamente y dramáticamente justo antes del amanecer (Guido et al., 1996) hay poco acuerdo de como y donde se presenta esta expresión espontánea de otros IEGs en las células del NSQ. Otra serie de estudios reportan que la ritmicidad de c-Fos y JunB, tanto en ratas como en hámsters, presentan una expresión del ARNm y sus proteínas con los picos de expresión más elevados durante el amanecer subjetivo, esta expresión está confinada principalmente a las regiones dorsales del NSQ (Guido et al., 1999, Schwartz et al., 2000, Sumová et al., 1998). Sin embargo, el papel de la regulación transcripcional de la expresión de los genes para los complejos de las proteínas c-Fos y Jun en la circuitería neuronal de esta

parte del NSQ es desconocido. El NSQ dorsal es anatómicamente y neuroquímicamente distinto a la región ventral y se le ha implicado en una gran variedad de funciones incluyendo entrada fótica en hámsters y la modulación de la salida del reloj circádico en ratas. (Edelstein et al., 2000).

### 3.3. Pulso de Luz.

Se ha demostrado que al aplicar pulsos de luz a diferentes horarios en condiciones constantes de oscuridad, los genes tempranos (IEGs), tal como el *c-fos* se inducen en el NSQ de hámsters (Kornhauser et al., 1990; Rusak et al., 1990a; Leard et al., 1994) y ratas (Rusak et al., 1990a; Sutin y Kilduff, 1992). La correspondencia entre el tiempo al cual la luz, puede inducir IEGs y provocar un cambio de fase ha permitido sugerir que los IEGs podrían ser parte de un mecanismo molecular que subyace a los cambios de fase por inducción de luz.

Como se ha explicado, en ausencia de señales externas, los ritmos circádicos generados por estos relojes endógenos corren con una periodicidad diferente a las 24 h. En animales expuestos a oscuridad continua, los cambios de fase o reinicio del reloj ocurren en respuesta a estímulos fóticos presentados durante la noche subjetiva (periodo activo en animales nocturnos). Estos cambios de fase son fase-dependientes: esto es, la exposición de la luz temprano (al principio) en la noche subjetiva causa retardo de fase en el marcador de tiempo (marcapaso), mientras que la exposición a la luz tarde (al final) en la noche subjetiva da como resultado un avance de fase. Además, tanto el ARNm de *junB* y *c-fos*, así como sus proteínas en hámsters, se expresan espontáneamente alrededor del amanecer en DD (Guido et al., 1996, 1999). Este ritmo circádico de expresión espontáneo, ocurre principalmente en la subregión DM del NSQ, mientras que la expresión evocada por la luz durante la noche es observada a través de todo el núcleo. A pesar de que la expresión de estos genes se ha estudiado exhaustivamente en ratas, permanece poco claro si la expresión de los ritmos IEG espontáneos del núcleo ocurren.

A pesar de que existen diferencias en como los pulsos de luz afectan al NSQ de animales diurnos y nocturnos (Klein et al., 1991; Rusak et al., 1990a) existen estudios que han mostrado similitudes en la función del NSQ a través de especies que muestran muy diferentes patrones de actividad con respecto al ciclo de luz oscuridad (Novak et al., 2000; Smale et al., 2003). Por ejemplo, tomando al NSQ como un todo, éste es metabólicamente más activo durante la fase de luz, tanto en los animales diurnos como nocturnos (Schwartz et al., 1980, 1983). Por ejemplo, cuando animales diurnos, como el roedor *Arvicanthis niloticus*, son mantenidos en un ciclo de LD de 12:12 h, los patrones de expresión de la proteína *c-Fos* en el NSQ es similar a la que muestran las ratas, animales eminentemente

nocturnos (Novak et al., 2000; Nunez et al., 1999; Katona y Smale, 1997). En ambas especies la respuesta en la expresión de la proteína c-Fos es mayor en el día (luz) que durante la noche (oscuridad) (Nunes et al., 1999). Además, los picos de disparo neuronal del NSQ se presentan principalmente durante la fase de luz sin importar en que fase el animal sea más activo (Inouye y Kawamura, 1982; Kurumiya y Kawamura, 1988; Sato y Kawamura 1984, Yamazaki et al., 1998). Dadas estas características comunes, es posible que las diferencias en la fase de los ritmos conductuales de las especies, lleven a respuestas diferenciales a las áreas blanco desde el NSQ, esto es, las señales del reloj recibidas vía axonal y/o humoral provienen del NSQ (Watts y Swanson, 1987; Silver et al., 1996).

Además del NSQ existen otras áreas retinorreipientes del hipotálamo que expresan c-Fos, entre ellas, la hojuela intergeniculada lateral (HIGL), el área tegmental ventral (VTA) y el colículo superior (CS). Estudios realizados en éstas áreas y utilizando al núcleo paraventricular del tálamo como control (Caldelas et al., 1998) se demostró que pulsos de luz aplicados en CT13 y CT23, producen un incremento en el número de células inmunorreactivas a Fos (ir-Fos) con respecto al control en el NSQ. Sin embargo, en relación al tiempo circádico ninguna de las estructuras retinorreipientes restantes (Núcleo geniculado lateral ventral; NGLv, HIGL, VTA y CS) exhibieron fluctuaciones en el número de células inmunorreactivas. Este estudio demostró que las estructuras que reciben información directa desde la retina responden a la estimulación fótica, con un incremento en la expresión de c-Fos, pero solo el NSQ muestra una respuesta circádica. Por lo tanto se infirió que el NSQ es la única estructura cerebral retino receptiva que exhibe expresión diferencial de c-Fos en relación con el tiempo circádico, por lo que, esta respuesta no depende solamente de un mecanismo proveniente desde la retina, sino también de las propiedades funcionales de las células marcadoras de tiempo del NSQ.

Las principales características en cuanto a la expresión de c-Fos en el NSQ de roedores presentan las siguientes características según diversos estudios tanto en ratas (Rea, 1989; Rusak et al., 1990a; Sutin y Kilduff 1992; Guido et al., 1999; Schwartz et al., 2000) como en hámster (Kornhauser et al., 1990; Rusak et al., 1990a; Chambille et al., 1993): 1) la expresión de Fos es inducida por iluminación retinal (Rea, 1989) y se lleva a cabo en las células del NSQ (Kornhauser et al., 1990; Rusak et al., 1990a). 2) la expresión de Fos se da principalmente (aunque no exclusivamente) en las porciones retinorreipientes del NSQ así como a la HIG. 3) la activación de c-Fos puede ser disociada de los efectos de la luz, ya que no solo ésta puede inducir los cambios de fase (Colwell y Foster, 1993; Schwartz et al., 2000), 4) la expresión de la proteína Fos parece ser necesaria para que la luz tenga efectos en el cambio de fase normales, sin embargo no se sabe exactamente que papel puede jugar en la sincronización ya que al aplicar

antisueros oligonucleótidos contra c-fos y jun B, los cuales bloquean la traslación, los procesos de Fos se presentan sin modificación (Wollnik et al., 1995). 5) Sin señales ambientales lumínicas las cuales causan los cambios de fase se induce una mínima expresión de c-Fos en el NSQ del hámster, pero se presenta en otras estructuras como por ejemplo, la hojuela intergeniculada (HIG; Janik y Mrosovsky, 1992).

### **3.4. Curva de respuesta de fase.**

El significado de por que los organismos alcanzan una sincronización estable está mejor representado por la curva de respuesta de fase (CRF). Este tipo de curva es una representación gráfica de los efectos que tiene la luz en el tiempo de los ritmos biológicos (Pittendrigh, 1993). El efecto de la luz en la fase de los ritmos circádicos, depende de la coincidencia de la luz con períodos particulares alternados de sensibilidad e insensibilidad a ésta durante el ciclo circádico. La CRF se constituye manteniendo a los organismos en condiciones constantes de oscuridad (DD) donde se les presentan pulsos de luz a varios tiempos diferentes durante el ciclo circádico. Para las especies diurnas, la porción activa del ciclo diario ha sido denominada como el *día subjetivo*, mientras que la porción inactiva ha sido denominada, *noche subjetiva*. Para los organismos nocturnos, la noche subjetiva representa la fase conductual activa, mientras que la fase inactiva es el día subjetivo. Así, los organismos diurnos y nocturnos tienen patrones de actividad de 180 grados fuera de fase uno del otro, sin embargo, ambos son sensibles a los efectos de la luz *solo* en la noche subjetiva (Hastings et al., 1995). Esto es, un pulso de luz presentado en la noche subjetiva tardía produce un *avance de fase* del ritmo circádico (Figura 3a) mientras que un pulso de luz presentado en la noche subjetiva temprana produce un *retardo de fase* del ritmo circádico (Figura 3b). Un avance de fase, resulta en un adelanto en el tiempo del reloj, así la conducta inicia mas temprano el siguiente día. El retardo de fase da como resultado un atraso (o regreso) en el tiempo del reloj, por lo que la conducta inicia mas tarde el siguiente día. Por lo tanto la luz coincidente con las porciones sensitivas en la noche subjetiva produce menores ajustes diarios en la fase circádica. La curva de fase respuesta permite predicciones acerca de los efectos de la luz a diferentes tiempos circádicos y provee una media de cuantificación y evaluación de la conducta circádica (Pitendrig, 1993).

### **3.5. El NSQ como sistema multioscilandor.**

El NSQ con sus dos componentes anatómicos, el ventrolateral y el dorsomedial, presenta conexiones intrínsecas y comisurales a través de sus

ramificaciones dendríticas, que van principalmente del centro (VL) hacia la corteza (DM) del núcleo. Aunque la corteza prácticamente no presenta proyecciones recíprocas hacia el centro, también hay áreas que reciben proyecciones exclusivamente o bien del centro o bien de la corteza (Van den Pol, 1980). Estas características, así como la distribución de las aferentes y eferentes y el fenotipo peptídico de las neuronas que lo constituyen, hacen que las subdivisiones anatómicas del núcleo sean todavía más claras. Por otra parte, se ha postulado que estas subdivisiones, son capaces de funcionar como osciladores independientes (Moore y Bernstein, 1989). Lo anterior se infirió por estudios realizados en cultivos del tejido de cada subdivisión del núcleo por separado (Shinohara e Inouye, 1995). Se confirmó por registro multiunitario que ambas subdivisiones pueden funcionar separadamente, e inclusive que el centro y la corteza pueden oscilar fuera de fase (Shinohara e Inouye, 1995).

A nivel unicelular, también hay datos que demuestran que las neuronas pueden oscilar independientemente una de otra en un cultivo (Welsh et al., 1995). Estos resultados apoyan la idea general de que la oscilación circádica es una propiedad de cada célula aunque el fenotipo peptídico de estas neuronas oscilantes no se ha determinado en su totalidad (Welsh et al., 1995). Esta evidencia indica que las neuronas del NSQ funcionan como osciladores individuales e independientes, y que por lo tanto las subdivisiones del centro y la corteza del NSQ pueden funcionar como marcadores de tiempo (marcapasos) independientes. Esto es consistente con el punto de vista de que las neuronas del NSQ han nacido como osciladores circádicos que se acoplan dentro del núcleo para formar un sistema complejo de marcapasos (Bendová et al., 2004; Moore y Bernstein, 1989), sin embargo este punto de vista todavía es controversial hasta ahora (Welsh et al., 1995).

## **4. NSQ: VIAS VISUALES Y CONEXIONES.**

### **4.1. El tracto retinohipotalámico.**

Los ritmos, que son generados y regulados por un sistema de tiempo central, están compuestos por tres elementos neurales principales: *I) un sistema o vía de entrada, II) un marcapaso circádico que genere las oscilaciones y III) un sistema o vía de salida que resulta en la expresión de los ritmos que podemos medir.* Estos tres componentes están acoplados y funcionan como unidades integradas que mandan señales que entran codificadas y llegan a ciertas partes del cerebro, donde se integran y decodifican para, posteriormente, modular un extenso arreglo de sistemas

que afectan el ritmo circádico de los sistemas autonómicos, neuroendocrinos y somato-motores. (Moore, 1992). A pesar de la gran cantidad de estudios realizados para identificar las funciones y características del NSQ en los mamíferos, es importante enfatizar la importancia del sistema de entrada o sincronización que modula a los ciclos biológicos. La entrada lumínica que da como resultado el inicio de los ritmos circádicos, depende de la integridad de las proyecciones laterales de los ojos desde las células ganglionares retinales hacia el cerebro (Moore y Silver, 1998). Sobre esta base se ha deducido que los fotorreceptores y las conexiones retinales intrínsecas son componentes del sistema circádico, con al menos, una vía de entrada desde la retina hasta el cerebro la cual es necesaria para el establecimiento de la fase de marcapaso; a este componente se le ha denominado tracto retinohipotalámico (TRH). Una vez que se ha establecido la conexión, estas vías retinales aferentes se distribuyen en el NSQ haciendo sinápsis con las células que lo integran (Moore y Silver, 1998).

Para llegar a la conclusión de que el componente de la proyección retinal central es el responsable de mediar los efectos de la entrada lumínica en un organismo, se realizaron estudios donde se estableció la existencia de una proyección directa desde la retina hasta el hipotálamo. Los primeros estudios realizados por Robert Moore y sus colaboradores (en la década de los 70's), presentaron evidencias de la existencia de estas conexiones. En experimentos realizados con ratas, se utilizaron trazadores autorradiográficos, (inyectando leucina tritiada en la cámara posterior de ojo) y se observó que estas proteínas marcadas estaban presentes en el NSQ del hipotálamo, a los pocos días de haberlas aplicado. En este sentido quedó establecida la conexión directa entre la retina y el hipotálamo, pero no se observaron proyecciones hacia otras partes del mismo. La propuesta fue que el TRH provenía de las células ganglionares de la retina y terminaba en pequeñas ramificaciones dendríticas en el NSQ. Quedó establecido también, que el componente de las proyecciones retinales centrales es el responsable de mediar los efectos de la luz (Moore y Lenn, 1972). Esta técnica, que se utilizó primero para la identificación de la vía retino-tectal en aves, se utilizó posteriormente en ratas y otras especies de mamíferos como cuervos, gatos y monos, (Hendrickson et al., 1972) ardillas, gálagos, marmosetas y macacos (Moore, 1973). En todas estas especies se demostró que esta proyección es bilateral y está presente desde mamíferos inferiores (prototerios) hasta superiores (euterios) (Moore y Eichler, 1972; Moore y Klein, 1974; Moore, et al., 1978). Aunque existen algunas diferencias entre especies, la proyección del TRH parece estar bajo menor proceso de cambio en su filogenia que cualquier otro componente de la proyección retinal central, lo cual implica una considerable conservación y estabilidad de la función (Moore, 1983).

En roedores, al lesionar la vía visual posterior al QO y dejando intacta la vía visual primaria o anterior, se observó que no se afectaba la entrada del ritmo circádico en un ciclo normal de luz-oscuridad. Por lo tanto, se dedujo que la proyección del TRH es suficiente para el mantenimiento de la sincronización de los ritmos circádicos (Zucker y Carmichael, 1981; Johnson et al., 1988), a pesar de que los animales quedaban ciegos y en consecuencia presentaban pérdida en las respuestas de los reflejos visuales a la luz (Moore y Eichler, 1972; Moore y Klein, 1974; Klein y Moore, 1979). Sin embargo, la lesión del TRH en la entrada del NSQ dio como resultado la pérdida de la sincronización a los ritmos, con efecto también en otras funciones visuales (Johnson et al., 1988). Estos resultados indican que el TRH es suficiente para mediar la sincronización circádica.

Por otro lado, la distribución de las fibras en el NSQ, también le confiere características anatómicas intrínsecas que promueven su división. Por ejemplo, las neuronas del NSQ forman plexos axonales dentro del área VL (centro) y DM (corteza) que inervan diferentes áreas dentro del mismo núcleo. Esto es, a pesar de que las neuronas presentan proyecciones fuera del NSQ, sus principales proyecciones se mantienen dentro de los límites del mismo, lo cual indica que estas neuronas peptidérgicas tienen una población significativa de interneuronas y esto a su vez indica que la distribución de los axones en el NSQ están interconectados. Otra característica importante del NSQ, es que al ser bilateral cada núcleo recibe proyecciones del opuesto y viceversa (principalmente en el área ventral) (Moga y Moore, 1997).

## **4.2. El ojo y la retina, punto de partida del TRH.**

Anatómicamente la retina se presenta como una estructura muy proximal al cerebro y a diferencia de otros órganos sensoriales encontrados en la periferia y por si misma forma parte del sistema nervioso central (Dowling, 1987; Shatz y Lamb, 1991; Wassle y Boycott, 1991). La anatomía de la retina es clara en cuanto a la relación que guarda entre la forma y la función. Por un lado, la cantidad de luz que alcanza la retina es controlada por el iris, a través de una abertura denominada pupila. El iris está situado entre la córnea y los lentes en la cámara anterior del ojo se contrae cuando hay niveles de luz elevados, y se expande en la oscuridad. Por lo tanto, es parcialmente responsable de que el ojo pueda ver a través de un amplio rango de niveles de luminosidad (Kuffler et al., 1984; Shapley y Enroth-Cugell, 1985; Figura 5 ).

Por otra parte, la retina está compuesta por cinco capas celulares y de axones (Figura 6). Tres capas están constituidas de cuerpos celulares, mismos que están separados por otras dos capas formadas por procesos

neurales (esto es dendritas y axones) (Wassle y Boycott, 1991). La retina está orientada hacia el ojo, por lo que la luz debe viajar a través de todas las capas mencionadas para alcanzar finalmente a los fotorreceptores (Wu, 1994). De las tres capas celulares mencionadas, la primera que es la más alejada del centro del ojo, se le denomina capa nuclear externa, ésta es la que contiene a los cuerpos celulares de los fotorreceptores, los conos y los bastones. La siguiente es la capa internuclear la cual contiene a los cuerpos celulares de las interneuronas de la retina que son tanto excitatorias como inhibitorias. Esta capa incluye a las células horizontales, bipolares y amácrinas. La capa de células más alejadas de las neuronas retinales son las *células ganglionares*, estas neuronas presentan los procesos más largos de todas las células retinales y su importancia radica en que a partir de estos procesos se forma el nervio y posteriormente el tracto óptico, siendo la única vía de entrada desde la retina hasta el sistema nervioso central (Enroth-Cugell y Robson, 1966, 1984; Hochstein y Shapley, 1976; Kaplan y Shapley, 1986; Wassle y Boycott, 1991). Por último, entre las capas de los cuerpos celulares existen dos capas formadas por procesos celulares denominadas capa plexiforme interna y externa, en estas dos capas se llevan a cabo todas las interacciones entre las neuronas de la retina (Enroth-Cugell y Robson, 1984; Wu, 1994).

## Conformación anatómica del ojo y la retina.

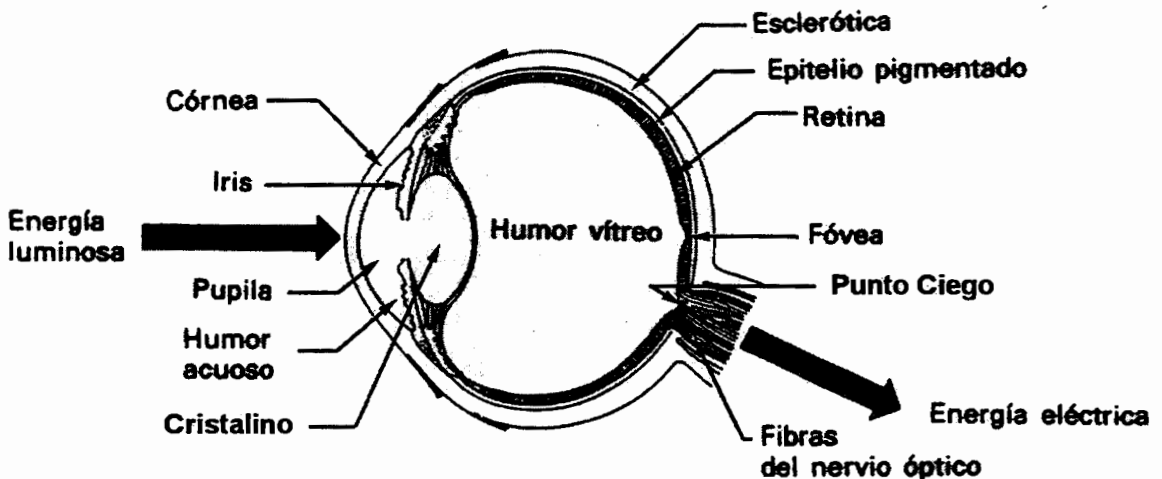


Figura 5. Anatomía general del ojo (adaptado de Shapley y Enroth-Cugell, 1985)

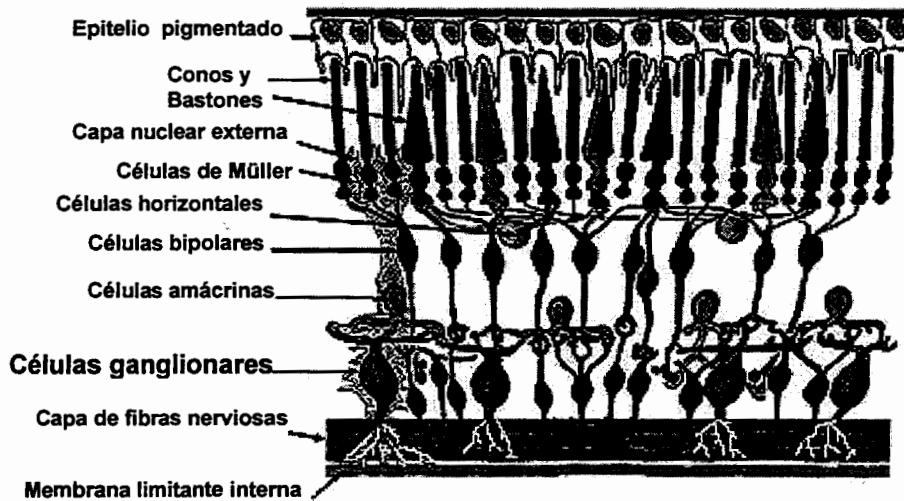


Figura 6. Anatomía general de la retina (adaptado de Dowling, 1987).

El conjunto de todos estos elementos anatómicos del ojo, dan lugar a una adecuada función en la transducción de la señal luminosa. Cuando el estímulo luminoso pasa a través de la retina alcanza a los fotorreceptores (conos y bastones), los cuales descansan cerca de las células epiteliales pigmentadas que están a lo largo de toda la capa externa de la retina. Después de que la señal ha llegado a los receptores, pasa internamente hacia las células bipolares y de ahí hacia las células ganglionares, estas células mandan la señal a través de sus axones al NSQ (Kuffler, et al, 1984). Un aspecto interesante de las células de la retina es que la mayoría responden a la luz con cambios lentos y graduales de potencial y sólo las células ganglionares disparan potenciales acción o espiga rutinariamente (Ratliff, 1974).

### 4.3. Células ganglionares y el TRH.

Estudios hechos en gato, (Enroth-Cugell y Robson,1966,1984) demostraron que funcionalmente existen dos tipos de neuronas ganglionares, las células X y las células Y. Las células-X dan respuestas sostenidas a la iluminación, y las células-Y dan pulsos abruptos cuando disminuye o cesa la iluminación. Las células-X se comportan como células bipolares ya que presentan una "conducta" de apagado-encendido sostenido, mientras que las células-Y se comportan como una mezcla de células bipolares y amácrinas. Las células-X son por mucho las mas comunes de las dos, y comprenden cerca del 55% de la población de las células ganglionares mientras que solo cerca del 4% son células-Y. Las

células-X son las que manejan los detalles finos de detección del ambiente, mientras que las células-Y transmiten la información referente a los cambios de iluminación y de movimiento (Stone y Fukuda, 1974). Las células ganglionares restantes son, en comparación, mas pequeñas y heterogéneas que las X y Y y se les denomina células-W, estas células presentan características funcionales combinadas de las dos anteriores, pero responden principalmente a la intensidad del estímulo luminoso, por lo que se les relaciona directamente con el proceso de sincronización.

Las fibras ganglionares que conforman a esta vía fueron estudiados primeramente utilizando el transporte transináptico del pseudo-virus de la rabia-B, donde se mostró que los axones de estas células forman parte del tracto óptico primario (Moore y Card, 1994). En el conejo, existen 15 tipos de células ganglionares fisiológicamente diferentes en la retina, (Barlow, et al., 1964; Barlow y Levick 1965; Ariel y Daw, 1982; Ariel, et al., 1983), mientras que en el mono Rhesus, sólo 3 (Kaplan y Shapley, 1986) sin embargo en general, su función sigue siendo parecida a la de las células X y Y.

El conjunto de todas las células de la retina, procesan y envían la información visual del ojo vía el nervio óptico. El nervio óptico inicia en el disco óptico, donde, al no existir fotorreceptores, esta región circular constituye un punto ciego en la retina. La ruta precisa que siguen los axones de las células ganglionares hacia las diferentes partes del cerebro provee una gran cantidad de información desde el medio externo hasta el interno. Las rutas de los axones están arregladas en una forma precisa y sus principales áreas blanco son, el NSQ, el núcleo geniculado lateral (NGL) y colículo superior, donde se puede registrar un mapa topográfico de la relación visión-espacial-temporal precisa mantenida entre neuronas (Figura 7).

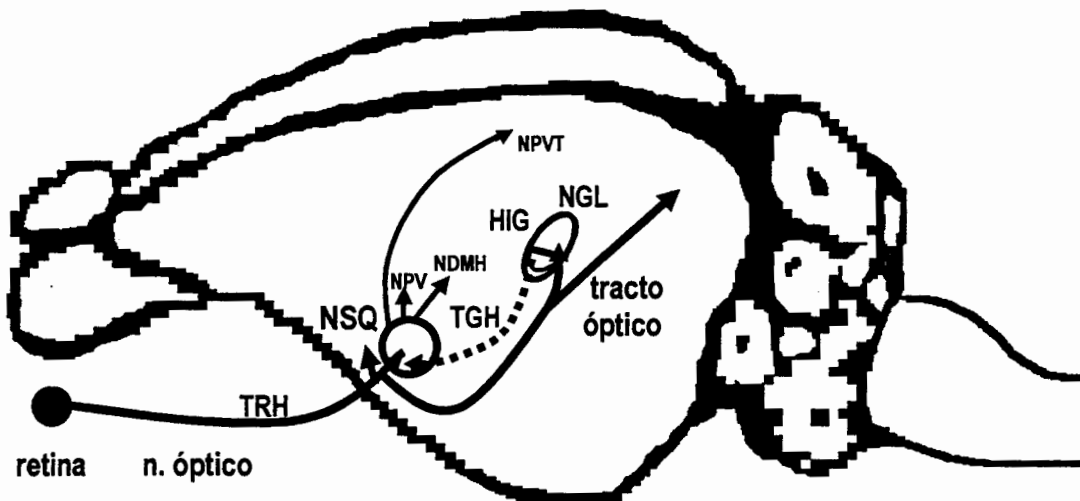


Figura 7. Vías del sistema circádico en mamíferos (Adaptado de: Van Esseveldt, et al., 2000).

#### **4.4. Anatomía del TRH y sus áreas blanco.**

Posterior a los primeros hallazgos hechos por Moore y sus colaboradores, se utilizaron otras técnicas que mostraron nuevas rutas del TRH. Entre estos estudios, Pickard y Silverman (1981), utilizaron la técnica del marcador anterógrado de peroxidasa de rábano en hámsters y mostraron que el TRH se extiende mas allá de lo que se había descrito hasta entonces. Esto sugería que, posiblemente existieran diferencias entre especies en cuanto a las proyecciones del TRH o que alternativamente el método del trazador autorradiográfico no fuera tan preciso. En otros estudios, Johnson et al. (1988), utilizaron una nueva técnica, donde aplicaron el marcador anterógrado sub-unidad  $\beta$ -toxina de cólera ( $\beta$ -TC) en la cámara anterior del ojo y analizaron las proyecciones del TRH tanto en ratas como en el hámsters. A partir de estos estudios, se describió de manera mas exacta la distribución y organización del TRH en el cerebro, además, se lograron distinguir diferencias y semejanzas entre especies y se estableció que esta vía es vital para entender la organización funcional del sistema circádico. En trabajos subsecuentes, se demostró que en mamíferos existen dos componentes en esta vía (Speh y Moore, 1993). El primero, es una proyección al NSQ y áreas hipotalámicas anteriores adyacentes (Johnson et al., 1988; Levine et al., 1991) y el segundo, es una proyección al área hipotalámica lateral. Esta última, no parece estar anatómicamente relacionada con la mayoría de las proyecciones mediales, ya que es predominantemente contralateral (Johnson et al., 1988) y se desarrolla antes que las proyecciones mediales (Speh y Moore, 1993) además, ésta proyección se origina de un pequeño grupo de células ganglionares que están confinadas al cuadrante exterior de la retina (Leak y Moore, 2001). En cuanto a las proyecciones del TRH del hipotálamo lateral, parecen ser un componente que va directo al NSQ (Speh y Moore, 1993). En base a esto, se estableció que la principal proyección del TRH hacia el NSQ llega primordialmente a la parte ventral del mismo (Van den Pol y Tsujimoto, 1985), es bilateral, y es dos veces mas densa en el lado contralateral en comparación con el lado ipsilateral. En cuanto al área dorsal del núcleo, existen pocos axones dispersos, aunque se observa una pequeña pero densa proyección de células que llega a una pequeña área del mismo. Muchas de las proyecciones dispersas se pueden extender desde el NSQ hacia el área hipotalámica anterior, área preóptica media y el órgano vasculoso de la estría terminalis. Por otro lado, las densas proyecciones en el NSQ, se expanden y ramifican a la región caudal del núcleo en un plexo a través del área retroquiasmática entre los núcleos ventromedial y dorsomedial (Van den Pol y Tsujimoto, 1985), mientras que las fibras dorsales del NSQ, se extienden ampliamente en un plexo que

desaparece a través de la zona subparaventricular (Figura 7; Van den Pol y Tsujimoto, 1985).

#### **4.5. Patrones de distribución de las fibras del TRH.**

La rata y el hámster son los modelos biológicos más utilizados para la descripción de la vía retinohipotalámica. A partir de los estudios realizados en estas especies, se ha extrapolado mucha información que explica varios fenómenos relacionados con los ritmos circádicos en mamíferos. Las proyecciones del TRH, pueden ser divididas en tres componentes. **1)** El primer componente es la proyección más larga que va directo hacia el NSQ. Esta proyección es densa en la parte contralateral del NSQ de la rata mientras que en el hámster tanto las proyecciones ipsilaterales como contralaterales son similares. A nivel rostral del NSQ las proyecciones del TRH forman una densa banda de terminales a lo largo del borde dorsal del quiasma óptico (QO). Conforme el NSQ se extiende dorsalmente, las fibras retinales producen un denso plexo de terminales que alcanzan a la subdivisión ventrolateral del núcleo con algunas fibras que se extienden hacia la porción dorsomedial del mismo. **2)** El segundo componente del TRH es en gran parte una extensión de la proyección desde el NSQ al área hipotalámica anterior (AHA) y área retroquiasmática (ARQ). La proyección hacia el AHA, es primeramente observada en el hámster a nivel del órgano vasculoso de la estría terminalis, apreciándose como axones diseminados que dejan el borde dorsal del nervio óptico y con proyecciones hacia el área preóptica. Esta proyección, continúa como un plexo disgregado de terminales, que al parecer son una extensión del plexo del NSQ al AHA en ambas especies, y continúa a lo largo del NSQ. En el hámster, éste se extiende hacia la zona subparaventricular y adyacente al AHA en comparación con la rata. En ambas especies existe una gran zona de inervación caudal del NSQ al ARQ que continúa hasta el hipotálamo tuberal. Estas proyecciones son densas en el lado contralateral tanto en la rata como en el hámster. **3)** El tercer componente del TRH, es una proyección hacia el área hipotalámica lateral (AHL). Esta comprende una colección diseminada de axones varicosos que se extienden desde el área lateral del quiasma óptico, hasta el hipotálamo en su área rostral, hacia el área caudal, la proyección del AHL es una acumulación poco densa de terminales, justo dorsal al núcleo supraóptico. La proyección del AHL es más larga en el lado contralateral que en el ipsilateral tanto en rata como en hámster.

## 4.6. Ontogenia del TRH.

Ya que la principal función del NSQ es directamente proveer señales circádicas a otras partes del cerebro, el estudio de la relación entre su estructura y función se ha enfocado también al análisis de los procesos que se llevan a cabo para su desarrollo. En la etapa fetal de la rata, por ejemplo se ha mostrado que el NSQ, presenta oscilaciones circádicas en funciones tales como, la actividad metabólica (Reppert y Schwartz, 1983) y actividad en los sitios de unión a la melatonina (Weaver, et al, 1988). Ambos eventos son independientes al desarrollo de las sinápsis dentro del NSQ ya que la sinaptogénesis es un evento principalmente posnatal en roedores altriciales (Speh y Moore, 1993). También la sincronización circádica de los ritmos en la actividad locomotriz se ha evaluado en ratas de dos semanas de nacidas, esta conducta puede ser sincronizada por señales maternas o por inyecciones de melatonina aplicadas prenatalmente. Tomando en cuenta estos estudios se ha sugerido que los mecanismos celulares y la actividad metabólica rítmica de las neuronas del NSQ pueden ser sincronizados y parecen estar funcionando desde la vida prenatal, siendo además independientes de la actividad sináptica. Otros importantes eventos ontogenéticos como la formación de las fibras eferentes del NSQ y la posible existencia de un período de muerte celular, se han estudiado con poco detalle. Torrealba y colaboradores (1993) mostraron que cerca del 30% de las células del NSQ, mueren durante la ontogenia prenatal en corderos. Este decremento es el principal ajuste que se presenta en la población neuronal del NSQ posterior a la llegada de los axones retinales, sugiriendo que una de las funciones de estas aferentes es regular el número neuronal. Sin embargo, la muerte neuronal durante el desarrollo tardío se explica mas frecuentemente como una competencia por espacio postsináptico esto es, cuando se establecen las conexiones eferentes (Williams y Herrup, 1988). La relación temporal entre el período de muerte celular en el supraquiasmático y el período de formación de aferentes y eferentes podría dar cierta idea sobre cual de estos mecanismos - postsinápticos contra presinápticos - tiene mayor relevancia en el ajuste del número de neuronas del NSQ en mamíferos.

Entre los estudios realizados al respecto, Speh y Moore (1993), explican de manera sistemática el desarrollo del TRH tanto en rata como en hámster. Utilizando animales de diferentes edades que oscilaban entre la etapa embrionaria (E) hasta el día postnatal 15 (P15) y tratados con el marcador anterógrado de  $\beta$ -TC conjugada con peroxidasa de rábano ( $\beta$ -TC-HRP) observaron importantes características en el desarrollo de esta vía. 1) Las proyecciones al NSQ y las áreas del hipotálamo anterior tanto en rata

como en hámster se forman tiempo después en comparación con las proyecciones que se forman en otros núcleos visuales. Las proyecciones del TRH en el hámster se forman después que en la rata. 2) En la rata, el desarrollo del TRH es muy acelerado y aumenta sustancialmente en los primeros días, disminuyendo significativamente en los adultos. En contraste, en el hámster el patrón se presenta como un crecimiento gradual hasta llegar al patrón del adulto.

El desarrollo en el TRH del hámster difiere del de la rata en tres sentidos principalmente: 1) se desarrolla significativamente mas tarde, ya que las primeras proyecciones que aparecen se observan en el día P04 y el patrón que se observará en el adulto se presenta hasta el día P15; 2) la proyección gradualmente asumida en el patrón del adulto primero se extiende mas allá del área que será invadida y luego inicia la regresión; 3) la proyección hacia el AHL se desarrolla concomitantemente junto con las del NSQ, el AHA y el ARQ. Los primeros axones marcados en aparecer en el hipotálamo son evidentes hasta el día P04. Estos axones están presentes en el área ventrolateral del NSQ, AHA y AHL con fibras ocasionales que se extienden hacia el ARQ. Sobre los siguientes 4 días las proyecciones gradualmente incrementan en todas las áreas, hasta alcanzar tres cuartos de la densidad total de las proyecciones presentes en los adultos en todas las áreas. Esta densidad de innervación incrementa gradualmente hasta que en P15 alcanza el patrón que se observará en el adulto.

Este minucioso estudio ha sido corroborado posteriormente por Muller y Torrealba (1998), donde también mostraron el establecimiento de la relación temporal entre la muerte celular ontogenética, la formación de las vías eferentes y el desarrollo de la vía aferente retinohipotalámica en el NSQ de hámster y confirmaron que todos estos eventos toman lugar después del nacimiento. Con esto, determinaron que las neuronas del NSQ comienzan a proyectar eferentes durante P01, esto es, dos días antes de que se presente el abrupto decremento en el número de neuronas detectadas entre P02 y P05. En este período, también confirmaron la innervación retinohipotalámica, donde las aferentes retinales inician la invasión del NSQ que es inmediatamente después de la muerte celular.

#### **4.7. Hojuela intergeniculada (HIG) y el tracto geniculohipotalámico (TGH).**

La hojuela intergeniculada (HIG) es un componente del complejo geniculado lateral del tálamo. Se identificó como una subdivisión distinta al núcleo geniculado lateral en la rata por Hickey y Spear (1976) en base a su entrada retinal bilateral ya que ésta no se observa en otras subdivisiones geniculadas laterales (Moore y Card, 1994). En los mamíferos, incluyendo al

hámster (Harrington et al., 1985; Martin et al., 1990), la ardilla (Smale et al., 1991) y los primates (Moore, 1992), se ha observado que la HIG presenta poblaciones neuronales que proyectan hacia el NSQ en un patrón que se traslapa con las aferentes retinales directas del ojo (Card y Moore, 1982, 1989; Mantyh y Kemp, 1983), por lo que estas neuronas dan origen a una vía que va hacia el NSQ denominada tracto geniculo-hipotalámico (TGH; Figura 7). La mayor fuente de aferentes hacia la HIG proviene de neuronas intrínsecas retinales y del área retroquiasmática, pero también se ha observado que, aunque en menor cantidad (al menos en términos de densidad) existen aferentes que provienen del NSQ y de núcleos del tallo cerebral. Las principales eferencias de la HIG van al NSQ y áreas adyacentes que parecen proyectarse ipsilateralmente en el hámster (Moore et al., 2000), sin embargo en la rata, las neuronas que contienen encefalinas se proyectan solo hacia el lado contralateral (Morin et al., 1992).

Se presume que la función de la HIG, en base a su organización y conexiones, es la de proveer información lumínica procesada hacia el NSQ y a áreas inervadas por éste hacia centros visuales subcorticales ya que las neuronas de la HIG parecen responder a estímulos luminosos de manera similar a como lo hacen las neuronas del NSQ (Harrington y Rusak, 1989). Estas neuronas muestran cambios en el rango de disparo en función a los cambios en la luz, de tal forma que las neuronas del supraquiasmático reciben información acerca de la iluminación ambiental directamente desde la retina e indirectamente a través del TGH. También se ha observado que cuando se destruye la hojuela intergeniculada, los sujetos presentan disminución en la velocidad de re-sincronización al ciclo de iluminación ambiental, lo que indica que la hojuela es necesaria para la adecuada estimación de la intensidad de iluminación ambiental por el sistema (Harrington y Rusak, 1986; Johnson et al., 1988; Pickard et al., 1987).

#### **4.8. Sistema visual y circádico en el conejo.**

Hasta ahora existe poca información que documente la actividad y desarrollo del NSQ en conejo, sin embargo se tienen algunos datos referentes a características generales de la vía visual. Estos estudios iniciaron con el registro multiunitario celular de las neuronas de la corteza visual, específicamente las células del coliculus superior (CS), la corteza estriada (Spear et al., 1972; Grobstein et al., 1973; Mathers et al., 1974) y las neuronas del núcleo dorsal del cuerpo geniculado lateral (NGLd) (Rapisardi et al., 1975). En estos estudios se mostró que la aplicación de un estímulo luminoso, provocaba actividad celular en un pequeño número de neuronas del CS en el día 6 postnatal en los gazapos, mientras que las neuronas que mostraban actividad en la corteza visual respondían a la luz hasta el día 8 postparto. También se observó que el CS de los neonatos de

10 días de edad (antes de abrir los ojos) presentaban campos receptivos visuales similares a los de los adultos (Masland et al., 1971), sin embargo, los demás campos receptivos observados en la corteza estriada del adulto (Chow et al., 1971) no estaban presentes en los neonatos sino hasta el día 18 de edad. Finalmente, entre los días 21-25 de edad es cuando se observa que los campos receptivos del CS están en una frecuencia similar a la del adulto. El hallazgo de que un grupo de células en la corteza estriada en neonatos, despliegue características similares a las del campo receptivo del adulto solo después de que los animales han abierto los ojos, indica que el proceso de desarrollo de la vía visual, sigue en progreso después del nacimiento en lo que conformará los patrones visuales posteriores, y que, por otra parte las vías visuales son independientes de las vías para la sincronización circádica (Rapisardi et al., 1975).

## 5. JUSTIFICACIÓN

En base a los estudios anteriores y tomando en cuenta en interés de nuestro laboratorio por estudiar aspectos circádicos del conejo, decidimos enfocar nuestra atención al núcleo supraquiasmático de esta especie. Para ello, realizamos una serie de experimentos donde se utilizaron diferentes técnicas para marcaje celular y de fibras.

Primeramente se utilizó la *técnica de tinción de Nissl*, la cual es útil para estudiar y definir la anatomía del sistema nervioso central ya que permite localizar conjunto de cuerpos neuronales en áreas determinadas. En el caso específico de la anatomía del NSQ de conejo, no existe información acerca de su tamaño y forma. Por lo tanto, este procedimiento, fue una herramienta importante para discernir las características anatómicas en el NSQ en esta especie.

En cuanto la información de fibras que inervan al NSQ, la investigación acerca del desarrollo ontogenético del TRH se ha realizado en diferentes especies de mamíferos como rata, hámster, cuyo, gato, aves y monos. Sin embargo, en el conejo, no se tiene ningún reporte que indique el grado de madurez del TRH a diferentes edades. En el presente trabajo, se utilizó la técnica del marcador de la *subunidad de  $\beta$ -toxina del cólera* ( $\beta$ -TC). Esta técnica fue introducida como un marcador retrógrado (marcador axonal que viaja hacia el cuerpo de la neurona; Sawchenko y Gerfen, 1985; Stoeckel et al., 1977), sin embargo este marcador también mostró ser un trazador anterógrado muy sensible. Este, puede ser aplicado por iontoforesis o por inyección directa (Angelucci, et al., 1996) y requiere un tiempo de sobrevivencia de 1 a 10 días, dependiendo de la edad del animal y el lugar de aplicación. Su importancia radica también en que puede ser detectado por medio de la inmunocitoquímica (Datiche, et al., 1995; Elmquist y Saper, 1996; Magnusson et al., 1996). En la experiencia en laboratorio, esta

técnica da como resultado la detección de las terminaciones axonales mas finas, llenando completamente sus varicosidades e Inclusive, permite identificar diferentes tipos de botones y terminaciones sinápticas.

En base a lo anterior, en nuestro laboratorio se inició la caracterización del TRH en el conejo durante los primeros dias de nacido y en la etapa adulta. Este estudio posibilita discernir el establecimiento de las conexiones del TRH en la etapa en la que los neonatos son dependientes de la madre y existe una sincronización por alimento y probablemente la luz todavía no ejerce cambios en el NSQ. Esta idea es mas clara realizando una comparación tanto con los animales que no han abierto los ojos, los que presentan una apertura reciente y los que han abierto los ojos y tienen la vía bien desarrollada como en el caso del adulto. A través del conocimiento de los componentes que forman al reloj biológico en un sentido ontogenético, se posibilita la comprensión del fenómeno circádico en estos organismos.

Por otra parte utilizamos la *técnica de inmunocitoquímica (c-Fos)* para caracterizar la actividad del NSQ del conejo. En la investigación de fenómenos neuronales esta técnica, se utiliza para identificar patrones de actividad neural asociada a su ritmo en un periodo de 24 h. de actividad endógena o por estímulo luminoso en condición constante de oscuridad, todo en base a la detección de esta proteína. La presencia de la expresión de c-Fos es un indicador confiable de cambio en la actividad neuronal. Con la expresión de c-Fos, se tiene una técnica útil para el mapeo anatómico y funcional de los sistemas neuroendócrinos, ya que sus proteínas están localizadas en el núcleo celular. Muchas veces, la identificación del fenotipo de la neurona activada se realiza utilizando sustancias localizadas en el citoplasma y esto complementa a la técnica de inmunocitoquímica con el doble marcaje estándar.

## **6. HIPÓTESIS**

-El tracto retinohipotalámico del conejo está presente desde los primeros días postnatales hasta la etapa adulta, donde existen diferencias en la innervación al NSQ, dependiendo de la edad de los animales.

-En condiciones de luz–oscuridad (LD), el NSQ del conejo presenta una expresión de la proteína c-Fos que depende del horario dentro de un periodo de 24 h y su distribución es diferencial.

-En condiciones de oscuridad constante (DD), el NSQ del conejo presenta una expresión endógena de la proteína Fos, en diversos horarios en un periodo de 24:00 hrs. y su distribución es diferencial.

-El NSQ presenta una respuesta diferencial en la expresión de la proteína Fos dependiendo del horario en que se apliquen pulsos de luz intensa en condiciones de DD. Esta expresión presenta regionalización en su área ventral y dorsal.

## **7. OBJETIVOS**

### **7.1. Objetivo general.**

Caracterización anatómica y funcional del NSQ del conejo a través las proyecciones del tracto retinohipotalámico y por medio de la expresión de la proteína Fos.

### **7.2. Objetivos específicos.**

- 1. Caracterizar la anatomía del NSQ del conejo por medio de la tinción de Nissl.**
- 2. Caracterizar el desarrollo de la vía retinohipotalámica en neonatos de conejo de 1 y 9 días de edad así como en la etapa adulta, para identificar si existen conexiones hacia el NSQ.**
- 3. Caracterizar la expresión de la proteína Fos en el NSQ en diferentes horarios dentro de un periodo de 24 h en condiciones de LD (12:12 h).**
- 4. Caracterizar la expresión de la proteína Fos en el NSQ en diferentes horarios dentro de un período de 24 h en condiciones de DD.**
- 5. Identificar las áreas del NSQ que expresan Fos después de aplicar un pulso de luz intenso a diferentes horarios en conejos adultos mantenidos en oscuridad constante.**

## 8. MATERIAL Y MÉTODO

Se utilizaron conejas blancas adultas (4-6 meses de edad) de la cepa Nueva Zelanda criadas en nuestra colonia (Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz). Estos animales se mantuvieron dos semanas en condiciones de temperatura ( $23\pm 2^\circ$  C) y luz controladas (12:12 encendido de la luz, 07:00 am; a partir de este horario se toma en cuenta la primer hora del ciclo diurno, ZT0) con agua y alimento (Nutricubos Conejina de Purina) *ad libitum*.

### 8.1. Experimento 1.

#### **Caracterización anatómica del NSQ por medio de la tinción de Nissl.**

Se utilizaron secciones del hipotálamo completo obtenidas de cerebros de sujetos intactos en las edades preestablecidas. También se tomaron secciones de los tres grupos formados de los sujetos en experimentación. En una primera aproximación para la caracterización del NSQ en el conejo se analizó cada sección tratada con la tinción de Nissl. En el corte antero-posterior de todo el hipotálamo se obtuvieron 6 secciones del NSQ en cada uno de los tres grupos formados

### 8.2. Experimento 2.

#### **Caracterización del Tracto Retinohipotalámico por medio de la inyección del trazador $\beta$ -Toxina del Cólera en conejos de diferentes edades.**

En el presente trabajo se hizo énfasis en las proyecciones directas que forman al tracto retinohipotalámico en el cerebro del conejo a diferentes edades lo cual constituye una aproximación del desarrollo ontogenético de esta estructura en la especie.

#### **Grupo 1.**

Se utilizaron hembras adultas (n=5) de la cepa Nueva Zelanda (blancas), criadas y mantenidas en condiciones controladas de bioterio, con un ciclo de luz-oscuridad (LD) de 12:12 (encendido a las 07:00 h), el agua y alimento (Nutricubos Conejina de Purina) se proporcionó *ad libitum*. Para aplicar el trazador del TRH, primero se les aplicó a los sujetos una inyección intramuscular de Xilazine (0.75 ml/4 Kg, Fort Dodge®). Se esperó por un lapso de 10 minutos para que el animal se relajara. Posteriormente se

sometieron a anestesia profunda, aplicando Clorhidrato de Ketamina/Clorobutanol (1.2 ml/4 Kg, Inoketam 1000®) vía intravenosa a través de la oreja. Una vez anestesiado el animal se inyectó con la subunidad de  $\beta$ -toxina del cólera ( $\beta$ -TC) al 2% (List Biológico, Campbell) intraocularmente en la cámara posterior del ojo, en una proporción de 12  $\mu$ l de  $\beta$ -TC y 12  $\mu$ l del solvente Dimetil Sulfóxido (DMSO, H<sub>2</sub>O<0.1%, Sigma) para hacer un volumen total de 24  $\mu$ l. Se utilizó una jeringa Hamilton<sup>SM</sup> de 50  $\mu$ l con la cual se inyectaron 3  $\mu$ l de solución cada 30 seg. con el fin de igualar la presión del ojo. Posteriormente se esperó un lapso de 3 minutos para retirar la aguja y evitar que la solución salga. En el tercer día, después de la inyección se sacrificaron los animales con una sobredosis de pentobarbital sódico (100 mg/kg) para realizar la perfusión, procedimiento que se explicará mas adelante.

## **Grupo 2.**

En este grupo se utilizaron neonatos de 9 días de edad (P09, n=4) en la que se presenta la apertura de los ojos. Para obtener estos sujetos, las hembras embarazadas fueron mantenidas en jaulas individuales y a partir del día 25 del embarazo, se colocaron cajas "maternales" para que realizaran la construcción del nido. Este grupo se mantuvo en ciclo luz-oscuridad (12:12, encendido a las 07:00 h) y se observó diariamente hasta el día del parto. La fecha para la aplicación de la  $\beta$ -TC (día posnatal 9) los críos se separaron de la madre y se transportaron en una caja de plexiglas con material del nido materno para el experimento. Los neonatos se sometieron a anestesia profunda aplicando 0.4 ml de Clorhidrato de Ketamina/Clorobutanol (1.2 ml/4 Kg, Inoketam 1000®) vía intraperitoneal. Después de la anestesia se les inyectó la solución de la subunidad  $\beta$ -toxina del cólera ( $\beta$ -TC) al 2% (List Biológico, Campbell) intraocularmente, (en la cámara posterior del ojo), en una proporción de 2.5  $\mu$ l de  $\beta$ -TC y 2.5  $\mu$ l del solvente Dimetil Sulfóxido (DMSO, H<sub>2</sub>O<0.1%) para hacer un volumen total de 5  $\mu$ l. Se utilizó una jeringa Hamilton<sup>SM</sup> de 25  $\mu$ l con la cual se inyectó 1  $\mu$ l de solución cada 30 seg. con el fin de igualar la presión del ojo, se esperó un lapso de 3 minutos para retirar la aguja del ojo y evitar que la solución saliera. Una vez que los neonatos se recuperaron de la anestesia, fueron colocados en el nido materno para que se alimentaran durante los siguientes dos días. En el tercer día (esto es, en P11) los críos fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital sódico (100 mg/kg) y se realizó la perfusión intracardial.

### **Grupo 3**

En este grupo se utilizaron neonatos de 1 día de edad (P01, n=4). Se siguió el mismo procedimiento que para el grupo 2. Después de la inyección de la  $\beta$ -TC (1.5  $\mu$ l/1.5  $\mu$ l de DMSO) los neonatos se perfundieron a las 48-h, esto es a los 3 días de edad.

En todos los grupos del experimento 6, los procedimientos quirúrgicos, tales como la perfusión y la inyección se realizaron entre las 12:00 y 13:00 Hrs.

### **8.3. Experimento 3.**

#### **Expresión de la proteína Fos en el NSQ en condición de luz-oscuridad.**

Después de dos semanas de habituación a la condición LD, los animales se sacrificaron cada 4 horas iniciando en ZT 01 (hora geográfica 08:00 hrs. una hora después del encendido de la luz) ZT05, ZT09, ZT13, ZT17 y ZT21 (n=4 para cada horario).

### **8.4. Experimento 4.**

#### **Expresión de la proteína Fos en el NSQ en condición de oscuridad continua (DD).**

Después de dos semanas de habituación a la condición LD, los animales se transfirieron a un cuarto oscuro (luz roja tenue: 3-5 lux) durante la interfase del apagado de la luz, (hora geográfica 19:00 hrs). Se mantuvieron en esta condición por tres días consecutivos. Posteriormente los animales fueron sacrificados cada 4 hrs iniciando en CT03 (hora geográfica 12:00 hrs.) CT07, CT11, CT15, CT19 y CT23 (n=4 para cada horario)

### **8.5. Experimento 5.**

#### **Inducción fótica de la proteína Fos en el NSQ.**

Después de dos semanas de habituación a la condición LD, los animales se transfirieron a un cuarto oscuro (luz roja tenue: 3-5 lux) durante la interfase del apagado de la luz (hora geográfica 19:00 hrs.). Los animales se mantuvieron en esta condición por tres días. Al tercer día los sujetos fueron expuestos a un pulso de luz intenso (850 luxes) durante 30 minutos (en los horarios CT03, CT11, CT15 y CT19), al término de los cuales se esperó por un lapso de 60 minutos mas con la luz apagada. Posteriormente los sujetos fueron sacrificados (n=4 para cada horario).

## **9. TRATAMIENTO DEL TEJIDO**

### **9.1. Perfusión.**

Una vez anestesiados los sujetos se perfundieron por punción intracardial con solución salina (0.9%) para drenar la sangre del sistema. Posteriormente se aplicó solución de paraformaldehído al 4% disuelto en una solución amortiguadora de fosfato (PB, pH=7.4) con el fin de fijar el tejido cerebral. Los cerebros fueron removidos inmediatamente después de la perfusión y se procedió a su crioprotección con soluciones sucesivas de sacarosa en PB al 10, 20 y 30%. Los cerebros tratados se cortaron en su eje coronal con un crióstato (Microm HM 505N) a  $-22^{\circ}\text{C}$  y un grosor de 50  $\mu\text{m}$  desde el hipotálamo anterior (a nivel del quiasma óptico) hasta el final de los cuerpos mamilares. Las secciones fueron colectadas en grupos de tres series diferentes en cajas de incubación con PB.

### **9.2. Inmunocitoquímica.**

La inmunocitoquímica se realizó por libre flotamiento, donde las secciones fueron tratadas con la oncoproteína Fos de acuerdo al protocolo previamente utilizado para cerebro de conejo en nuestro laboratorio (Caba et al., 2000a, 2000b). Se realizaron lavados de PB (0.01M) y PBT (3%) en cada cambio. Las secciones se expusieron en una solución de peróxido de hidrógeno al 0.5% con el fin de eliminar la actividad de las peroxidases endógenas. Posteriormente, se realizó la incubación en suero normal de caballo biotinilado anti-cabra (1:200, Vector Laboratories) por una hora a temperatura ambiente y posteriormente se realizó la incubación con el anticuerpo policlonal primario de Fos (1:5000, Santa Cruz Biotechnology) por 48 hrs., a  $4^{\circ}\text{C}$ . Después las secciones se trataron con un suero biotinilado anti-cabra (1:200, Vector Labs) por 1 hora a temperatura ambiente y también por 1 hora en el complejo avidina-biotina (1:250, Vector Laboratories). Se realizó la incubación y teñido del tejido con el cromógeno Diaminobencidina (DAB-Polysciences) al 0.05% en presencia de sulfato de nickel (10 mg/ml, Fisher Scientific) cloruro de cobalto (10 mg/ml, Fisher Scientific) y peróxido de hidrógeno al 0.01%, dando como resultado un precipitado púrpura-negro. En el caso de las secciones obtenidas de los animales tratados con el trazador de la  $\beta$ -TC, el tejido se expuso a suero normal de caballo, anticuerpo primario anti-toxina de cólera (List Laboratories), anticuerpo secundario anti-cabra (Vector Labs.), aumentador de la señal (kit ABC; Vector Labs) y finalmente diaminobencidina en presencia de sales de nickel y cobalto. Todas las secciones se montaron en

portaobjetos con gelatina, se deshidrataron en diferentes concentraciones de alcoholes y finalmente se les colocó un cubreobjeto con Permount (Fisher) para su posterior análisis.

### **9.3. Análisis del tejido**

El análisis del tejido se realizó con las secciones que presentaron inmunorreactividad a Fos (ir-Fos). En este caso, se utilizó el método no sesgado de estereología, (Howard y Reed, 1998) con ayuda del microscopio óptico (Olympus BX45) y el analizador de imágenes (Image-Pro<sup>®</sup> Plus, v. 4.1, Media Cybernetics). En este método el número de células ir-Fos se determina en un sentido tridimensional, esto es, tomando en cuenta el alto, ancho y grosor del área donde están incluidas las células. En este caso, se escogieron tres secciones en sentido antero-caudal, las cuales abarcaron las áreas anterior, medial y posterior del NSQ de cada sujeto. Estas secciones se emparejaron en los mismos niveles (en sentido antero-posterior) de las secciones tratadas con la técnica de Nissl. Para contabilizar las células ir-Fos, la imagen de las secciones pasa del microscopio hacia el analizador de imágenes y se “congela” en la pantalla de la computadora. Posteriormente se sobrepone una rejilla de 50 x 50  $\mu\text{m}$  con el objetivo 10X. Por último se contabilizan las células que quedan dentro de la cuadrícula utilizando los ejes X y Y de la rejilla de acuerdo al protocolo indicado para la estereología (Howard y Reed, 1998). La distribución de las células se determinó con ayuda de los atlas de Girgis y Shi-Chang (1981), Shek ,Wen y Winiewski (1986) y en base a un atlas de cerebro de conejo (Gerhard, 1968).

En el caso del experimento del trazador anterógrado de  $\beta$ -TC, el tejido se examinó bajo el microscopio óptico (Olympus CH2). Las secciones donde se observó inmunorreactividad a la toxina ( $\beta$ -TC-ir) se dibujaron por medio de cámara lúcida. Otro método para identificar los procesos inmunorreactivos a la  $\beta$ -TC, se realizó comparando las imágenes de las secciones de los individuos de las tres edades, a través de fotografías tomadas por medio del programa de análisis de imágenes (Image-Pro<sup>®</sup> Plus, v. 4.1, Media Cybernetics). Por último, estas secciones también se emparejaron en los niveles anterior, medial y posteriores (en sentido antero-posterior) con las secciones tratadas con la técnica de Nissl para determinar el área abarcada los procesos inmunorreactivos dentro del NSQ.

## 9.4. Análisis estadístico

En los experimentos de contabilización celular, los valores de cada horario establecido fueron comparados por medio del análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido por la prueba post-Newman-Keuls (GB-STAT v. 6.0) para determinar si hay diferencias significativas en el número de células entre las todas condiciones estudiadas. Los niveles de probabilidad  $p < 0.05$  se consideraron significativos y los valores son dados  $\pm$  error estándar.

Para establecer si existen diferencias significativas en la distribución de las células ir-Fos a nivel VL y DM dentro del NSQ, se realizó el análisis t-student. Los niveles de probabilidad  $p < 0.05$  se consideraron significativos y los valores son dados  $\pm$  error estándar.

## 10. RESULTADOS

### 10.1. Experimento 1.

#### **Caracterización anatómica del NSQ por medio de la tinción de Nissl.**

Se obtuvieron en total de 18 secciones que abarcaron a todo el NSQ por cada animal. De estas, se formaron 3 grupos de 6 secciones cada uno, en los cuales se incluyeron al área anterior (Figura 8A), medial (Figuras 8 B,C) y posterior (Figura 8D) respectivamente. El núcleo se observó densamente compacto y definido por encima del QO a ambos lados del tercer ventrículo. Su forma en el área anterior es esférica-ovalada (Figura 9A), sin embargo en las áreas medial y posterior esta forma es mas alargada con la base mas ancha, lo que le da una apariencia de gota (Figuras 9 C, D) Cada sección fué cortada con un grosor de 50  $\mu\text{m}$ , por lo que, de acuerdo al número total de secciones, el NSQ del conejo tiene aproximadamente 900  $\mu\text{m}$  de largo. De acuerdo a los dibujos de cámara lúcida, así como al análisis realizado con la rejilla de medición (con cuadrículas de 50  $\mu\text{m}$  x 50  $\mu\text{m}$ ) el NSQ anterior (Figura 9A) presenta 300  $\mu\text{m}$  de alto y 250  $\mu\text{m}$  en su parte mas ancha, el NSQ medial (Figura 9B) presenta 400  $\mu\text{m}$  de alto y 300  $\mu\text{m}$  de ancho y el NSQ posterior (Figura 9C) presenta 550  $\mu\text{m}$  de alto y 350  $\mu\text{m}$  de ancho. Estas preparaciones fueron superpuestas a las preparaciones tratadas por inmunocitoquímica como una guía anatómica.

## TINCION DE NISSL EN EL NSQ DEL CONEJO ADULTO

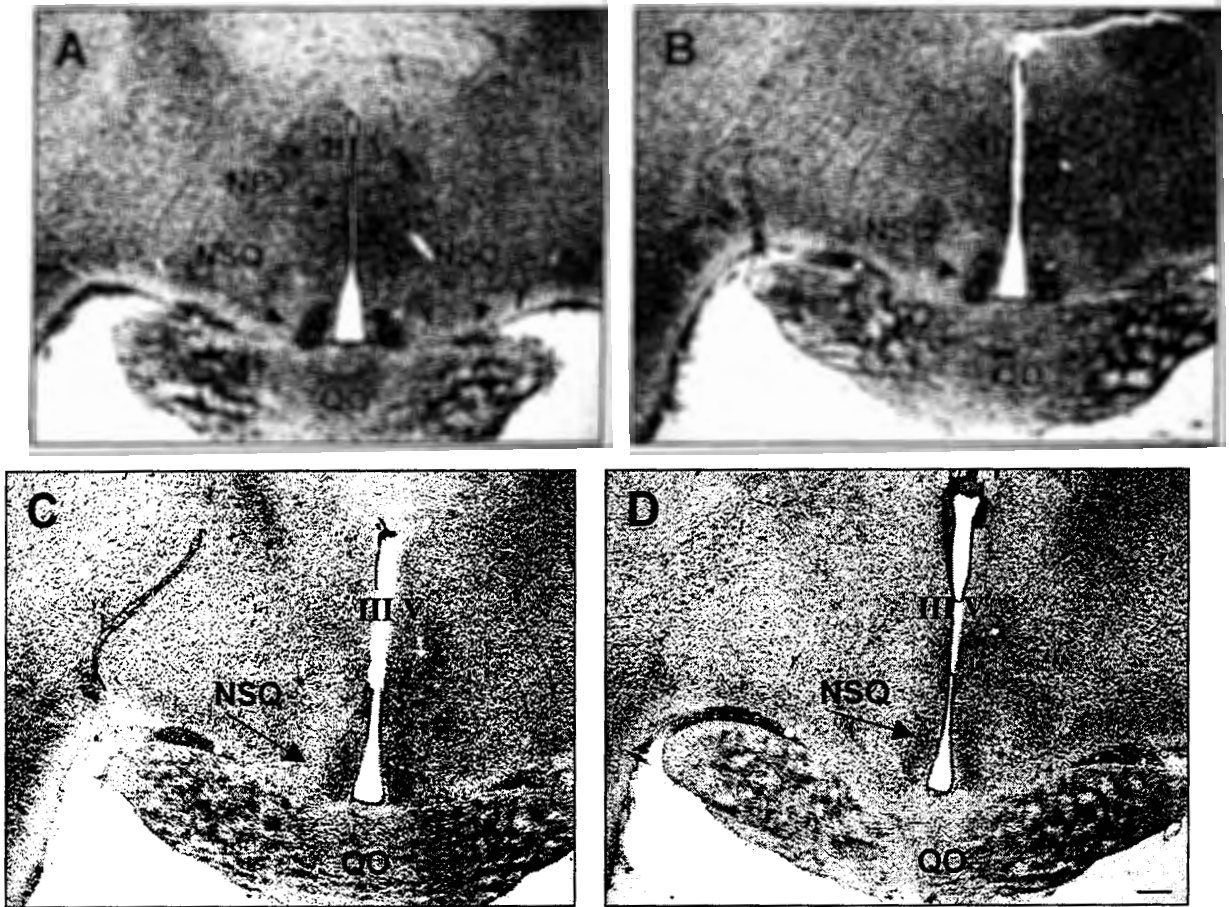


Figura 8. Delimitación del NSQ del conejo adulto por técnica de Nissl. Se observa el núcleo en un sentido antero-posterior. Area anterior (A), medial (B), medial-posterior (C) y posterior (D). Se observa la diferencia en la forma del núcleo conforme se avanza hacia el área posterior ( escala = 500  $\mu$ m).

# DELIMITACION DEL NSQ DEL CONEJO ADULTO POR TÉCNICA DE NISSL.

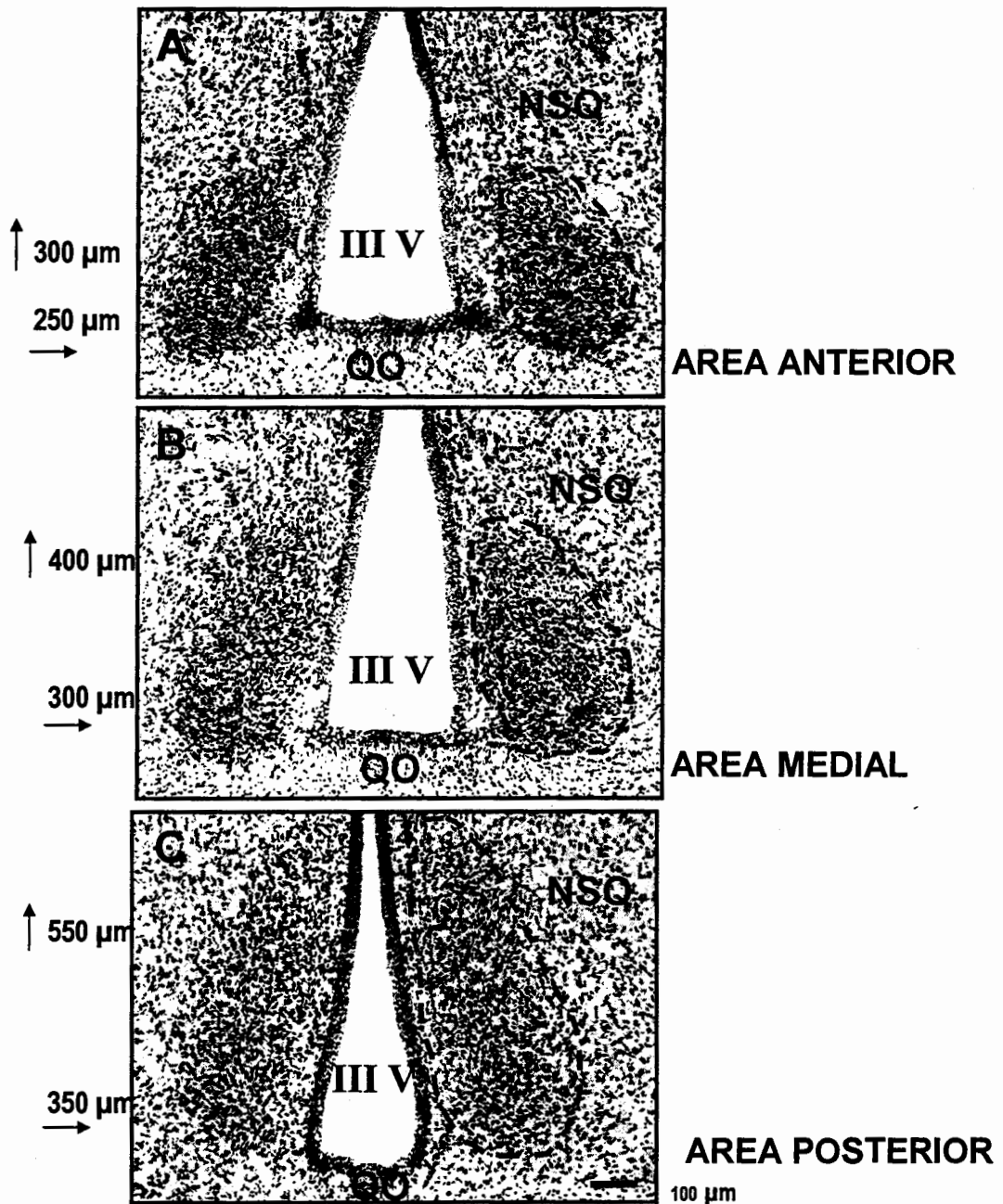


Figura 9. Delimitación del NSQ del conejo adulto por técnica de Nissl. La forma del núcleo es redondeada en la zona anterior (A) y cambia a una forma de gota en las áreas medial (B) y posterior (C). Las medidas del alto (A-300 μm; B-400 μm; C-550 μm), ancho (A-250 μm; B-300 μm; C-350 μm) y profundidad (900 μm) del núcleo se tomaron en un sentido antero-posterior.

## 10.2. Experimento 2.

### **Caracterización del Tracto Retinohipotalámico por medio de la inyección del trazador $\beta$ -Toxina del Cólera en conejos de diferentes edades.**

Los cerebros en todas las edades esto es, en el día posnatal 1 (P01), posnatal 9 (P09) y adultos, presentaron terminales que contienen al producto de reacción, por lo que se observaron fibras inmunorreactivas de  $\beta$ -TC en todas las regiones retinorrecipientes. Estas fueron el NSQ, la hojuela intergeniculada (HIG), el núcleo geniculado lateral dorsal (NGLd) y el núcleo geniculado lateral ventral (NGLv), todos observados en un sentido antero-posterior.

#### **Area anterior**

En un sentido antero-posterior, el NSQ primero aparece como una agregación poco definida de pequeñas fibras dorsales al quiasma óptico (QO) en el área hipotalámica anterior. Los axones marcados surgen desde el QO, característica que se mantiene prácticamente a lo largo de todo el núcleo. Por otra parte, las fibras presentes fuera de los límites del núcleo se observan poco evidentes y dispersas. El marcaje que se advierte dentro de los límites del núcleo todavía no es muy definido, esto es, las fibras son poco evidentes en esta área donde los procesos apenas inician su "entrada" al núcleo. No obstante que la inyección de  $\beta$ -TC se realizó en la cámara posterior de un ojo, esto es, de forma unilateral, la distribución de las fibras es bilateral con tendencia contralateral (al ojo inyectado) principalmente en las áreas posteriores, donde se observan invadiendo la mayor parte del volumen de los dos núcleos supraquiasmático. Estas características aparecen en los animales P01 (Figura 10A) P09 (Figura 11A) y en los adultos (Figura 12A).

#### **Area medial.**

En secciones sucesivas al área anterior para las tres edades, se distingue una acumulación de fibras que incrementan su densidad, hasta que el núcleo se vuelve compacto, siendo más evidentes en el área ventrolateral para los sujetos de P09 (Figuras 11 B,C) y los adultos (Figura 12B). Después que las fibras se extienden desde el área hipotalámica anterior, región donde da inicio el NSQ, su disposición da al núcleo un aspecto ligeramente ovalado a partir del QO siendo más notorio en los individuos P01 (Figura 11B) y en los adultos (Figura 12B), continuando en

un sentido antero-posterior, el grupo de fibras se vuelve mas compacto y el NSQ presenta un aspecto fusiforme, característica que se presenta en las tres edades, siendo mas evidente en los sujetos P09 (Figura 11C). Por otra parte, se advierte que el QO presenta inmunorreactividad de la  $\beta$ -TC sólo en el lado contralateral al sitio de la inyección para las tres edades, desde el área anterior hasta la posterior.

Al avanzar caudalmente se observa que en los sujetos P09 y adultos, la parte dorsal del núcleo es un poco menos compacta y las fibras se dispersan formando un "penacho" que se extiende paralelo al núcleo paraventricular (NPV) e inclusive algunas fibras ingresan a ésta zona (Figuras 13 y 14). En este nivel el NSQ presenta una ligera forma convexa y a partir de los límites del área ventrolateral del núcleo, se observan fibras dispersas que se extienden desde el borde del QO en un sentido lateral sobre el núcleo supraóptico (NSO), característica que permanece constante hasta los niveles caudales del núcleo en los sujetos de las tres edades (Figuras 13 y 14). Las fibras dentro del núcleo se observan con varicosidades repartidas homogéneamente en forma de "rosario" en toda su extensión. El patrón de distribución de las fibras es bilateral, abarcando casi todo el NSQ, esta tendencia se observa en los individuos de todas las edades, siendo notorio principalmente en los sujetos del día P09 (Figuras 11 A, B). Sin embargo existe una característica adicional ya que, aunque de forma poco notable, se observan algunas fibras aisladas o en pequeños agregados en diversas regiones hipotalámicas, principalmente en el área preóptica, área supraóptica, núcleo paraventricular e incluyendo (aunque con muy poca densidad) la región retroquiasmática. En en todos los sujetos se observa una tendencia contralateral en el marcaje de la  $\beta$ -TC.

## **Area posterior.**

En secciones sucesivas al área medial, el núcleo se vuelve menos compacto en las tres edades, ya que las fibras se dispersan a lo largo y a lo ancho del mismo y continúa paralelo al área paraventricular (NPV) donde las fibras ingresan. Finalmente, a partir de la parte caudal del NSQ, las fibras se extienden hacia el área retroquiasmática y hacia la zona subparaventricular. En esta zona, las fibras son menos densas en el borde caudal del NPV. Esto se evidencia particularmente en los individuos P09 (Figura 11C) aunque la característica es muy similar en los adultos. En todos los casos, el patrón de distribución de las fibras se observa bilateral con tendencia contralateral.

## $\beta$ -TC- P01

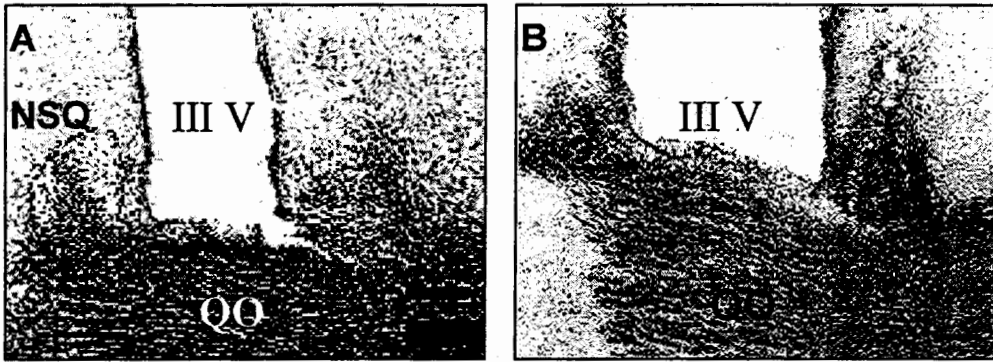


Figura 10. Conejos P01 de edad. Se observa la expresión del marcador de  $\beta$ -TC en las fibras del NSQ de los neonatos. El marcaje proveniente desde el QO, presenta una tendencia bilateral tanto en el área anterior (A) como medial (B) la cual es principalmente VL. Se observan fibras hacia el NSQ y Área paraventricular (escala =100  $\mu$ m).

## $\beta$ -TC- P 09

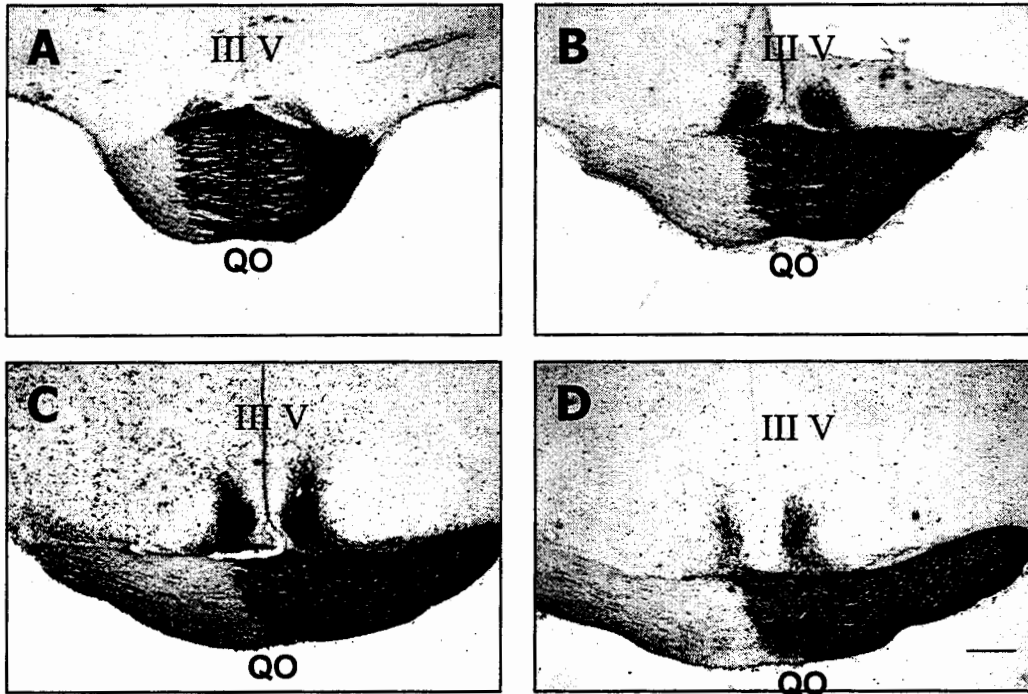
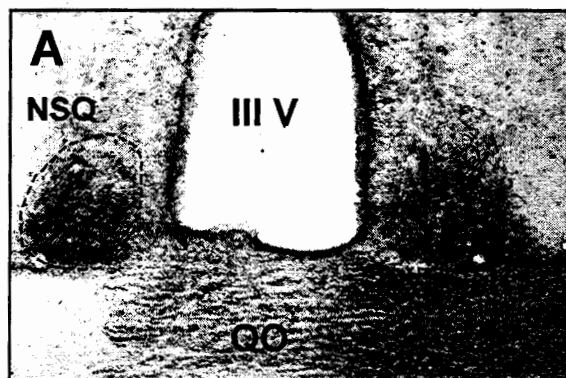
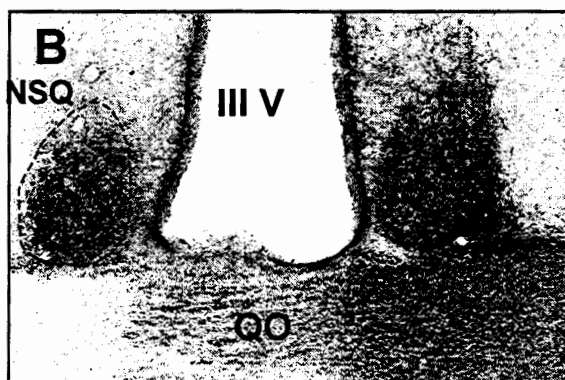


Figura 11. Conejos P09 de edad. Se observa una intensa expresión del marcador de  $\beta$ -TC en las fibras del NSQ de los neonatos. El marcaje bilateral proveniente del QO inicia desde el área anterior (A) y es mas intenso y homogéneo en las áreas medial (B) y medial posterior (C), la forma que dan las fibras al núcleo a estos niveles es convexa con respecto al III V. El área posterior del núcleo (D) presenta un marcaje ligero con fibras que se extienden a otras partes del hipotálamo. A partir de esta edad se observa el patrón que presentará el adulto (escala =500  $\mu$ m).

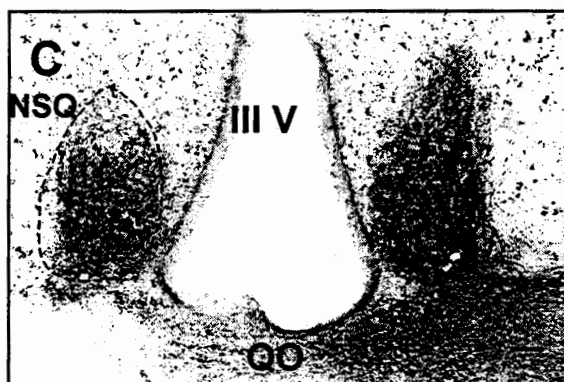
## $\beta$ -TC EN EL NSQ DEL CONEJO ADULTO



AREA ANTERIOR



AREA MEDIAL



AREA POSTERIOR

Figura 12. Conejos adultos. El patrón de distribución de las fibras inmunorreactivas a la  $\beta$ -TC es bilateral y homogénea, con ligera tendencia VL. Las fibras surgen desde el QO en el área anterior (A), medial (B) y posterior (C). En todas las áreas las fibras se extienden hacia otras áreas del hipotálamo y la forma que dan las fibras al núcleo es convexa con respecto al III V. (escala =100  $\mu$ m).

# CARACTERISTICAS DE LAS FIBRAS DEL TRH Y SU DISTRIBUCIÓN EN LAS AREAS ADYACENTES AL NSQ

Sujeto P09

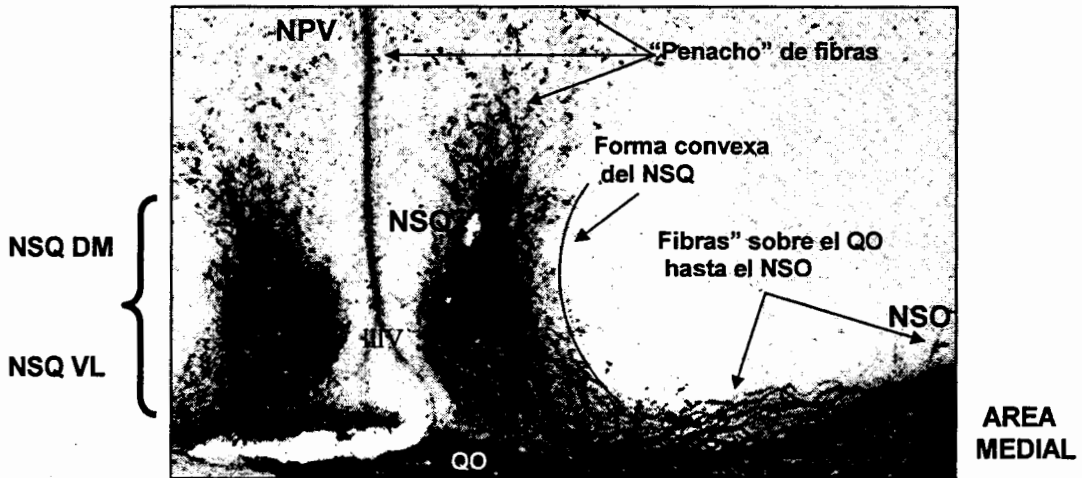


Figura 13. A partir del día 9 se observa que el NSQ es compacto, con una extensión de fibras que forman un "penacho" de fibras en la región DM las cuales "ingresan" a otras área hipotalámicas como el NPV, la base de la estria terminal (no presente en la fotografía). En porción VL las fibras también se extienden hacia área hipotalámica adyacente y sobre el QO hasta el NSO.

Sujeto adulto

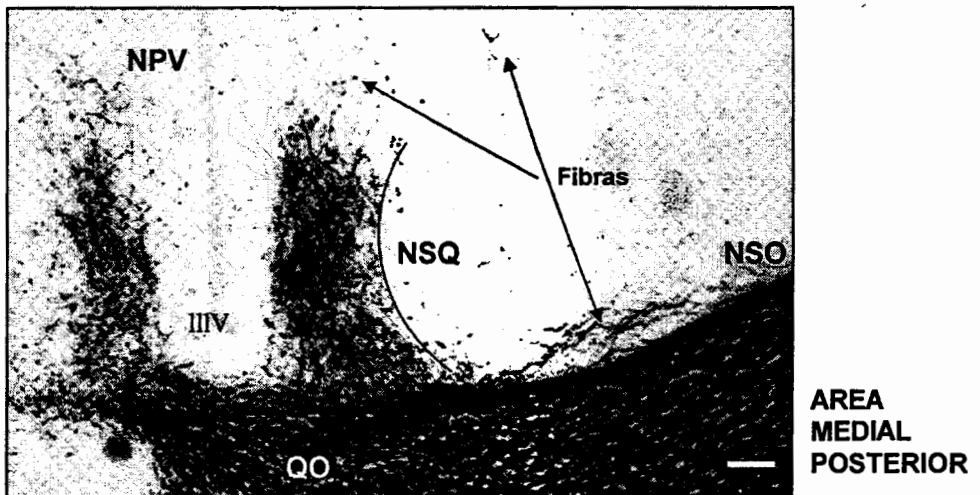


Figura 14. La distribución de las fibras del TRH en los individuos adultos presenta un patrón similar a la que presentan en un inicio los individuos P09. Las fibras, se observan CON Varicosidades repartidas homogéneamente en forma de "rosario". (escala =100  $\mu$ m)

## **Estructuras retinorreipientes fuera del NSQ:**

### **Núcleo Geniculado Lateral (NGL)**

Este núcleo se encuentra localizado en el tálamo, y junto con el NSQ es otra estructura retinorreiciente importante en el sistema circádico de la mayoría de los mamíferos. En el análisis del tejido de los cerebros tratados para todos los sujetos, se observan claramente tres subdivisiones que corroboran la innervación directa retinal en este núcleo por medio del marcaje de la  $\beta$ -TC (Figura 15A). La primera subdivisión, corresponde al núcleo geniculado lateral dorsal (NGLd) que en un sentido antero-posterior, incrementa y luego disminuye de tamaño (Figura 15B). Esta subdivisión es la mas grande del sistema geniculado lateral y las fibras marcadas forman una estructura muy homogénea. La siguiente subdivisión es la hojuela intergeniculada (HIG). Esta, se observó como una estrecha banda entre el NGLd y el núcleo geniculado lateral ventral (NGLv), se distingue claramente de las otras dos subdivisiones ya que sus fibras, que son muy gruesas, presentan una estructura en forma de huso horizontal (Figuras 15 A, B, C). Por último, el NGLv, se ubica en el área inferior con respecto a las otras dos estructuras del sistema geniculado. Esta estructura es mas pequeña que el NGLd, aunque también incrementa y luego disminuye su tamaño en un sentido antero-posterior. Las fibras marcadas, hacen que la estructura tenga una apariencia bastante heterogénea, ya que en la parte mas cercana a la hojuela presenta fibras muy finas y abundantes, mientras que en la zona mas alejada se observan fibras mas gruesas y separadas. En cuanto a la entrada retinal, el NGL (incluyendo a la HIG) recibe aferencias casi exclusivamente contralaterales, sin embargo la HIG, presentó marcaje ipsilateral muy ligero, pero lo suficiente para demarcar claramente a la estructura (Figura 15D).

# $\beta$ -TC EN AREAS RETINORRECIPIENTES FUERA DEL NSQ DEL CONEJO ADULTO

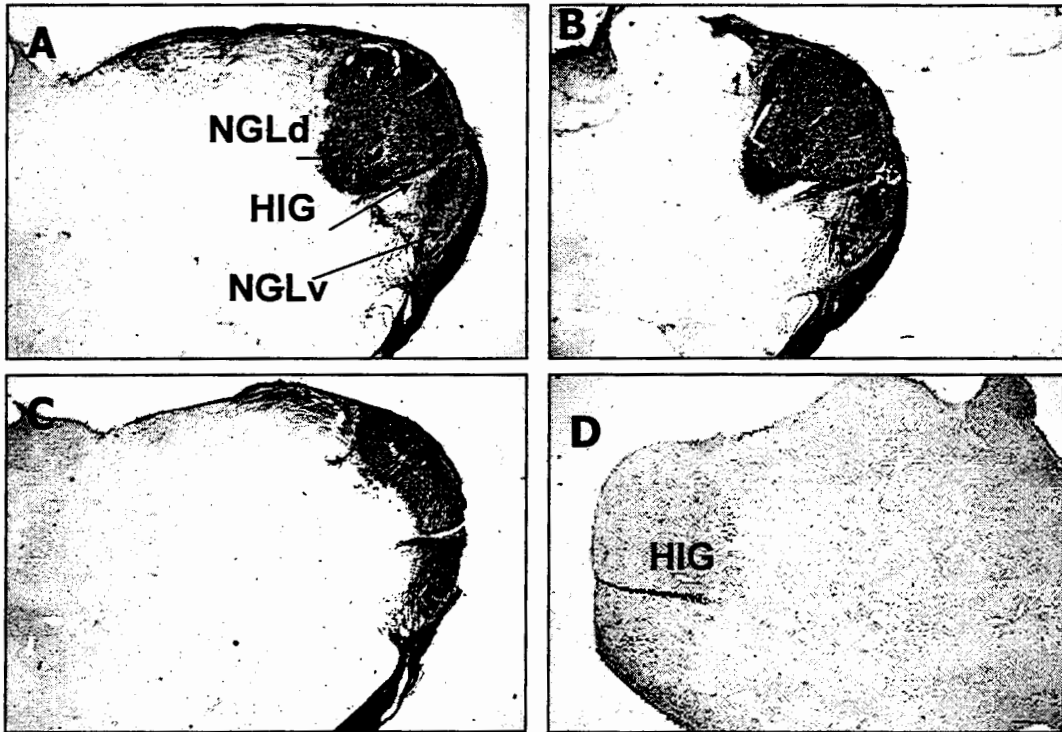


Figura 15. Estructuras retinorreipientes fuera del NSQ. El complejo geniculado lateral del conejo en un sentido antero-posterior, está compuesto por el núcleo geniculado lateral dorsal (NGLd), la hojuela intergeniculada (HIG) y el núcleo geniculado lateral ventral (NGLv; fotografías A,B, C). La estructura que se marcó bilateralmente fue la HIG (D). Todas las estructuras están presentes desde P01 hasta el adulto (escala, 50  $\mu$ m).

### **10.3. Experimento 3.**

#### **Expresión de la proteína Fos en el NSQ en condición de luz-oscuridad.**

En la condición LD, las secciones del NSQ tratadas con Fos, presentaron células ir-Fos para todos los casos, sin embargo la distribución celular se presentó de manera diferencial, esto es, el número celular fue dependiente de la hora en que se tomó la muestra, las secciones control, por otra parte, no presentaron ir-Fos. En LD, se comprobó una clara inducción por luz (ANOVA:  $p=0.0013$ ), la cual fue evidente en el número de células que presentaron ir-Fos en los horarios ZT01 y ZT05 en comparación con el resto de los horarios muestreados ( $p<0.01$ ; Figura 16). Además de las diferencias en la expresión de c-Fos en los horarios establecidos, también se observó la expresión regional de las células ir-Fos (Figura 17). A pesar de que la expresión máxima de las células ir-Fos en la condición LD fue en el horario ZT01 (Figura 17A) y la menor en el horario ZT17 (Figura 17B), la distribución celular general es homogénea entre las áreas VL y DM del NSQ.

### **10.4. Experimento 4.**

#### **Expresión de la proteína Fos en el NSQ en condición de oscuridad continua (DD).**

En los experimentos realizados en condiciones constantes de oscuridad se observó que los niveles más bajos en la expresión de células ir-Fos se presentaron en los horarios de la fase nocturna (DD; noche subjetiva). Sin embargo, fue evidente la inducción de una expresión endógena de células ir-Fos durante el día subjetivo. Específicamente en el horario CT07 (ANOVA:  $p=0.0001$ ) se presentó el nivel más elevado de esta expresión en comparación con el resto de los horarios registrados ( $p<0.01$ ; Figura 18). A pesar de las diferencias en la expresión de c-Fos entre los horarios establecidos, donde la mayor expresión fue en el horario CT07 (Figura 19A) y la menor en el horario CT19 (Figura 19B) no existe una regionalización evidente de las células ir-Fos dentro del NSQ, esto es, la distribución celular fue homogénea entre las áreas VL y DM del NSQ.

## CONDICION LD

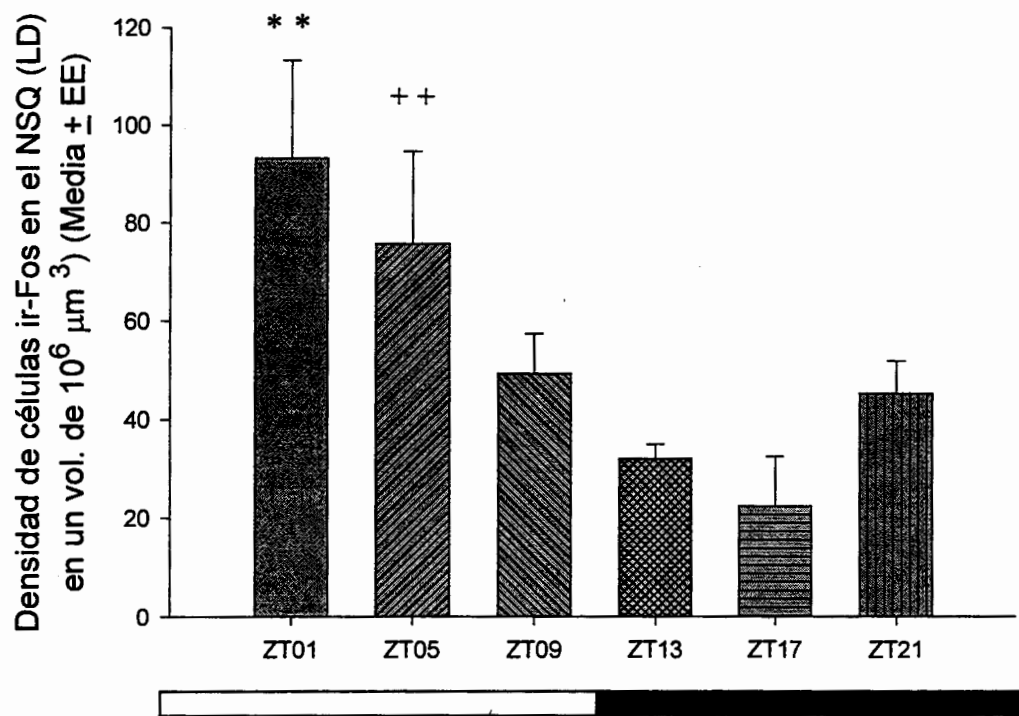


Figura 16. Número de células ir-Fos en el NSQ el conejo en condición LD. Encendido de la luz a las 7:00 am. Existen diferencias significativas \*\*, ++  $p < 0.01$  contra todos los grupos. No hay diferencia significativa entre ZT01 y ZT05.



Figura 17. Comparación de la expresión de las células ir-Fos en el NSQ del conejo en condición de LD, en los horarios de mayor (ZT01) y menor expresión (ZT17). A pesar de la diferencia en las células que expresan Fos en cada horario se observa una distribución homogénea en todo el NSQ. (escala = 100 μm).

## CONDICIÓN DD

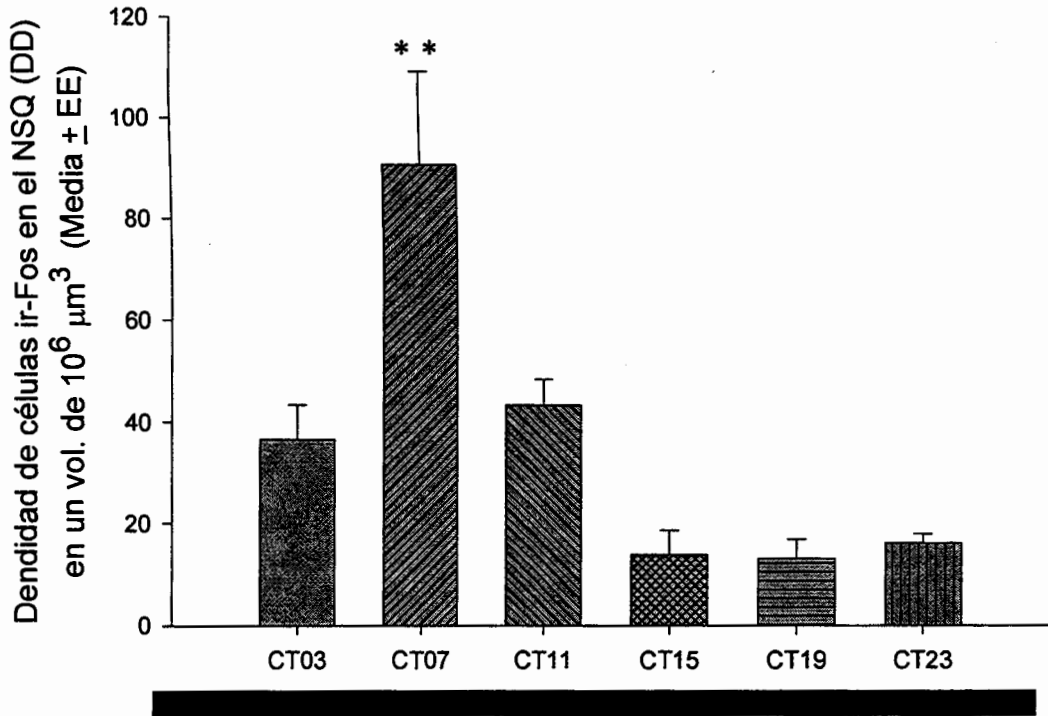


Figura 18. Número de células ir-Fos en el NSQ del conejo en condición DD. Existe diferencia significativa \*\*  $p < 0.01$  contra todos los grupos. El tiempo geográfico de CT03 corresponde a las 12:00 h, donde el periodo de libre curso o corrimiento espontáneo se corre  $24.34 \pm 0.1$  h cada día (Jilge, 1991).

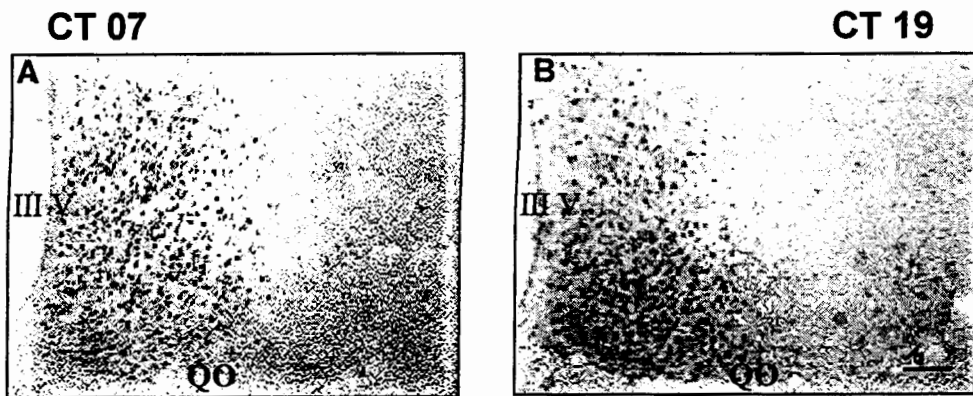


Figura 19. Comparación de la expresión de las células ir-Fos en el NSQ del conejo en condición DD, en los horarios de mayor (CT07) y menor expresión (CT19). Se observa una distribución homogénea en todo el núcleo, principalmente en CT07 (escala = 100 μm).

## 10.5. Experimento 5.

### **Inducción fótica (pulso de luz, PL) de la proteína Fos en el NSQ.**

En la fase DD, se observó de manera general, que el pulso de luz (PL) durante todos los horarios del día y la noche subjetiva, indujo inmunorreactividad de manera substancial. Sin embargo la mayor expresión de células ir-Fos fue durante la noche subjetiva (ANOVA:  $p=0.001$ ) en comparación al día subjetivo. Durante la noche subjetiva, este efecto fue mayor en CT15 ( $p<0.01$ ) y CT19 ( $p<0.01$ ) en comparación con CT11 ( $p<0.05$ ) y CT03 (Figura 20 para todos los casos). Además, otra característica importante en la expresión de las células ir-Fos después del pulso de luz, fue la evidente regionalización de la misma. Tanto para el caso de menor expresión en CT03 (Figura 21A) como de mayor expresión en CT19 (Figura 21B) la inmunorreactividad se presentó en la porción VL del NSQ.

Por otro lado, en la fase DD, se estableció una comparación entre la expresión endógena (experimento 3) y la expresión por pulso de luz de las células ir-Fos en el NSQ (Figura 22), para los mismos horarios de cada caso. En los horarios CT03 y CT11 (Figura 22), no hubo diferencias significativas en el número de células que expresaron c-Fos. Para el caso de los horarios CT15 y CT19 (Figura 22), al comparar los valores de la expresión espontánea de las células ir-Fos, contra sus valores correspondientes con pulso de luz, se observó un incremento significativo ( $p<0.001$ ) en la expresión de las células ir-Fos en la situación del pulso de luz, al mismo tiempo, esta expresión se presentó principalmente en el área VL del NSQ.

### **Comparación de la distribución de las células ir-Fos en LD, DD y pulso de luz (PL) dentro del NSQ.**

Por último, se realizó una comparación entre la distribución de las células que expresaron la mayor cantidad de células ir-Fos en el NSQ en los horarios ZT01 (condición de LD; Figuras 23A y 24A) y CT07 (condición DD; Figuras 23B y 24B). En ambos horarios, la distribución celular no presentó diferencias significativas entre el área DM y VL del NSQ. Por otra parte se realizó la comparación de la distribución de las células ir-Fos entre dos horarios correspondientes, en CT19 (condición DD, Figuras 23C y 24C) y en respuesta a un pulso de luz en CT19 (Figuras 23D y 24D). En el primer caso, hay pocas células ir-Fos y no existen diferencias significativas entre las áreas DM y VL del NSQ. Sin embargo para el segundo caso, se observa una gran cantidad de células ir-Fos en respuesta al pulso de luz y la distribución presenta un incremento significativo ( $p<0.05$ ) en el área VL en comparación con el área DM del NSQ.

## PULSO DE LUZ

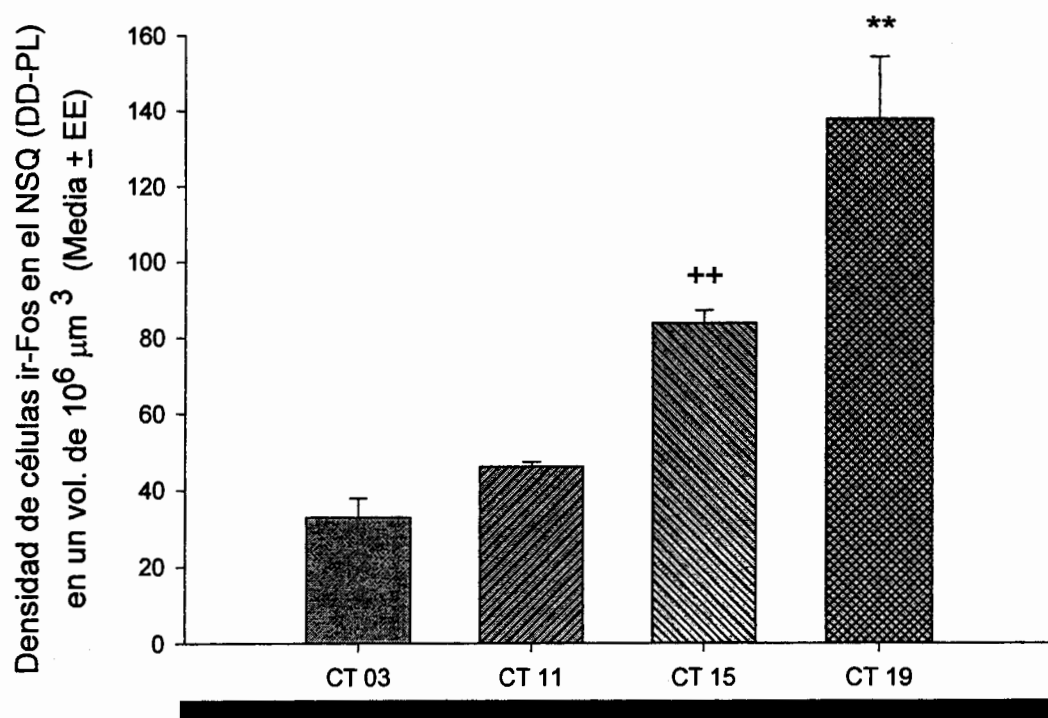


Figura 20. Número de células ir-Fos en condición DD con un pulso de luz en CT03, CT11 del día subjetivo y CT15, CT19 de la noche subjetiva. Existe diferencias significativas ++, \*\*  $p < 0.001$ , en CT15 y CT19 contra CT03 y CT11.

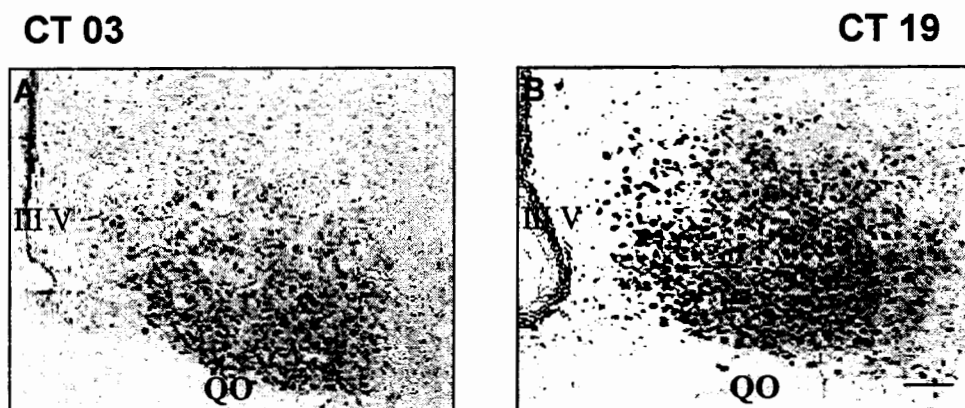


Figura 21. Comparación de la expresión de las células ir-Fos en el NSQ del conejo en condición DD y con un pulso de Luz. Se observa diferencia entre el horario de menor (CT03) y mayor expresión (CT19) en cuanto a la distribución de la inmunorreactividad ya que es mas evidente en el área VL del NSQ en CT19 (escala =  $100 \mu\text{m}$ ).

# DISTRIBUCIÓN DE LAS CÉLULAS ir-Fos EN EL NSQ EN CONDICIÓN DD CON PULSO Y SIN PULSO DE LUZ EN HORARIOS CORRESPONDIENTES

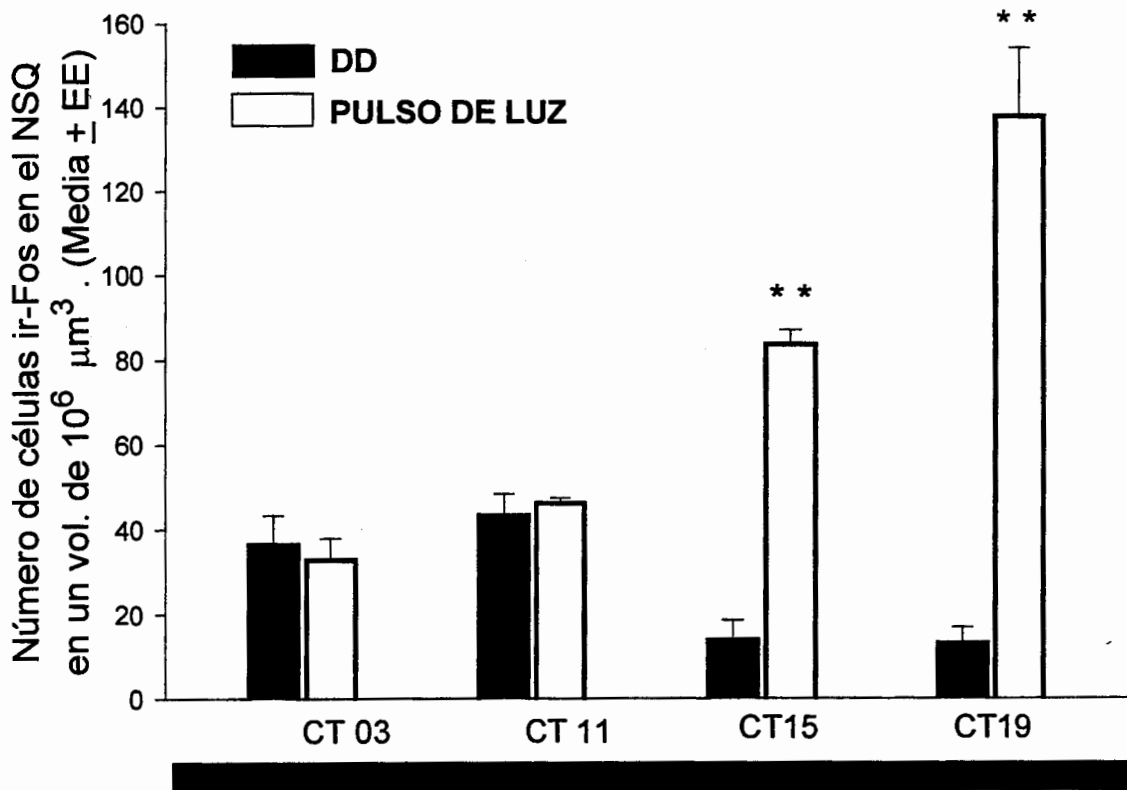


Figura 22. Comparación de células ir-Fos en el NSQ del conejo con pulso de luz (barras vacías) o sin pulso de luz (barras llenas) en CT03, CT11 ( día subjetivo) y CT15, CT19, noche subjetiva. Se observa un incremento significativo (\*\*, \*\* p<0.001), en CT15 y CT19 contra sus valores correspondientes sin pulso de luz.

## DISTRIBUCION VL-DM DE CÉLULAS Ir-Fos EN EL NSQ EN DIFERENTES HORARIOS

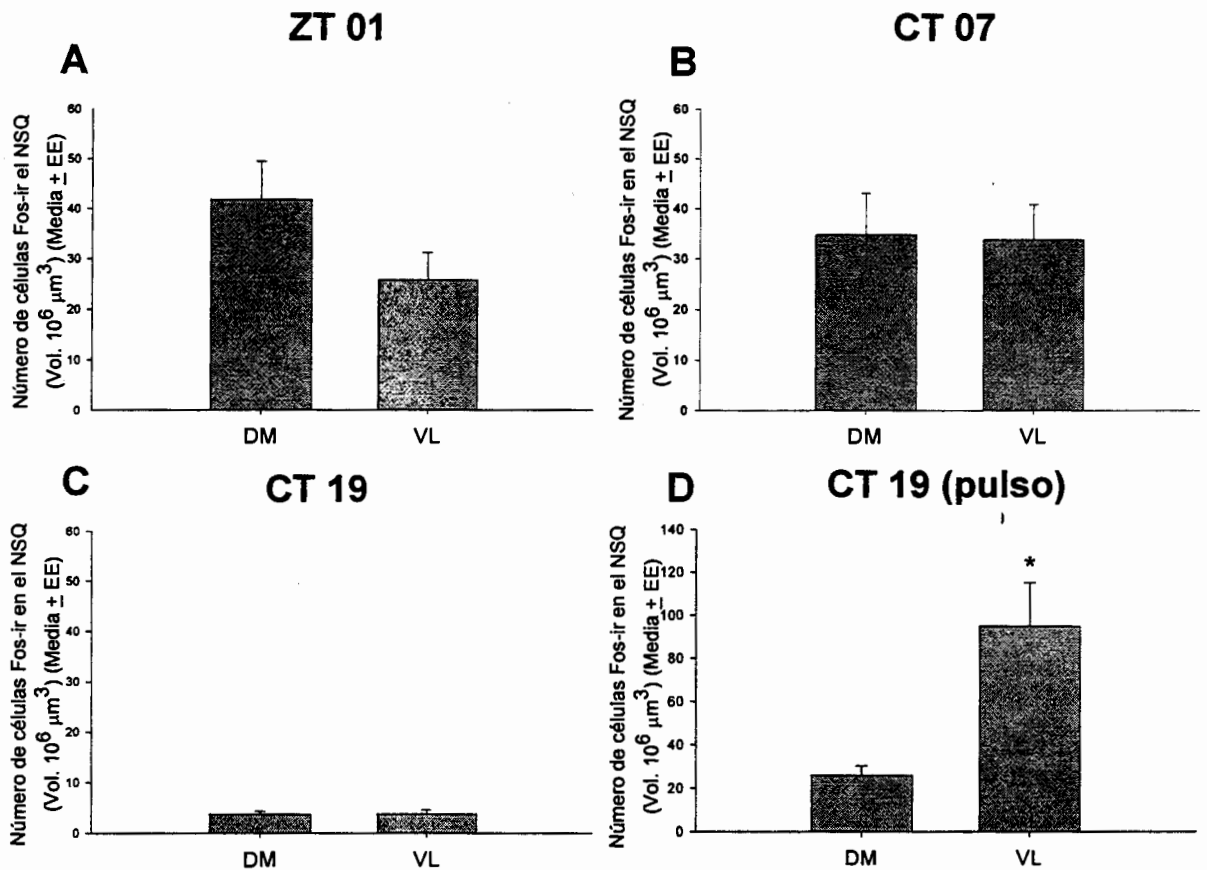


Figura 23. Expresión de células Ir-Fos en el NSQ del conejo en ZT01 durante la condición de LD (A), CT07 en DD (B), CT19 en DD (C) y en respuesta a un pulso de luz en CT19 en DD (D). Se observa que la distribución de las células Ir-Fos están distribuidas de forma homogénea para los tres primeros casos (A,B,C) donde no existen diferencias significativas. En respuesta a un pulso de luz (D) se observa que las células Ir-Fos se distribuyen significativamente en el área VL (\*  $p < 0.05$ ) en comparación con el área DM del NSQ.

# DISTRIBUCION VL-DM DE LAS CÉLULAS DE FOS EN EL NSQ

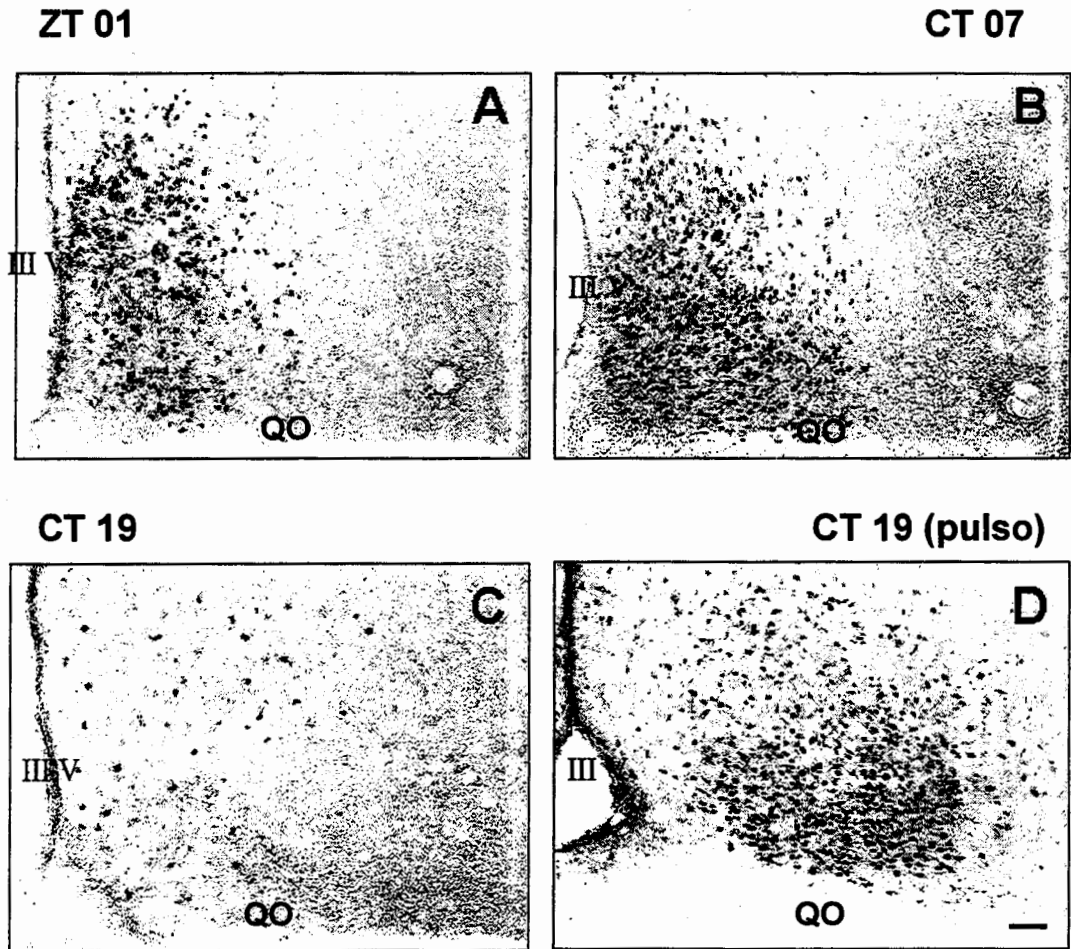


Figura 24. De acuerdo a las condiciones de LD (A) y DD (B,C,D), se observa una diferenciación en la distribución de las células ir-Fos. En los horarios de mayor expresión en ZT01 (A) y CT19 (B) se observa una distribución homogénea de las células ir-Fos con una tendencia DM. En el horario CT19 con pulso de luz, se observa una importante diferencia en la expresión de la proteína Fos ya que la expresión es VL, con respecto a CT19 (escala =50  $\mu\text{m}$ ).

## 11. DISCUSIÓN

### 11.1. Anatomía general del NSQ en conejo.

De acuerdo a los resultados obtenidos con la tinción de Nissl se observó que la ubicación del núcleo en el hipotálamo concuerda plenamente con lo reportado para otras especies de mamíferos. El núcleo se presenta pareado, y se ubica a cada lado del tercer ventrículo, por encima del QO (Abrahamson y Moore 2001; Moore, 1982; Klein et al, 1991; Johnson et al., 1988). Sin embargo existen diferencias en cuanto a su forma y tamaño. En nuestros sujetos experimentales, el núcleo es grande (900  $\mu\text{m}$  de largo, 550  $\mu\text{m}$  de alto y 350  $\mu\text{m}$  de ancho en su medida máxima) en comparación con otras especies como la rata (750  $\mu\text{m}$  x 300  $\mu\text{m}$  x 300  $\mu\text{m}$ ) (Johnson et al., 1988, Ibata et al., 1999), hámster (650  $\mu\text{m}$  x 300  $\mu\text{m}$  x 200  $\mu\text{m}$ ) (Johnson et al 1988) y ratón (350  $\mu\text{m}$  de alto x 300  $\mu\text{m}$  de ancho) (Abrahamson y Moore 2001). Por otra parte en las especies mencionadas su forma es ovoide o redonda, mientras que en el conejo tiende a ser mas ancha en el área ventral (cerca del QO) y angosta en la parte dorsal. Las coincidencias anatómicas, muestran que en mamíferos el NSQ es pequeño en relación con otros núcleos cerebrales como el NPV o NSO (Ibata, et al, 1999).

### 11.2. Tracto retinohipotalámico.

En este primer reporte acerca del TRH en el conejo, se utilizó la técnica del trazador anterógrado  $\beta$ -TC como marcador de las fibras. Con esta técnica analizamos el desarrollo del tracto (en el infante) así como el patrón de distribución en el animal adulto. Existen pocos estudios sobre el desarrollo y la ontogenia del TRH en otras especies, sin embargo en rata y el hámster, hay algunos estudios al respecto (Speh y Moore, 1993). Existen notables diferencias y similitudes en el desarrollo del TRH del conejo en relación con estas especies. En la rata, las primeras fibras que alcanzan el NSQ aparecen en el día postnatal 1 (P01) observándose principalmente en la porción ventral, en el día P04; también se observan fibras en la porción lateral del NSQ. En el día P15, se alcanza el patrón del adulto que consiste básicamente en la misma distribución que en el P04, con la diferencia de que se observa una mayor densidad en la misma región ventrolateral (Speh y Moore, 1993). En el hámster, existe un desarrollo diferente, ya que las primeras fibras que alcanzan el NSQ se observan hasta el día P04, a diferencia de la rata. Este marcaje aparece únicamente en la porción ventral del NSQ, justo dorsal al quiasma óptico, y a partir de los días P06-P08 se

observa que los neonatos alcanzan gradualmente toda la porción ventrolateral del NSQ hasta el día P15, donde alcanzan finalmente el patrón del adulto. Este patrón consiste de una intensa inervación de la región ventrolateral del NSQ, el cuál tiene forma de media luna, con los extremos dirigidos hacia el tercer ventrículo (Speh y Moore, 1993). Esto es, ni en la rata ni en el hámster se observan fibras en la región central del NSQ, sólo se observan en la porción dorsal-lateral del NSQ.

En nuestros sujetos experimentales, encontramos que en el día P01 ya se observan fibras inervando el NSQ, en su porción ventral y aparentemente ocupando la mayor parte del volumen del núcleo. En esta edad las secciones anteriores del núcleo presentan proyecciones que se observan principalmente en la región ventral, mientras que en las secciones mediales se observa que inervan prácticamente todo el NSQ con fibras que sobresalen hacia la región supraóptica. En secciones posteriores la inmunorreactividad de la  $\beta$ -TC se observa también fuera de los límites del NSQ principalmente hacia la región subparaventricular y siguiendo el patrón hacia la región supraóptica. Las fibras que se observan formando la región mas posterior del NSQ inervan al área retroquiasmática. Esta distribución es similar a la observada en rata, hámster (Johnson et al 1988) y ratón (Abrahamson y Moore 2001, Schuett et al., 2002, ). En cuanto a las edades en que se observó la inervación de fibras en el NSQ, nuestros resultados coinciden con los datos en la rata (Speh y Moore, 1993), ya que igualmente encontramos inmunorreactividad desde el día P01. Por otra parte, observamos diferencias significativas con respecto a la rata y el hámster ya que el marcaje de  $\beta$ -TC ocupó prácticamente todo el volumen del NSQ, a diferencia de las otras especies en las que solo se observa en la porción ventral (rata) ó ventrolateral (hámster). En otras especies de mamíferos (adultos) estudiados (Cooper y Magnin, 1989), incluyendo al humano (Dai et al, 1998) las fibras del TRH se observan también de manera abundante en la región ventrolateral del NSQ.

Además de estas diferencias en la inervación del NSQ, el TRH presenta fibras de proyección hacia otras regiones hipotalámicas y extra-hipotalámicas. En el conejo estas fibras son escasas y se observan en diversas regiones del hipotálamo, como se mencionó en Resultados, sin embargo son mas evidentes en el día P15 y en adultos, a diferencia de los sujetos del día P01. Esta observación difiere de patrón que presenta la rata (Speh y Moore, 1993), en las que se observa una gran cantidad de fibras en diversas regiones hipotalámicas, aunque hacia el día P15 la mayoría ha desaparecido y este patrón persiste en el animal adulto. La disminución de fibras sugiere una maduración de conexiones funcionales hacia el hipotálamo, lo cuál se apoya en datos que indican una pérdida de células ganglionares de la retina y de sus axones durante el desarrollo postnatal en la rata (Lam et al., 1982). Estos cambios en etapa postnatal se observan

también en el NSQ. En este sentido, estudios hechos por Muller y Torrealba (1998) reportan que en hámsters se presenta muerte celular (apoptosis) desde la etapa prenatal. Sin embargo, después del nacimiento, durante los 3 primeros días postnatales, el número de neuronas en el NSQ se incrementa notablemente, alcanzando un pico máximo que posteriormente decae de manera aguda hasta en un 40%. Durante este tiempo, se presenta la inervación de las conexiones retinales hacia el NSQ, quedando establecida entre los días P04-P05, lo que concuerda con lo encontrado por Speh y Moore (1993) y con nuestros animales. Estos estudios sugieren que la innervación se presenta después de la segunda etapa de apoptosis celular del NSQ, patrón que será consistente a hasta la etapa adulta. En cuanto a las eferentes del NSQ, se reporta que la invasión a sus áreas blanco se presenta también durante los primeros días postnatales, observándose incremento en la densidad de las proyecciones en días subsecuentes. Estas evidencias sugieren que la muerte neuronal masiva en el NSQ de mamíferos posiblemente es seguida por las últimas etapas de formación del tracto retinohipotalámico hacia el patrón del adulto (Muller y Torrealba, 1998).

En base a estas evidencias se ha propuesto que en ratas y hámsters (Speh y Moore, 1993) existe una relación temporal entre el período de muerte celular ontogenética y el establecimiento de las principales conexiones aferentes y eferentes del NSQ. En el conejo este proceso no se observa tan claramente ya que las fibras hacia otras regiones fuera del NSQ aparecen gradualmente siendo similar al desarrollo del hámster.

Las principales áreas identificadas en el hipotálamo que reciben proyecciones del TRH, fuera del NSQ fueron el área preóptica lateral y el área talámica donde se observaron pocas fibras muy diseminadas. No es clara la procedencia de estas fibras, pero según lo reportado en estudios realizados en roedores (ratas y ratones) (Pickard et al., 1987; Kawano et al., 2001) se demostró que las mismas células ganglionares que inervan tanto al NSQ como a la hojuela intergeniculada mandan colaterales a éstas áreas. Por último, otro componente que se observa, es el del área retroquiasmática, donde la distribución de estas fibras en el conejo también coincide con lo reportado para las otras especies, ya que se forma un plexo axonal en esta área. No obstante, las fibras están mas diseminadas que lo observado en el NSQ.

Por otra parte, en nuestros animales, también se evaluó la inmunorreactividad de las fibras que forman al tracto geniculohipotalámico (TGH) constituido por el núcleo geniculado lateral dorsal (NGLd) y ventral (NGLv) así como la hojuela intergeniculada (HIG). Estas estructuras se han identificado como una importante fuente de información indirecta hacia el NSQ y están presentes en todas las edades estudiadas.

La HIG, es la única estructura del complejo geniculado lateral que se observó bilateralmente en todas las edades ya que la región ventral y dorsal del núcleo geniculado presentaron un marcaje casi imperceptible. Esto es importante, ya que se considera que HIG tiene un papel funcional en el contexto de la regulación circádica del individuo, aunque esto no ha sido establecido con precisión. Sin embargo, lesiones electrofisiológicas en ésta área, producidas por el paso de corriente eléctrica constante ( $0.06\mu\text{A}/60\text{s}$ ) en rata (Johnson et al., 1988), hámster (Harrington y Rusak, 1986, 1989; Jacob et al., 1999) y ratón (Pickard, 1989; Pickard, 1994; Lewandowsky y Usarek, 2002) provocan una alteración del ciclo circádico general. En este sentido, se observan adelantos o retrasos en sus periodos de actividad tales como la actividad locomotora. En general se ha sugerido que el complejo geniculado lateral (particularmente la hojuela) constituye un importante elemento anatómico en el mecanismo del sistema de mantenimiento del ciclo circádico. Este es el mediador para la transferencia de información tanto fótica (desde el NSQ) como no fótica, hacia otras partes del cerebro desde el NSQ, modulando al mismo tiempo la actividad de este último (Lewandowsky y Usarek, 2002).

Teniendo en cuenta que la función principal del TRH es la de proveer información fótica directa para sincronizar al NSQ, en nuestro trabajo se demostró que el área de inervación de las fibras en las diferentes edades se presentó en la zona retinorreceptiva (VL) del NSQ. Como se mencionó, solo la zona ventral del núcleo expresa a la proteína Fos después del estímulo luminoso aplicado durante la noche subjetiva en adultos (Toledo et al., 2002) esta respuesta es similar a lo observado en otras especies de mamíferos como rata (François-Bellan et al., 1999; Krajnak et al., 1997; Meijer et al., 1985, 2001), hámster (Abe y Rusak, 1994; Chambille et al., 1993; Meijer et al., 1985, 2001) y ratones (Collwel y Foster, 1992). Sin embargo, por ahora no es claro si las fibras del TRH que observamos en el NSQ de los conejos neonatos ya son funcionales para las edades P01 y P09. Con esta idea, en nuestro laboratorio se iniciaron una serie de experimentos donde animales en edades P01, P03, P07 y P12 han sido puestos en condición de oscuridad constante y posteriormente son expuestos a un pulso de luz en diferentes horarios del día y la noche subjetiva. Los resultados preliminares indican que hay expresión de la proteína Fos en todas las edades aunque hasta el momento, no se observa una clara diferenciación de la expresión en los horarios a los que fueron expuestos los neonatos, así como tampoco en las áreas ventral y dorsal del NSQ, en comparación con el adulto (Caba et al., en preparación). Al respecto, estudios realizados en ratas reportan que ya existen oscilaciones circádicas en el NSQ durante la etapa prenatal (Reppert y Schwartz, 1984, Reppert et al., 1987; Shibata y Moore 1987), sin embargo, es hasta el día P03 que los neonatos presentan una clara fotoinducción y expresión de la

proteína c-Fos tanto en el día como en la noche subjetiva. Esta expresión tampoco es diferencial, esto es, se presenta de manera similar y homogénea dentro del NSQ, tanto en número como en las áreas VL y DM en los diferentes horarios. Es hasta el día P10 donde ya se observa una diferenciación en el número de células ir-Fos así como un claro marcaje en el área VL del NSQ (Bendová et al., 2004).

La actividad del NSQ en ratas durante la etapa fetal se ha demostrado también en la actividad metabólica del mismo, utilizando el método autorradiográfico de la desoxiglucosa marcada (DG). El NSQ en esta especie oscila durante la vida prenatal ya que manifiesta un ritmo diario en su uso y asimilación, con una alta actividad durante el día y una baja actividad durante la noche (Reppert y Schwartz, 1983, Reppert et al., 1984). Sin embargo, la lesión del NSQ materno interrumpe el desarrollo del sistema circádico del neonato, puesto que en condiciones constantes la actividad locomotora de estos animales es arrítmica y sin coordinación (Davis y Groski, 1983; Reppert y Schwartz, 1986). También se ha mostrado que, aunque el NSQ de los neonatos está activo, no está directamente sincronizado por la luz que penetra a través del vientre de la madre, y en vez de ello, el sistema circádico de la madre es el que coordina el tiempo (fase) del NSQ fetal, el cual prevalece sobre las condiciones de luz.

Por otra parte se ha reportado que la oveja en las primeras etapas de desarrollo, presenta expresión de c-Fos en el NSQ durante la etapa fetal, en respuesta a un estímulo luminoso (Constandil et al., 1995). Sin embargo, en este caso, se reporta que existe una diferenciación de las áreas de expresión de la proteína ya que las neuronas inmunorreactivas que se expresan en el período de oscuridad están localizadas principalmente en el área VL del NSQ. Estas evidencias muestran que los cambios de luz-oscuridad en la actividad molecular es consistente con la presencia de un oscilador en el NSQ fetal en esta especie (Constandil et al., 1995). En ratones el caso es similar, ya que se reporta la existencia de una percepción directa de la luz durante la etapa fetal de los individuos, pero este sincronizador es poco potente a diferencia de la sincronización que da la madre, la cual, de alguna manera sincroniza el NSQ del neonato (Weaver y Reppert 1989a, 1989b).

La coordinación circádica materna es una importante influencia en la etapa fetal de los críos y continúa siéndolo dentro la etapa postnatal temprana (Reppert y Schwartz et al, 1984; Reppert, 1985; Takahashi y Deguchi, 1983; Shimoda et al., 1986). Durante la etapa postnatal, el neonato empieza a responder directamente a la luz a través de su propia vía retinohipotalámica donde la respuesta del NSQ a la luz todavía no es diferencial (Repperty Schwarz, 1984). El sistema circádico materno sincroniza el tiempo del reloj fetal sobre los ciclos LD y asegura que el desarrollo del feto se coordine con el mundo exterior hasta la maduración de

la vía retinohipotalámica, etapa que hasta el momento no ha sido determinada con exactitud. Se ha sugerido que este esquema de desarrollo en los ritmos circádicos, también se presenta en humanos. (Reppert et al., 1988). Estos estudios nos permiten presentar una primera aproximación de lo que sucede en el desarrollo del sistema circádico del conejo, indicando la posibilidad de que en las primeras etapas de esta especie, se presentan respuestas a la estimulación fótica y que el TRH es funcional a pesar de que su principal sincronizador es el alimento (la madre) (Jilge, 1995; Caba y Rovirosa, 2002; Caba et al., 2003).

Hasta el momento, podemos decir que el tracto retinohipotalámico del conejo ya se encuentra presente en los días 1 y 9 postnatal aún cuando los gazapos dependen principalmente del alimento y no de la luz para sincronizarse. En el conejo adulto las fibras del TRH, aunque están presentes en la región ventrolateral del NSQ, ocupan gran parte del volumen de dicho núcleo, abarcando tanto la región central como la corteza, con una tendencia contralateral hacia el lado donde se realizó la inyección. Es necesario determinar por medio de experimentos de doble marcaje, si las fibras que se observan en todo el núcleo realizan contactos sinápticos en el mismo y si estos contactos sinápticos presentan una regionalización. Por último es necesario determinar cuál es la naturaleza fenotípica de las células sobre las que se realizan estos contactos. Con esta información será posible determinar cuál es el significado funcional de las características especiales del TRH de esta especie.

### **11.3. Inmunorreactividad a la proteína Fos en LD.**

En la célula nerviosa, la expresión de Fos se induce rápida y transitoriamente en respuesta a una gran variedad de estímulos externos. En el sistema nervioso los niveles basales de la expresión de c-fos así como su proteína producto Fos son normalmente bajos, pero incrementan en respuesta a estímulos fisiológicos relevantes. En nuestros estudios al evaluar la actividad del NSQ en respuesta al estímulo luminoso, durante periodos de luz-oscuridad, observamos un ritmo diario de Fos. Al respecto, nuestros resultados concuerdan con estudios previos realizados en roedores. Se ha demostrado que en ratas, ratones y hámsters, expuestos al ciclo LD 12:12 h, se presenta una expresión rítmica de Fos-ir en el NSQ. Esta expresión, alcanza su máximo nivel en la fase de luz, particularmente durante las primeras horas del día, y posteriormente declina y permanece baja durante el resto del ciclo (Earnest et al., 1990; Kononen et al., 1990; Colwell y Foster, 1992). Al parecer este ritmo detectado en LD es una

consecuencia directa de la luz ambiental y no un reflejo de una ritmicidad endógenas de la proteína. Este planteamiento apoya nuestros resultados de los experimentos en LD (experimento 2) y DD (experimento 3). Para el primer caso, la máxima expresión de la proteína se presentó en las primeras horas del día, específicamente en ZT01 y ZT06. Para el segundo caso (DD), donde no hubo estímulo luminoso, la máxima expresión se presentó en CT07 de manera espontánea. Esto es, nuestros animales alojados en condiciones constantes de DD presentaron expresión de la proteína Fos pero con menos intensidad (con respecto a la expresión en LD) y en horarios diferentes, resultados que se discutirán mas adelante. Los resultados en LD, apoyan la idea de una participación de la proteína Fos en el sistema circádico del conejo. En este sentido, la proteína Fos parece estar desempeñando un papel fundamental en acoplar la señal del medio ambiente con el oscilador.

En estudios cronobiológicos se ha reportado que el conejo se considera un animal predominantemente nocturno, sin embargo el ruido y los disturbios externos durante la fase de luz, puede cambiar su actividad a un patrón diurno. (Jilge, 1991). Por lo tanto, es posible que nuestros animales experimentales, bajo las condiciones de bioterio en que se encontraban fueran mas bien animales diurnos. En este sentido es importante señalar que, independientemente del patrón de actividad del conejo, las respuestas del NSQ podrían ser independientes de este estado. Para subrayar esta característica, se ha discutido ampliamente que tanto roedores diurnos tales como la rata de campo (*Arvicanthis niloticus*; Katona et al., 1998; Novak et al., 2000, Nunez et al., 1999). La ardilla común (*Spermophilus lateralis*; O'Hara et al., 1997) y la ardilla de bosque (*Octodon degus*; Krajnak et al, 1997) como nocturnos, rata (*Rattus norvegicus*; Earnest et al., 1990; Nunez et al., 1999; Rusak et al., 1992), hámster (*Mesocricetus auratus*; Kornhauser et al., 1990) y ratón (*Mus musculus*; Collwel y Foster., 1992) presentan similitudes en la actividad del NSQ. Por ejemplo, se sabe que en todas estas especies el NSQ es metabólicamente mas activo durante el día que durante la noche (Salter et al., 1998, Schwartz et al., 1983). Por otra parte, el patrón de la expresión de la proteína c-Fos, en el NSQ, se presenta de manera similar cuando estos animales de actividad diurna (Katona y Smale, 1997; Novak et al., 2000) o nocturna (Kononen et al., 1990; Rusak et al., 1992; Nunez et al., 1999) son mantenidos en ciclos de LD 12:12. Esto es, la inmunorreactividad a Fos es alta en la fase de luz y baja durante la fase oscura. Adicionalmente, los picos de disparo neuronal en el NSQ, se dan en la fase de luz independientemente si los animales son activos en el día como es el caso de la ardilla de bosque (Sato y Kawamura, 1984) y cobayo (Kurumiya y Kawamura, 1988) o durante la noche como es el caso de la rata albina

(Inouye et al., 1982; Gillette y Reppert, 1987) y el ratón (Collwel y Foster, 1992).

#### **11.4. Inmunorreactividad a la proteína c-Fos en DD.**

La proteína c-Fos también se expresa rítmicamente en el NSQ en ausencia de un estímulo luminoso. En estudios realizados con hámsters (Chambille et al., 1993) y ratas (Sumová et al., 1998), se reporta que animales mantenidos bajo condiciones constantes de oscuridad, presentan una expresión de la proteína Fos durante el día subjetivo. Sin embargo, en estos trabajos se advierten diferencias conspicuas tanto en la localización de las células inmunorreactivas como en los horarios en que estas se expresan dentro del NSQ. Por un lado en el trabajo de Sumová et al. (1998), se reporta que existe un ritmo circádico de Fos que alcanza su máxima expresión por la mañana, dos horas después del inicio e la fase de luz (en el día subjetivo), con un descenso significativo durante la noche subjetiva. Por otra parte en el trabajo de Chambille et al. (1993) se reporta que existe una mayor expresión de la proteína c-Fos durante el día subjetivo en los horarios CT07 y CT11, esto es, hacia la mitad y final del día subjetivo. Otros datos controversiales, reportan que en ratas, no existe expresión de Fos con respecto al tiempo circádico bajo las mismas condiciones que los animales anteriores (Edelstein et al., 2000). En nuestros sujetos experimentales encontramos que existe un ritmo circádico en DD que alcanza una mayor expresión en CT07 dentro del día subjetivo, disminuyendo paulatinamente en el resto de los horarios. Nuestros resultados en conejo están de acuerdo con lo encontrado por Chambille et al (1993) en cuanto al horario de la expresión de la proteína. Por el momento es difícil conciliar nuestros resultados con otros datos encontrados previamente aunque en general hay concordancia en que existe una expresión endógena de Fos en el día subjetivo, sin embargo los horarios en que se presenta esta expresión no coinciden del todo. Esto puede estar dado por las diferencias intrínsecas que existen entre especies y, aunque de manera parcial, en los métodos y anticuerpos utilizados en las técnicas realizadas para cada caso. Por ejemplo, en la técnica utilizada por Edelstein et al (2000) donde los animales se sacrificaron en tiempos circádicos similares a los demás trabajos, se utilizaron anticuerpos de Fos hechos en conejo o ratón. En nuestros experimentos por otra parte, se utilizó un anticuerpo comercial hecho en cabra (Santa Cruz) lo cual potencialmente podría ser una fuente de variabilidad entre nuestros datos y los mencionados.

En base a las características tanto morfológicas como fisiológicas del NSQ en mamíferos, éste se ha dividido en un área ventrolateral (VL) y una

dorsomedial (DM), por lo que la expresión de la proteína Fos se ha caracterizado para estas dos áreas específicas. Se ha reportado que tanto en rata (Sumová et al., 1998; Guido et al., 1999) como en hámster (Guido et al., 1996) la expresión espontánea de Fos en condición DD, se restringe principalmente a la región dorsal del NSQ, mientras que la inducción de Fos por pulso de luz durante la noche subjetiva se restringe principalmente a la región ventrolateral del núcleo. En nuestros animales, se observó que la expresión espontánea de Fos en DD se presentó principalmente en la región dorsal del NSQ, resultados que concuerdan de forma significativa con lo observado para las otras especies mencionadas. Es importante señalar que la expresión de la proteína Fos en esta condición fue menos intensa que la que se observa en LD o cuando se aplicaron los pulsos de luz.

### **11.5. Inmunorreactividad a la proteína Fos en condición DD con pulso de luz.**

La proteína Fos se induce en el NSQ después de una estimulación fótica durante la noche subjetiva y se ha estipulado que existe una correlación entre la inducción de Fos y el cambio de fase de la conducta. En este sentido se ha propuesto que Fos es un componente molecular de la vía fótica para la sincronización por luz en el NSQ (Kornhauser et al., 1990; Rusak et al., 1990b) puesto que Fos es un factor de regulación transcripcional el cual está normalmente involucrado en la transducción de las señales extracelulares hacia cambios en la expresión del gene (Morgan y Curran, 1991). En nuestros experimentos, se observó que un pulso de luz aplicado durante el día subjetivo indujo poca o ninguna expresión de la proteína c-Fos (CT 03; Figura 20), sin embargo, la aplicación de un pulso de luz, en la parte temprana, media o tardía de la noche subjetiva indujo una importante expresión de células Fos-ir en el área ventrolateral del NSQ, donde el pico máximo se observó en el horario CT19 (Figura 20). Esta distribución anatómica de las células ir-Fos en nuestros animales (área VL del NSQ), también se ha observado en otras especies tales como rata (Rusak et al., 1990b), ratón (Colwell y Foster, 1992) y hámster (Rusak et al., 1990; Kornhauser et al., 1990). En consecuencia al pulso de luz, la distribución VL de la proteína Fos así como de su ARNm (Kornhauser et al., 1990; 1992; Rusak et al., 1992) coinciden con el área de la entrada retinal proveniente del tracto retinohipotalámico (TRH) la cual es la vía directa que inerva el NSQ en mamíferos (Moore, 1982; Moore y Silver 1998) y del tracto geniculado lateral, que es la entrada indirecta que recibe el NSQ (Card y Moore 1989). En este sentido, la propuesta de que el ARNm podría ser el componente de la vía de entrada de luz mediadora del cambio de fase

a través del TRH parece mas clara (Kornhauser et al., 1992) ya que estos cambios de fase están dados por genes inmediatos tempranos (como el c-fos), localizados en el área retinorreceptante (VL) del NSQ (Castel et al., 1997). La inducción en la expresión de los genes tempranos de c-fos, está mediada a través de los receptores del ácido-N-metil-D aspartato (NMDA) al bloquear estos receptores, se bloquea la inducción de c-fos (Aronin et al., 1990). Por otra parte, la aplicación intracerebral de antisueros de oligonucleótidos contra c-fos bloquean los cambios de fase por inducción de la luz en el NSQ (Wollnik, et al., 1995). A partir de estas evidencias se infiere que la inducción de c-fos es un prerrequisito para que se lleve a cabo el cambio de fase por luz en el NSQ.

En nuestros resultados, la distribución de Fos en el área ventrolateral del NSQ sugiere que existe un contacto sináptico en ésta área proveniente del TRH. A continuación, los experimentos donde se utilizó la sub-unidad de  $\beta$ -toxina de cólera ( $\beta$ -TC) como marcador, indican una densa innervación de las fibras del TRH en el NSQ del conejo, principalmente en el área ventrolateral. En conclusión, encontramos que en el NSQ de nuestros animales experimentales existe un ritmo diario asociado a la luz en LD, y un ciclo circádico en DD, así como fotoinducción durante la noche subjetiva.

## 12. CONCLUSIONES GENERALES

En el presente trabajo se obtuvo por primera vez información acerca de las características anatómicas y fisiológicas del NSQ del conejo de la raza Nueva Zelanda. Para la anatomía general de NSQ se utilizó como herramienta la tinción de Nissl. Por otra parte, a través de la aplicación Intra-ocular del marcador anterógrado de la beta toxina del cólera ( $\beta$ -TC) se analizó el desarrollo del tracto retinohipotalámico así como el patrón de distribución en el animal adulto. Por último, la información acerca de la expresión circádica y la inducción fótica del NSQ se obtuvo, utilizando la técnica de inmunocitoquímica a través de la expresión de la proteína Fos. Los resultados de esta investigación son los siguientes:

- (1) La anatomía y ubicación del NSQ en el conejo es análoga a la de otros mamíferos.
- (2) El tamaño y forma del NSQ en el conejo adulto difiere del de otros mamíferos.
- (3) La inyección ocular el trazador de  $\beta$ -TC, demostró que las terminaciones del TRH llegan bilateralmente al NSQ desde los días 1 y 9 postnatal al igual que en la etapa adulta.
- (4) La distribución de las fibras inmunorreactivas a  $\beta$ -TC dentro del NSQ del conejo, presenta un gradiente de intensidad inmunorreactiva que inicia en el área ventral y va hacia el área dorsal.
- (5) Se observó inmunorreactividad a  $\beta$ -TC en otras estructuras retinorreipientes como la hojuela intergeniculada, el núcleo geniculado lateral dorsal y ventral, también se observaron fibras en el AHA, APO, NPV y NSO del hipotálamo.
- (6) En el NSQ se mostró que existe una expresión diurna de Fos durante el ciclo de luz-oscuridad.
- (7) En ausencia de luz, se mostró que existe una expresión endógena de la proteína Fos en el NSQ, esto es, existe una expresión circádica.
- (8) La aplicación de pulsos de luz durante la noche subjetiva provocó una inducción fótica significativa de la proteína Fos en el área ventral del NSQ del conejo.

**(9) La distribución de las células ir-Fos en LD, DD y pulso de luz apoyan la idea de una subdivisión del NSQ del conejo en el área Ventral (centro) y Dorsal (corteza) reportada para otras especies.**

## 13. BIBLIOGRAFIA

- Abe, H., Honma, S., Shinohara, K., Honma, K.I. (1995).** Circadian modulation in photic induction of Fos-like immunoreactivity in the suprachiasmatic nucleus cells of diurnal chipmunk *Eutamias asiaticus*. *J Comp Physiol. A* 176:159-167.
- Abe, H., Rusak, B. (1994).** Physiological mechanisms regulating photic induction of Fos-like protein in hamster suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Biobehav Rev.* 18(4):531-536.
- Abrahamson, E.E., Moore R.Y. (2001).** Suprachiasmatic Nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Res.* 916: 172-191.
- Aguilar-Roblero, R., Drucker-Colín, R., Moore, R.Y. (1992).** Behavioral and morphological studies of fetal neural transplants into SCN-lesioned rats. *Chronobiol Int.* 9:1-19.
- Aguilar-Roblero, R., Escobar-Briones, C. (2002).** Ritmos biológicos y mecanismos generales de regulación. En: Escobar-Briones, C., Aguilar-Roblero, R (eds.) *Motivación y conducta: sus bases biológicas*. El Manual Moderno. México. pp 57-77.
- Aguilar-Roblero, R., García-Hernández, Aguilar, R., Arankowsky-Sandoval, Drucker-Collin, R. (1986).** Suprachiasmatic nucleus transplants function as an endogenous oscillator only in constant darkness. *Neurosci. Lett.* 69: 47-52.
- Aguilar-Roblero, R., Morin, L.P., Moore, R.Y. (1994).** Morphological correlates of circadian rhythm restoration induced by transplantation of the suprachiasmatic nucleus in hamsters. *Exp Neurol.* 130:250-260
- Angelucci, A., Clascá, F., Sur, F. (1996).** Anterograde axonal tracing with the subunit  $\beta$  of cholera toxin: A highly sensitive immunohistochemical protocol for revealing fine axonal morphology in adults and neonatal brains. *J Neurosci Meth.* 65 :101-112.
- Allingham, K., von Saldern, C., Brennan, P.A., Distel, H., Hudson, R. (1998).** Endogenous expression of c-Fos in hypothalamic nuclei of neonatal rabbits coincides with their circadian pattern of suckling-associated arousal. *Brain Res.* 783(2):210-218.
- Anderssen, M., Meurling, P. (1977).** The maturation of the ovary in wild rabbits, *Oryctolagus cuniculus*, in southern Sweden. *Acta Zool (Stockh).* 58: 95-101.
- Ariel, M, Daw, N.W. (1982).** Pharmacological analysis of directionally sensitive rabbit retinal ganglion cells. *J Physiol.* 324:161-185.

- Ariel, M., Daw, N.W., Rader, R.K. (1983).** Rhythmicity in rabbit retinal ganglion cell responses. *Vision Res.* 23(12):1485-1493.
- Armstrong, S.M., Chesworth, M.J. (1987).** The pineal gland. En: G.P.. Trentini, C. de Gaetari, P. Pevet (eds.) *Fundamental and Clinics in Pineal Research.* Raven Press, NY, USA. pp 195.
- Aronin, N., Sagar, S.M., Sharp, F.R., Schwartz, W.J. (1990).** Light regulates expression of a fos-related protein in rat suprachiasmatic nuclei. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87:5959-5962.
- Aschoff, J. (1960).** Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. *Cold Spr Harb Symp Quant Biol.* 25:11-28.
- Aschoff, J. (1964).** Survival value of diurnal rhythms. *Symp Zool Soc London.* 13:79-98.
- Balsalobre, A., Damiola, F., Schibler, U. (1998).** A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell.* 93: 929-937.
- Barlow, H.B., Hill, R.M., Levick, W.R. (1964).** Retinal ganglion cells responding selectively to direction and speed of image motion in the rabbit. *J Physiol.* 173: 377-407.
- Barlow, H.B., Levick, W.R. (1965).** The mechanism of directionally selective units in rabbit's retina. *J Physiol.* 178:477-504.
- Bendová, Z., Sumová, A., Illnerová, H. (2004).** Development of circadian rhythmicity and photoperiodic response in subdivisions of the rat suprachiasmatic nucleus. *Develop Brain Res.* 148:105-112.
- Bobbert, A.C., Bruinvel, D.J. (1986).** Properties of the two oscillators influencing the rabbit's food intake pattern. *Behav Brain Res.* 19:193-204.
- Bobbert, A.C., Krul, W.H., Brandenburg, J. (1978).** Diurnal changes in the rabbit's visual evoked potential. *Int J Chronobiol.* 5:307-325.
- Bobbert, A.C., van Wiechen, R.J.M.P., Eggelmeijer, F. (1990).** Imitations of the circadian changes in rabbit photic responses, elicited by stimulation of the cervical sympathetic nerves and mediated by means of intraocular adrenergic alpha receptors. *Interdis Cycle Res.* 21:273-288.
- Borg, B., Anderssen, M., Meurling, P. (1978).** Biology of the wild rabbit, *Oryctolagus cuniculus* in southern Sweden. III. Histology of the uterus in the non-breeding season. *Acta Zool (Stockh).* 59:253-260.

**-Boyd, I.L. (1985).** Effect of photoperiod and melatonin on testis development and regression in wild European rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Biol Reprod.* 33(1):21-29.

**-Boyd, I.L. (1986).** Photoperiodic regulation of seasonal testicular regression in the wild European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *J Reprod Fertil.* 77(2):463-470.

**-Buijs, R. M, Hermes, M.H.L.J., Kalsbeek, A. (1998).** The suprachiasmatic nucleus-paraventricular nucleus interactions: A bridge to the neuroendocrine and autonomic nervous system. *Progress in Brain Research.* 119:365-382.

**-Caba, M., Francis, P.K.Y., Beyer, C., González, A., Silver, R., Spies, H.G. (2000b).** Coitus-induced activation of c-Fos and gonadotropin-releasing hormone in hypothalamic neurons in female rabbits. *Mol Brain Res.* 78: 69-79.

**-Caba, M., Jianzhong, B., Francis, P.K.Y., Spies, H.G. (2000a).** Molecular activation of noradrenergic neurons in the rabbit brainstem after coitus. *Mol Brain Res.* 77:222-231

**-Caba, M., Rovirosa, M.J. (2002).** Respuesta neural del ritmo circádico de lactancia en conejos. *Universidad y Ciencia.* 18: 57-63.

**-Caba, M., Rovirosa, M.J., Silver, R. (2003).** Suckling and genital stroking induces Fos expression in oxitocitocinergic neurons in rabbit pups. *Dev Brain Res.* 143:119-128.

**-Caldelas, I., Salazar-Juárez, A., Granados-Fuentes, D., Escobar, C., Aguilar-Roblero, R. (1998).** Circadian modulation of c-Fos expression occurs only in the SCN and not in other visual projection areas in the rat. *Biol Rhythm Res.* 29:(5) 494-500.

**-Card, J.P., Fitzpatrick-McElligott, S., Gozes, I., Baldino, F. Jr. (1988).** Localization of vasopressin, vasoactive intestinal polypeptide, peptide histidine isoleucine, and somatostatin mRNA in rat suprachiasmatic nucleus. *Cell Tissue Res.* 252:303-315.

**-Card, J.P., Moore, R.Y. (1982).** Ventral lateral geniculate nucleus efferents to the rat suprachiasmatic nucleus exhibit avian pancreatic polypeptide-like immunoreactivity. *J Comp Neurol.* 206:390-396.

**-Card, J.P., Moore, R.Y. (1989).** Organization of lateral geniculate-hypothalamic connections in the rat. *J Comp Neurol.* 284:135-147.

**-Cassone, V.M., Speh, J.C., Card, J.P., Moore, R.Y. (1988).** Comparative anatomy of the mammalian hypothalamic suprachiasmatic nucleus. *J Biol Rhythms.* 3: 71-91.

- Castel, M., Belenky, M., Cohen, S., Wagner, S., Schwartz, W.J. (1997).** Light-induced c-fos expression in the mouse suprachiasmatic nucleus: immunoelectron microscopy reveals co-localization in multiple cell types. *Eur J Neurosci.* 9:1950-1960.
- Castel, M., Morris, J., Belenky, M. (1996).** Non-synaptic and dendritic exocytosis from dense-cored vesicles in the suprachiasmatic nucleus. *NeuroReport.* 7:543-547.
- Cohen, D.R., Curran, T. (1988).** fra-1: A serum inductible, cellular immediate-early gene that encodes a Fos-related antigen. *Mol Cell Biol.* 8: 2063-2069.
- Colwell, Ch., Foster, R.G. (1992).** Photic regulation of Fos-like immunoreactivity in the suprachiasmatic nucleus of the mouse. *J Comp Neurol.* 324:135-142.
- Constandil, L., Parraguez, V.H., Torrealba, F., Valenzuela, G., Seron-Ferre, M. (1995).** Day-night changes in c-fos expression in the fetal sheep suprachiasmatic nucleus at late gestation. *Reprod Fertil Dev.* 7(3):411-413.
- Cooper, H.M., Magnin, M.G. (1989).** Retinal projection to mammalian telencephalon. *Brain Research.* 477:350-357.
- Curran, T., Rauscher, F.J., Cohen, D.R. (1988).** Franza, beyond the second messenger: oncogenes and transcription factors. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol.* 53:769-777
- Chambille, I, Doyle, S., Sevière, J. (1993).** Photic induction and circadian expression of Fos-like protein. Immunohistochemical study in the retina and suprachiasmatic nucleus of hamster. *Brain Res.* 612:138-150.
- Chiasson, B.J., Hong, M.G., Robertson, H.A. (1998).** Intra-amygdala infusion of an end-capped antisense oligodeoxynucleotide to c-fos accelerates amygdala kindling. *Brain Res Mol Brain Res.* 57(2):248-256.
- Chow, K.L., Masland, R.H., Stewart, O.L. (1971).** Receptive field characteristics of striate cortical neurons in the rabbit. *Brain Res.* 33:337-352.
- Dahlbäck, M., Anderssen, M. (1981).** Biology of the wild rabbit *Oryctolagus cuniculus*, in southern Sweden. VI. Leydig cell activity and seasonal development of the male accessory organs of reproduction. *Acta Zool.* 62:113-120.
- Dai, J., Van Der Vliet, J., Swaab, D.F., Buijs, R.M. (1998).** Human retinohypothalamic tract as revealed by in vitro postmortem tracing. *J of Comp Neurol.* 397:357-370.
- Dalgarno, D., Klevit, R.E., Levine, B.A., Williams, R.J.P. (1984).** The calcium receptor and trigger. *Trends Pharmacol Sci.* 4:266-271.

- Datiche, F., Luppi, P.H., Cattarelli, M., (1995).** Serotonergic and non-serotonergic projections from the raphe nuclei to the piriform cortex in the rat: A cholera toxin  $\beta$  subunit (CTb) and 5-HT immunohistochemical study. *Brain Res.* 671: 27-37.
- Dávila, J.C., Padial, J., Andreu, M.J., Real, M.A., Guirado, S. (1997).** Calretinin immunoreactivity in the cerebral cortex of the lizard *Psammodromus algirus*: a light and electron microscopic study. *J Comp Neurol.* 382(3):382-393.
- Davis, F.C., Groski, R.A., (1983).** Entrainment of circadian rhythms in utero: role of the maternal suprachiasmatic nucleus. *Soc Neurosci Abstr.* 8:625
- Dowling, J.E. (1987).** *The retina: An Approachable Part of the Brain.* Harvard University Press. Cambridge, M.A.
- Drucker-Colín, R., Aguilar-Roblero, R., García-Hernández, F., Fernández Cancino, F., Bermúdez-Rattoni, F. (1984).** Fetal suprachiasmatic nucleus transplants: diurnal rhythm recovery of lesioned rats. *Brain Res.* 311: 353-357.
- Duncan, M.J., Banister, M.J., Reppert, S.M. (1986).** Developmental appearance of light-dark entrainment in the rat. *Brain Res.* 369(1-2):326-330.
- Duncan, M.J., Takahashi, J.S., Dubocovich, M.L. (1986).** Characterization of 2-[125I]iodomelatonin binding sites in hamster brain. *Eur J Pharmacol.* 132(2-3):333-334.
- Earnest, D.J., Jaradola M., Yeh, H.H., Olschowka, J.A. (1990).** Photic regulation of c-fos expression in neural components governing the entrainment of circadian rhythms. *Exp Neurol.* 109:353-361.
- Edelstein, K., Beaulé, Ch., D'Abramo, R., Amir, S. (2000).** Expression profiles of JunB and c-Fos proteins in the rat circadian system. *Brain Res.* 870:54-65.
- Eisserman, K. (1988).** Seasonal and environmental influences upon the diurnal heart-rate pattern in wild rabbits living under seminatural conditions. *Physiol Behav.* 43:539-565.
- Eisserman, K., Meier, B., Khaschei, M., von Holst, D.** Ethophysiological responses in overwinter food storage in wild European rabbit. *Physiol Behav.* 54:973-980.
- Elmqvist, J.K., Saper, C.B. (1996).** Activation of neurons projecting to the paraventricular hypothalamic nucleus by intravenous lipopolysaccharide. *J Comp Neurol.* 374 :315-331.
- Enroth-Cugell, C., Robson, J.G. (1966).** The contrast sensitivity of the retinal ganglion cells of the cat. *J Physiol.* 187:517-552.

**-Enroth-Cugell, C., Robson, J.G. (1984).** Functional characteristics and diversity of cat retinal ganglion cells. Basic characteristics and quantitative description. *Invest Ophthalmol Visual Sci.* 25:250-267.

**-Escobar-Briones, C., Aguilar-Roblero, R (2002).** Motivación y conducta: sus bases biológicas. *El Manual Moderno.* México. pp 57-77.

**-Ferguson, J.K.W. (1941).** A study of the motility of the intact uterus at term. *Surg. Gynecol. Obstetrics.* 73: 359-362.

**-Fox, R.R., Laird, C.W. (1970).** Diurnal variations in rabbits. Hematological parameters. *Am J Physiol.* 218:1609-1612.

**-François-Bellan, A.M., Deprez, P., Becquet, D. (1999).** Light-induced variations in AP-1 binding activity and composition in the rat suprachiasmatic nucleus. *J Neurochem.* 72(2):841-847.

**-François-Bellan, A.M., Guillaumond, F. Bosler, O., Becquet. (2000).** Is light-regulated AP-1 binding in the rat suprachiasmatic nucleus gated by the circadian clock?. *Mol Brain Res.* 85:161-170.

**-Fuchs, A.R.; Fuchs, F., Husslein, P. Soloff, M.S. Fernström, M.J. (1982).** Oxytocin receptors and human parturition: A dual role for oxytocin in the initiation of labor. *Science.* 215:1396-1398.

**-Gerhard, L. (1968).** *Atlas of the Mes-and Diencephalon of the Rabbit.* Berlin. Springer-Verlag.

**-Gillette, M.U., Tischkau, S.A. (1999).** Suprachiasmatic nucleus: the brain's circadian clock. *Recent Prog Horm Res.* 54:33-58.

**-Gillette, M.U., Reppert, S.M. (1987).** The hypothalamic suprachiasmatic nuclei: Circadian patterns of vasopressin secretion and neuronal activity in vitro. *Brain Res Bull.* 19:135-139.

**-Gingras, J.L., Lawson, E.E., McNamara, M.C. (1990).** Developmental characteristics in the daily rhythm of serotonin concentration within rabbit brainstem regions. *Dev Pharmacol.* 14:245-253.

**-Girgis, M., Shih-Chang, W. (1981).** *A New Stereotaxic Atlas of the Rabbit Brain.* Warren H., Green. Inc., St. Louis Mo. USA.

**-Glezer, I.I., Hof, P.R., Leranth, C., Morgane, P.J. (1993).** Calcium-binding protein-containing neuronal populations in mammalian visual cortex: a comparative study in whales, insectivores, bats, rodents, and primates. *Cereb Cortex.* 3(3):249-272.

**-González-Mariscal, G., Díaz-Sánchez, V., Melo, A. I., Beyer, C., Rosenblatt, J. S. (1994).** Maternal behavior in New Zealand white rabbits: Quantification of somatic events, motor patterns and steroid plasma levels. *Physiol Behav.* 55:1081-1089.

**-González-Mariscal, G., Rosenblatt, J. S. (1996).** Maternal behavior in rabbits. A historical and multidisciplinary perspective. En: J.S. Rosenblatt; Ch. T. Snowdon (eds.). *Parental care, evolution and mechanisms and adaptative significance.* Academic Press. San Diego. 25:333-360.

**-Granados-Fuentes, D., Salazar-Juárez, A., Vergara-Aragón, P., Escandón-Calderón, J., Vega-González, A., Aguilar-Roblero, R (1995).** Los ritmos circádicos en mamíferos: conceptos, implicaciones y bases biológicas. En: Velázquez-Moctezuma, J. (ed.) *Temas Selectos de Neurociencias.* UAM, México. pp 433-458

**-Grobstein, P., Chow, K.L., Spear, P.D., Mathers, L.H. (1973).** Development of rabbit visual cortex: late appearance of a class of receptive fields. *Science.* 180: 1185-1187.

**-Guido, M.E., de Guido, L.B., Goguen, D., Robertson, H.A., Rusak, B. (1999).** Daily rhythm of spontaneous immediate early gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus. *J Biol Rhythms.* 14:275-280.

**-Guido, M.E., Rusak, B., Robertson, H.A. (1996).** Spontaneous circadian and light-induced expression of junB ARNm in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* 732:215-222.

**-Halberg, F. (1959).** Physiologic 24-h periodicity in human beings and mice, the lighting regimen and daily routine. En: Withrow, R.B. (ed.). *Photoperiodism and Related Phenomena in Plants and Animals.* American Association for the Advancement of Science. Washington, USA. pp 803-878.

**-Harrington, M.E., Nance, D.M., Rusak, B. (1985).** Neuropeptide Y immunoreactivity in the hamster geniculohypothalamic tract. *Brain Res Bul.* 15: 465-472.

**-Harrington, M.E., Rusak, B. (1986).** Lesions of the thalamic intergeniculate leaflet alter hamster circadian rhythms. *J Biol Rhythms.* 4:309-325.

**-Harrington, M.E., Rusak, B. (1989).** Photic responses of geniculohypothalamic tract neurons in the Syrian hamster. *Vis Neurosci.* 2: 367-375.

**-Hastings, M.H., Ebling, F.J., Grosse, J., Herbert, J., Maywood, E.S., Mikkelsen, J.D., Sumová, A. (1995).** Immediate-early genes and the neural bases of photic and non-photic entrainment. *Ciba Found Symp.* 183:175-189.

- Hendrickson, A.E., Wagoner, N., Cowan, W.M. (1972).** An autoradiographic and electron microscopic study of the retino-hypothalamic connections. *Z Zelloforsch mikrosk Anat.* 135:1-26.
- Henning, S.J., Hird, F.J. (1972).** Diurnal variations in the concentrations of volatile fatty acids in the alimentary tracts of wild rabbits. *Br J Nutr.* 27:57-64.
- Hickey, T.L., Spear, P.D. (1976).** Retinogeniculate projections in hooded and albino rats: an autoradiographic study. *Exp Brain Res.* 24:523-529.
- Hochstein, S., Shapley, R.M. (1976).** Quantitative analysis of retinal ganglion cell classification. *J Physiol.* 262:237-264.
- Hoffman, G.E., Berghorn, K.A., Knapp, L.T., Le, W.W., Verbalis, J.G., Sherman, T.G. (1995).** Physiological stimulation of vasopressin and oxytocin neurons: perspectives from Fos activation. En: Saito T., Kurokawa, K., Yoshida, S. (eds.) *Neurohypophysiology: Recent Progress of Vasopressin and Oxytocin Research.* Elsevier Science B.V. pp. 151-163.
- Hörnigke, H., Batsch, F. (1977).** Caecotrophy in rabbits: A circadian function. *J Mammal.* 58:240-242.
- Hörnigke, H., Ruoff, G., Vogt, B., Clauss, W., Ehrlein, M.J. (1984).** Phase relationship of the circadian rhythm of feed intake, caecal motility, and production of soft and hard faeces in domestic rabbits. *Lab Animals.* 18:169:172.
- Howard, C.V., Reed, M.G. (1998).** *Unbiased Stereology.* New York, Springer-Verlag, pp 246.
- Hudson, R. (1998).** Potential of the newborn rabbit for circadian rhythms research. *Biol Rhythm Res.* 29:546-555.
- Hudson, R., Distel, H. (1982).** The pattern of behavior of rabbit pups in the nest. *Behav.* 79:255-271.
- Hudson, R., Distel, H. (1986).** Olfactory guidance of nipple-search behaviour in newborn rabbits. En: *Ontogeny of Olfaction.* Breipohl, W. (ed.) Springer: NY. 243-254.
- Hudson, R., Distel, H. (1989).** Temporal pattern of suckling in rabbit pups: a model of circadian synchrony between mother and young. *Res in Perinatal Med.* IX. 83-102.
- Hudson, R., Distel, H. (1990).** Sensitivity of female rabbits to changes in photoperiod as measured by pheromone emission. *J Comp Physiol.* A.167:225-230.

- Hudson, R., Schaal, B., Martínez-Gómez, M., Distel, H. (2000).** Mother-young relations in the european rabbit, physiological and behavioral locks and keys. *World Rabbits Sci.* 8:85-90.
- Ibata, Y., Okamura, H., Tanaka, M., Tamada, Y., Hayashi, S., Ijima, N., Matsuda, T., Munekawa, K., Takamatsu, T., Hisa, Y., Shigeyoshi, S.Y., Amaya, F. (1999).** Functional morphology of the suprachiasmatic nucleus. *Frontiers in Neuroendocrinol.* 20: 241-268.
- Inouye, S.I.T. (1996).** Circadian rhythms of neuropeptides in the suprachiasmatic nucleus. *Prog Brain Res.* 111:75-90.
- Inouye, S.I.T. (1983).** Does the ventromedial hypothalamic nucleus contain a self-sustained circadian oscillator associated with periodic feedings?. *Brain Res.* 279: 53-63.
- Inouye, S.I.T., Kawamura, H. (1979).** Persistence of circadian rhythmicity in a hypothalamic "island" containing the suprachiasmatic nucleus. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 76:5962-5966.
- Inouye, S.I.T., Kawamura, H. (1982).** Characteristics of a circadian pacemaker suprachiasmatic nucleus. *J Comp Physiol.* 146:153-160.
- Jacob, N., Vuillez, P., Lakdhar-Ghazal, N., Pevet, P. (1999).** Does the intergeniculate leaflet play a role in the integration of the photoperiod by the suprachiasmatic nucleus? *Brain Res.* 15; 828 (1-2):83-90.
- Janik, D., Mrosovsky, N. (1992).** Gene expression in the geniculate induced by a nonphotic circadian phase shifting stimulus. *NeuroReport.* 3(7):575-578.
- Jiang, Z.G., Yang, Y., Liu, Z.P., Allen, C.N. (1997).** Membrane properties and synaptic inputs of suprachiasmatic nucleus neurons in rat brain slices. *J Physiol.* 499: 141-159.
- Jilge, B. (1991).** The rabbit: a diurnal or a nocturnal animal? *J Exp Anim Sci.* 34: 170-183.
- Jilge, B. (1993).** The ontogeny of circadian rhythms in the rabbit. *J Biol Rhythms.* 8:247-260.
- Jilge, B. (1995).** Ontogeny of the rabbit's circadian rhythms without an external zeitgeber. *Physiol and Behav.* 58:131-140.
- Jilge, B., Hornicke, H., Stähle, H. (1987).** Circadian rhythms of rabbits during restrictive feeding. *Am J Physiol.* 253: R46-R54.

- Jilge, B., Hudson, R. (2001).** Diversity and development of circadian rhythms in the european rabbit. *Chronobiol Internat.* 18:1-26.
- Jilge, B., Stähle, H. (1984).** The internal synchronization of five circadian functions of the rabbit. *Chronobiol Int.* 1:195-204.
- Johnson, R.F., Morin, L.P., Moore, R.Y. (1988).** Retinohypothalamic projections in the hamster and rat demonstrated using cholera toxin. *Brain Res.* 462: 301-312.
- Kaplan, E., Shapley, R.M. (1986).** The primate retina contains two types of ganglion cells with high and low contrast sensitivity. *Proc Natl Acad Sci.* 83:2755-2757.
- Katona, C., Rose, S., Smale, L. (1998).** The expression of Fos within the suprachiasmatic nucleus of the diurnal rodent *Arvicanthis niloticus*. *Brain Res.* 791:27-34.
- Katona, C., Smale, L. (1997).** Wheel-running rhythms in *Arvicanthis niloticus*. *Physiol Behav.* 61:365-372.
- Kawano, J., Krout, K.E., Loewy, A.D. (2001).** Suprachiasmatic nucleus projections to the paraventricular thalamic nucleus of the rat. *Thalam and Related Sys.* 1:197-202.
- Kennedy, G.A., Hudson, R., Armstrong, S.M.(1994).** Circadian wheel running activity rhythms in two strains of domestic rabbit. *Physiol Behav.* 55:385-389.
- Klein, D.C., Moore, R.Y. (1979).** Pineal N-acetyltransferase and hydroxyindole-o-methyltransferase: Control by the retinohypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* 174:245-262.
- Klein, D.C., Moore, R.Y., Reppert, S.M. (1991).** *Suprachiasmatic nucleus. The mind's clock.* New York, Oxford University Press. pp 476.
- Kononen, J., Koistinaho, J., Alho, H. (1990)** Circadian rhythm in c-fos-like immunoreactivity in the rat brain. *Neurosci Lett.* 120:105-108.
- Kornhauser, J.M., Mayo, K.E., Takahashi, J.S. (1996).** Light immediate-early genes, and circadian rhythms. *Behav Genet.* 26:221-240.
- Kornhauser, J.M., Nelson, D.E., Mayor, K.E., Takahashi, J.S. (1990).** Photic and circadian regulation on c-fos gene expression in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Neuron.* 5: 127-134.
- Kornhauser, J.M., Nelson, D.E., Mayor, K.E., Takahashi, J.S. (1992).** Regulation of jun-b messenger RNA and AP-1 activity by light and a circadian clock. *Science.* 255:1581-1584.

- Krajnak, K., Dickenson, L., Lee, T.M. (1997).** The induction of Fos-like proteins in the suprachiasmatic nuclei and intergeniculate leaflet by light pulses in degus (*Octodon degus*) and rats. *J Biol Rhythms*. 12 (5):401-12.
- Kriegsfeld, L.J., Lesauter, J., Hamada, T., Pitts, S.M., Silver, R. (2002).** Circadian Rhythms in the Endocrine System. En: *Hormones Brain and Behavior* (Vol.II). Elsevier Science (USA), pp. 33-91.
- Kuffler, S.W. Nichols, J. G., Martin, A.R. (1984).** *From Neuron to Brain: A Cellular Approach to the Function of the Nervous System*. 2<sup>o</sup> ed. Sinauer Assoc, Sunderland, M.A.
- Kurumiya, S., Kawamura, H. (1988).** Circadian oscillation of multiple unit activity in the guinea pig suprachiasmatic nucleus. *J Comp Physiol*. 162:301-308.
- Lam, K., Sefton, J., Bennett, M.R. (1982).** Loss of axons from the optic nerve of the rat during early postnatal development. *Dev Brain Res*. 3:487-491.
- Lax, P., Zamora, S., Madrid, J.A. (1999).** Food-entrained feeding and locomotor circadian rhythms in rats under different lighting conditions. *Chronobiol*. 16:281-291.
- Leak, R.K., Card, J.P., Moore, R.Y. (1999).** Suprachiasmatic pacemaker organization analyzed by viral transsynaptic transport. *Brain Res*. 819:23-32.
- Leak, R.K., Moore, R.Y. (2001).** Topographic organization of suprachiasmatic nucleus projection neurons. *J Comp Neurol*. 433 (3):312-34.
- Leard, L.E.; Macdonald, E.S.; Heller, H.C.; Kilduff, T.S. (1994).** Ontogeny of photic-induced c-fos ARNm expression in rat suprachiasmatic nuclei. *NeuroReport*. 5:2683-2687.
- Lehman, M.N.; Silver, R.; Glandstone, W.R.; Kahan, R.M.; Bithman, E. (1987).** Circadian rhythmicity restored by neuronal transplant. Immunocytochemical characterization of the graft and its integration with the host brain. *J Neurosci*. 7:1626-1638.
- LeSauter, J, Silver, R. (1999).** Localization of a suprachiasmatic nucleus subregion regulating locomotor rhythmicity. *J Neurosci*. 19 (3):5574-5585.
- Levine, M.L., Weiss, M.L., Rosenwasser, A.M., Miselis, R.R. (1991).** Retinohypothalamic tract in the female albino rat: a study using horseradish peroxidase conjugated to cholera toxin. *J Comp Neurol*. 306 344-360.
- Lewandowski, M.H., Usarek, A. (2002).** Effects of intergeniculate leaflet lesions on circadian rhythms in the mouse. *Behav Brain Res*. 128(1):13-17.

- Lincoln, D.W.** (1974). Suckling: a time-constant in the nursing behavior of the rabbit. *Physiol Behav.* 13:711-714.
- Lucas, R.J., Foster, R.G.** (1999). Photoentrainment in mammals: a role for cryptochrome? *J Biol Rhythms.* 14(1):4-10.
- Manning, P.J., Ringler, D.H., Newcomer, C.E.** (1994). *The Biology of the Laboratory Rabbit.* Academic Press: NY. pp 483.
- Mantyh, P.W., Kemp, J.A.** (1983). The distribution of putative neurotransmitters in the lateral of geniculate nucleus. *Brain Res.* 288:344-348.
- Marchant, E.G., Mistlberger, R.E.** (1997). Anticipation and entrainment to feeding time in intact and SCN-ablated C57BL/6j mice. *Brain Res.* 765(2):273-282.
- Martin, K.J., Lillie, J.W., Green, M.R.** (1990). Transcriptional activation by the pseudorabies virus immediate early protein. *Genes Dev.* 4(12B):2376-2382.
- Masland, R.H., Chow, K.L., Stewart, D.L.** (1971). Receptive field characteristics of superior colliculus neurons in rabbit. *J Neurophysiol.* 34:148-156.
- Mathers, L.H., Chow, K.L., Spear, P.D., Grobstein, P.** (1974). Ontogenesis of receptive fields in the rabbit striate cortex. *Exp Brain Res.* 19(1):20-35.
- McLaren, J.W., Brubaker, R.F., FitzSimon, J.S.** (1996). Continuous measurement of intraocular pressure in rabbits by telemetry. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 37:966-975.
- Meijer, J.H.** (2001). Photic entrainment of mammals. En: J. S. Takahashi, F. W. Turek and R. Y. Moore (eds.) *Handbook of Behavioral Neurobiology, Vol. 12. Circadian Clocks.* Kuwer/Plenum Publishers. New York. pp 183-209.
- Meijer, J.H., Gross, G.A., Rusak, B.** (1985). Luminance coding in a circadian pacemaker: the suprachiasmatic nucleus in the rat and the hamster. *Brain Res.* 382: 109-118.
- Meijer, J.H., Reitveld, W.J.** (1989). Neurophysiology of the suprachiasmatic circadian pacemaker in rodents. *Physiol Rev.* 69:671-707.
- Minors, D.S., Waterhouse, J.M.** (1981). Introduction and methods of study. En: Minors, D.S., Waterhouse, J.M. (eds.) *Circadian Rhythms an the Human.* John Wright and Sons Ltd, Bristol, Great Britain. pp 1-23.
- Mistlberger, R.E.** (1992). Nonphotic entrainment of circadian activity rhythms in suprachiasmatic nuclei-ablated hamsters. *Behav Neurosci.* 106:192-202.

- Mistberger, R.E., Houpt, T.A., Moore-Ede, M.C. (1990).** Effects of aging on food-entrained circadian rhythms. *Neurobiol Aging*. 11:619-624.
- Mistberger, R.E., Marchant, E.G. (1999).** Enhanced food-anticipatory circadian rhythms in the genetically obese Zucker rat. *Physiol Behav*. 66:329-35.
- Moga, M.M., Moore, R.Y. (1997).** Organization of neural inputs to the suprachiasmatic nucleus in the rat. *J Comp Neurol*. 389:508-534.
- Moore, R.Y. (1973).** Retinohypothalamic projections in mammals: a comparative study. *Brain Res*. 49:403-409.
- Moore, R.Y. (1982).** The suprachiasmatic nucleus and the organization of a circadian system. *Trends Neurosci*. 5:404-407.
- Moore, R.Y. (1983).** Organization and function of a central nervous system circadian oscillator: the suprachiasmatic hypothalamic nucleus. *Federation Proc*. 42:2783-2789.
- Moore, R.Y. (1992).** The organization of the human circadian timing system. *Prog Brain Res*. 93:101-117.
- Moore, R.Y. (1996).** Entrainment pathways and the functional organization of the circadian system. *Prog Brain Res*. 111:103-119.
- Moore, R.Y., Bernstein, M.E., (1989).** Synaptogenesis, in the rat suprachiasmatic nucleus demonstrated by electron microscopy and synapsin-1 immunoreactivity. *J Neurosci*. 9:2151-2162.
- Moore, R.Y., Card, J.P. (1994).** The intergeniculate leaflet: An anatomically and functionally distinct subdivision of the lateral geniculate complex. *J Comp Neurol*. 344:403-430.
- Moore, R.Y., Eichler, V.B. (1972).** Loss of circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic nucleus lesions in the rat. *Brain Res*. 42:201-206.
- Moore, R.Y., Halaris, A.E., Jones, B.E. (1978).** Serotonin neurons of the midbrain raphe: ascending projections. *J Comp Neurol*. 180 (3): 417-438.
- Moore, R.Y., Klein, D.C. (1974).** Visual pathways and the central neural control of a circadian rhythm in pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Brain Res*. 71:17-33.
- Moore, R.Y., Leak, R.K. (2001).** Suprachiasmatic nucleus. En: J. S. Takahashi, F. W. Turek and R. Y. Moore (eds.) *Handbook of Behavioral Neurobiology*. Vol. 12. *Circadian Clocks*. Kluwer/Plenum Publishers. New York. pp 141-179.

- Moore, R.Y., Lenn, N. J. (1972).** A retinohypothalamic projection in the rat. *J Comp Neurol.* 146:1-14.
- Moore, R.Y., Silver, R. (1998).** Suprachiasmatic nucleus organization. *Chronobiol Int.* 15:475-487.
- Moore, R.Y., Weis, R.P., Moga, M.M. (2000).** Efferent projections of the intergeniculate leaflet and ventral lateral geniculate in the rat. *J Comp Neurol.* 420(3):398-418.
- Morgan, J.I., Curran, T. (1991).** Proto-oncogene transcription factors and epilepsy. *TIPS* 12:343-349.
- Morin, L.P., Blanchard, J., Moore, R.Y. (1992).** Intergeniculate leaflet and suprachiasmatic nucleus organization and connections in the golden hamsters. *Vis Neurosci.* 8:219-230.
- Muller, C., Torrealba, F. (1998).** Postnatal development of neuron number and connections in the suprachiasmatic nucleus of the hamster. *Brain Res Dev Brain Res.* 110 (2):203-213.
- Novak, C.M., Smale, L., Nunez, A.A. (2000).** Rhythms in Fos expression in brain areas related to the sleep-wake cycle in the diurnal *Arvicanthis niloticus*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 278(5):R1267-1274.
- Nunez, A., Bult, A., McElhinny, T.L., Smale, L. (1999).** Daily rhythms of Fos expression in hypothalamic targets of the suprachiasmatic nucleus in diurnal and nocturnal rodents. *J of Biol Rhythms.* 14 (4): 300-306.
- O' Hara, B.F., Watson, F.L., Andretic, R., Wiler, S.W., Young, K.A., Bitting, L., Heller, H.C., Kilduff, T.S. (1997).** Daily variation of CNS gene expression in nocturnal vs. diurnal rodents and in the developing rat brain. *Mol Brain Res.* 48:73-86.
- Pennartz, C.M., Bos, N.P., Jeu, M.T., Geurtsen, A.M., Mirmiran, M., Sluiter, A.A., Buijs, R.M. (1998).** Membrane properties and morphology of vasopressin neurons in slices of rat suprachiasmatic nucleus. *J Neurophysiol.* 80(5):2710-2717.
- Pickard, G.E. (1989).** Entrainment of the circadian rhythm of wheel-running activity is phase shifted by ablation of the intergeniculate leaflet. *Brain Res.* 7;494(1):151-154.
- Pickard, G.E. (1994).** Intergeniculate leaflet ablation alters circadian rhythms in the mouse. *NeuroReport.* 27;5(16):2186-2188.
- Pickard, G.E., Ralph, M.R., Menaker, M. (1987).** The intergeniculate leaflet partially mediates effects of light on circadian rhythms. *J Biol Rhythms.* 2:35-56.

- Pickard, G.E., Silverman, A.J. (1981).** Direct retinal projections to the hypothalamus, piriform cortex, and accessory optic nuclei in the golden hamster as demonstrated by a sensitive anterograde horseradish peroxidase technique. *J Comp Neurol.* 196:155-172.
- Pittendrigh, C.S. (1993).** Temporal organization: reflection of a Darwinian clock watcher. *Ann Rev Physiol.* 55:15-54.
- Pivik, R.T., Blysm, F.W., Cooper, P. (1986).** Sleep-wakefulness in the rabbit. *Behav Neur Biol.* 45:275-286.
- Ralph, M.R., Foster, R.G., Davis, F.S., Menaker, M. (1990).** Transplanted SCN determines circadian period. *Science.* 219:1089-1091.
- Rapisardi, S.C., Chow, K.L., Mathers, L.H. (1975).** Ontogenesis of receptive field characteristics in the dorsal lateral geniculate nucleus of the rabbit. *Exp Brain Res.* 22:295-305.
- Ratliff, F. (ed). (1974).** *Studies on Excitation and Inhibition in the Retina.* A Collection of Papers from the Laboratoires of H. Heffer Hartline. Rockefeller University Press, N.Y.
- Rauscher, F.J., Sambucetti, L.C., Curran, T., Distel, R.J., Spiegelman, B.M. (1988).** A common DNA binding site for Fos protein complexes and transcription factor AP-1. *Cell.* 52:471-480.
- Rea, M.A. (1989).** Light increases Fos-related protein immunoreactivity in the rat suprachiasmatic nuclei. *Brain Res Bull.* 23:577-581.
- Redman, J., Armstrong, S., Ng, K.T. (1983).** Free running activity rhythms in the rat: entrainment by melatonin. *Science.* 219:1089-1091.
- Reppert, S.M. (1985).** Maternal entrainment of the developing circadian system. *Ann N Y Acad Sci.* 453:162-169.
- Reppert, S.M., Coleman, R.J., Heath, H.W., Swedlow, J.R. (1984).** Pineal N-acetyltransferase activity in 10-day-old rats: a paradigm for studying the developing circadian system. *Endocrinol.* 115(3):918-925.
- Reppert, S.M., Schwartz, W.J. (1983).** Maternal coordination of the fetal biological clock in utero. *Science.* 219:969-971.
- Reppert, S.M., Schwartz, W.J. (1984).** The suprachiasmatic nuclei of the fetal rat: characterization of a functional circadian clock using C-labeled deoxyglucose. *J Neurosci.* 4:2724-2729.

- Reppert, S.M., Schwartz, W.J. (1986).** Maternal suprachiasmatic nuclei are necessary for maternal coordination of the developing circadian system. *J Neurosci.* 6:2724-2729.
- Reppert, S.M., Schwartz, W.J., Uhl, G.R. (1987).** Arginine vasopressin : A novel peptide rhythm in cerebrospinal fluid. *Trends Neurosci.* 10:76-80.
- Reppert, S.M., Weaver D.R., Rivkees, S.A., (1988).** Maternal communication of circadian phase to the developing mammal. *Psychoneuroendocrinol.* 13: (1-2): 63-78.
- Ritcher, C.P. (1967).** *Sleep and activity: Their relation to the 24-h clock.* En: S. Kety, E. Evarts and H. Williams (eds). *Sleep and Altered States of Consciousness.* William and William, Baltimore. pp 8-28.
- Robertson, H.A. (1992).** Immediate-early genes, neuronal plasticity and memory. *Biochem Cell Biol.* 70:729-737.
- Rocha, L., Kaufman, D.L. (1998).** In vivo administration of c-fos antisense oligonucleotides accelerate amygdala kindling. *Neurosci Lett.* 241:111-114.
- Rose, S., Novak, C.M., Mahoney, M.M., Nunez, A.A., Smale, L. (1999).** Fos expression within vasopressin-containing neurones in the suprachiasmatic nucleus of diurnal compared to nocturnal rodents. *J Biol Rhythms.* 14:37-46.
- Rusak, B., Bina, K.G. (1990b).** Neurotransmitters in the mammalian circadian system. *Annu Rev Neurosci.* 13:387-401.
- Rusak, B., McNaughton., I., Robertson, H.A., Hunt, S.P. (1992).** Circadian variation in photic regulation of immediate-early gene mRNAs in rat suprachiasmatic nucleus cells. *Mol Brain Res.* 14:124-130.
- Rusak, B., Robertson, H.A., Wisden, W., Hunt, S.P. (1990a).** Light pulses that shift rhythms induce gene expression in the suprachiasmatic nucleus. *Science.* 248:1237-1240.
- Rusak, B., Zucker, I. (1979).** Neural regulation of circadian rhythms. *Physiol Rev.* 3:449-525.
- Sagar, S.M., Sharp, F.R., Curran, T. (1988).** Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science.* 240:1328-1331.
- Salter, J.M., Sanders, J.T., Haag, M., Smale, L., Cassone, V.M. (1998).** Diurnality, nocturnality, and 2-deoxyglucose uptake in the edible mouse, *Arvicantha niloticus.* *Soc Neurosci Abstr.* 24:10-12.

- Sato, T., Kawamura, H. (1984).** Circadian rhythms in multiple unit activity inside and outside the suprachiasmatic nucleus in the diurnal chipmunk (*Eutamias silbricus*). *Neurosci Res.* 1:45-52.
- Sawchenko, P.E., Gerfen, C.R.(1985).** Plant lectins and bacterial toxins as tools for tracing neuronal connections. *Trends Neurosci.* 8:378-384.
- Schwartz, W.J., Davidsen, L., Smith, C. (1980).** *In vivo* metabolic activity of a putative circadian oscillator, the suprachiasmatic nucleus. *J comp Neurol.* 189: 157-167.
- Schwartz, W.J., Aronin, N., Takeuchi, J., Bennett, M.R., Peter, R.V. (1995).** Towards a molecular biology of the suprachiasmatic nucleus: Photic and temporal regulation of c-fos gene expression. *Semin Neurosci.* 7: 53-60.
- Schwartz, W.J., Carpino, A. Jr., de la Iglesia, H.O., Baler, R., Klein, D.C., Nakabeppu, Y., Aronin, N. (2000).** Differential regulation of fos family genes in the ventrolateral and dorsomedial subdivisions of the rat suprachiasmatic nucleus. *Neurosci.* 98:535-547.
- Schwartz, W.J., Coleman, R.J., Reppert, S.M. (1983).** A daily vasopressin rhythm in rat cerebrospinal fluid. *Brain Res.* 263:105-112.
- Schwartz, W.J., Peters, R.V., Aronin, N., Bennett, M.R. (1996).** Unexpected c-fos gene expression in the suprachiasmatic nucleus of mice entrained to a skeleton photoperiod. *J Biol Rhythms.* 11(1):35-44.
- Schwartz, W.J., Takeuchi, J., Shannon, W., Davis, E.M., Aronin, N. (1994).** Temporal regulation of light-induced Fos and Fos-like protein expression in the ventrolateral subdivision of the rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience.* 58:573-583.
- Shapley, R., Enroth-Cugell. C. (1985).** Visual adaptation and retinal gain control. *Prog Retinal Res.* 3: 263-343.
- Shatz, C., Lam, D.M.K. ( 1991).** *Development of the Visual System.* MIT Press. Cambridge, M.A..
- Shek, J.W., Wen, GY., y Winiewski, H.M. (1986).** *Atlas of the rabbit Brain and Spinal Cord.* Karger, USA.
- Sheng, M., Greenberg, M.E. (1990).** The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron.* 4:477-485.
- Shibata, S., Moore, R.Y. (1987).** Development of neuronal activity in the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* 431:311-315.

- Shimoda, K., Hanada, K., Yamada, N., Takahashi, S. (1986).** Periodic exposure to mother is potent zeitgeber of rat pups' rhythm. *Physiol Behav.* 36:723-730.
- Shinohara, K., Inouye, S.T. (1995).** Photic information coded by vasoactive intestinal polypeptide and neuropeptide Y. *Neurosci Biobehav Rev.* 19(3):349-352.
- Silver, R., Romero, M.T., Besmer, H.R., Leak, R., Nunez, J.M., LeSauter, J. (1996).** Calbindin-D28k cells in the hamster SCN express light-induced fos. *NeuroReport.* 7:1224-1228.
- Smale, L., Blanchard, J., Moore, R.Y., Morin, L.P. (1991).** Immunocytochemical characterization of the suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet in the diurnal ground squirrel, *Spermophilus lateralis*. *Brain Res.* 563:77-86.
- Smale, L., Lee, T., Nunez, A.A. (2003).** Mammalian diurnality: some facts and gaps. *J Biol Rhythms.* 18:356-366.
- Southern, H.N. (1942).** Periodicity of Refection in the wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus cuniculus* L) in West Wales. *Proc Zool Soc Lond.* 149:553-554.
- Spear, P.D., Chow, K.L., Masland, R.H., Murphy, E.H. (1972).** Ontogenesis of receptive field characteristics of superior colliculus neurons in the rabbit. *Brain Res.* 45: 67-86.
- Speh, J.C., Moore R.Y. (1993).** Retinohypothalamic tract development in the hamster and rat. *Dev Brain Res.* 76:171-181.
- Stephan, F.K. (1986).** Interaction between light -and feeding- entrainable circadian rhythms in the rat. *Physiol Behavior.* 38:127-133.
- Stephan, F.K., Zucker, I. (1972).** Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity are eliminated by suprachiasmatic lesions. *Proc natn Acad Sci.* 54:1521-1527.
- Stoeckel, K., Schwab, M.E., Thonen, H. (1977).** Role of gangliosides in the uptake and retrograde axonal transport of cholera and tetanus toxin as compared to nerve growth factor and wheat germ agglutinin. *Brain Res.* 132:273-285.
- Stone, J, Fukuda, Y. (1974).** Properties of cat retinal ganglion cells: a comparison of W-cells with X- and Y-cells. *J Neurophysiol.* 37(4):722-748.
- Sumová, A., Trávníčková, Z., Mikkelsen, J.D., Illnerová, H. (1998).** Spontaneous rhythm in c-Fos immunoreactivity in the dorsomedial part of the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* 801:254-258.

- Sutin**, E.L., Kilduff, T.S. (1992). Circadian and light-induced expression of immediate early gene mRNAs in the rat suprachiasmatic nucleus. *Mol Brain Res.* 15:281-290.
- Takahashi**, K., Deguchi, T. (1983). Entrainment of the circadian rhythms of blinded infant rats by nursing mothers. *Physiol Behav.* 31(3):373-378.
- Takeuchi**, J., Shannon, W., Aronin, N., Schwartz, W.J. (1993). Compositional changes of AP-1 DNA-binding proteins are regulated by light in a mammalian circadian clock. *Neuron.* 11:825-836.
- Thompson**, H.V., King, C.M. (1994). *The European Rabbit.* Oxford University, Oxford Press: pp 245.
- Toledo**, R., Aguilar-Roblero, R., Canchola, E., Caba, M. (2002). Daily and circadian expresión of fos protein in the suprachiasmatic nucleus of the rabbit. *Soc. For Neurosci.* 32 Annual Meeting. Orlando, Fla. Abst. # 77.4.
- Torrealba**, F., Parraguez, V.H., Reyes, T., Valenzuela, G., Seron-Ferre, M. (1993). Prenatal development of the retinohypothalamic pathway and the suprachiasmatic nucleus in the sheep. *J Comp Neuro.* 338 (2):304-316.
- Trávnicková**, Z., Sumová, A., Peters, R., Schwartz, W.J., Illnerová, H. (1996). Photoperiod-dependent correlation between light-induced SCN c-fos expression and resetting of circadian phase. *Am J Physiol.* 271: R825-R831.
- Vaitukaitis**, J.L. (1981). Production of antisera with small doses of immunogen: multiple intradermal injections. *Methods Enzymol.* 73:(Pt B):46-52.
- Van Esseveldt** , L.K.E., Lehman, M.N., Boer, G.J. (2000). The suprachiasmatic nucleus and the circadian time-keeping system revisited. *Brain Res Rev.* 33:34-77.
- Van den Pol**, A.N, (1991). The suprachiasmatic nucleus: morphological and cytochemical substrates for cellular interaction. En: Klein, D.C., Moore, Y., Reppert, S.M., (eds.). *Suprachiasmatic Nucleus. The Mind's Clock.* pp 17-50.
- Van den Pol**, A.N. (1980). The hypothalamic suprachiasmatic nucleus of the rat: Intrinsic anatomy. *J Comp Neurol.* 191: 661-702.
- Van den Pol**, A.N. (1981). Amino acid incorporation in medial hypothalamic nuclei: circadian, perikarya, and neuropil variations. *Am J Physiol.* 240 (1): R16-22.
- Van den Pol**, A.N., Tsujimoto, K.L. (1985). Neurotransmitters of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus: immunocytochemical analysis of 25 neuronal antigens. *Neuroscience.* 15:1049-1086.

- Van Hof, M.W., van Duin, J. (1971).** Locomotor activity in normal and dark-reared rabbit s. *Doc Ophthalm* . 30:317-331.
- Vandensande, F., Dierickx, K., DeMey, J. (1975).** Identification of the vasopressin-neurophysin producing neurons of the rat suprachiasmatic nuclei. *Cell Tissue Res.* 156: 377-380.
- Vernay, M. (1987).** Origin and utilization of volatile fatty acid and lactate in the rabbit : Influence of the faecal excretion Pattern. *Br J Nutr.* 57:371-381.
- Vernay, M., Marty J. (1984).** Absorption and metabolism of butyric acid in rabbit hind gut. *Comp Biochem Physiol.* 77A: 89-96.
- Villafuerte, R., Kufner, M.B., Delibes, M., Moreno, S. (1994).** Environmental factors influencing the seasonal daily activity of the european rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) in a mediterranean area. *Mammalia.* 57: 341-347.
- Vogt, P.K., Bos, T.J. (1990).** jun: oncogene and transcription factor. *Adv Cancer Res.* 55:1-35.
- Walter, M.R., Martinet, L., Moret, B., Thibault, C. (1968).** Photoperiodic regulation of sexual activity in male and female rabbits. *Arch Anat Histol Embryol.* 51(5):773-780.
- Wässle, H., Boycott, B.B. (1991).** Functional architecture of the mammalian retina. *Physiol Rev.* 71:447-480.
- Watts, A.G., Swanson, L.W., (1987).** Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus.II. Studies using retrograde transport of fluorescent dyes and simultaneous peptide immunochemistry in the rat. *J Comp Neurol.* 258:230-252.
- Weaver, D.R., Namboodiri, M.A., Reppert, S.M. (1988).** Iodinated melatonin mimics melatonin action and reveals discrete binding sites in fetal brain. *FEBS Lett.* 228(1):123-127
- Weaver, D.R., Reppert, S.M. (1989a).** Direct in utero perception of light by the mammalian fetus. *Brain Res Dev Brain Res.* 47(1):151-155.
- Weaver, D.R., Reppert, S.M. (1989b).** Periodic feeding of SCN-lesioned pregnant rats entrains the fetal biological clock. *Brain Res Dev Brain Res.* 46(2):291-296.
- Welsh, D.K., Logothetis, D.E., Meister, M., Reppert, S.M. (1995).** Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing patterns. *Neuron.* 14: 697-706.

**-Welsh, D.K., Reppert, S.M. (1996).** Gap junctions couple astrocytes but not neurons in dissociated cultures of rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* 706 (1): 30-36.

**-Wever, R.A. (1979).** *The Circadian System of Man: Results of Experiments Under Temporal Isolation.* Springer Verlag; Berlin. pp 276.

**-Williams, R.W., Herrup, K. (1988).** The control of neuron number. *Annu Rev Neurosci.* 11:423-453.

**-Wollnik, F, Brysch W, Uhlmann E, Gillardon F, Bravo R, Zimmermann M, Chlengersiepen KH, Herdegen T. (1995).** Block of c-Fos and JunB expression by antisense oligonucleotides inhibits light-induced phase shifts of the mammalian circadian clock. *Eur J Neurosci.* 7(3):388-393.

**-Wu, S.M. (1994).** Synaptic transmission in the outer retina. *Annu Rev Physiol.* 56: 141-168.

**-Yamazaki, S., Kerbeshian, M.C., Hocker, C.G., Block, G.D., Menaker, M. (1998).** Rhythmic properties of the hamster suprachiasmatic nucleus in vivo. *J Neurosci.* 18 (24):10709-10723.

**-Zarrow, M.X., Denenberg, V.H., Andersson, C. (1965).** Rabbit: Frequency of suckling in the pup. *Science.* 150:1835-1836.

**-Zucker, I., Carmichael, M.S. (1981).** Circadian rhythms, brain peptides, and reproduction. *Adv Biochem Psychopharmacol.* 28:459-473.

**ARTICULOS GENERADOS DE LA  
PRESENTE TESIS**

## TRACTO RETINOHIPOTALAMICO EN EL CONEJO

### Retinohypohalamic tract in the rabbit

R Toledo, R Aguilar-Roblero, Enrique Canchola, M Caba ✉  
(RT) (MC)

Laboratorio de Biología de la Reproducción,  
IIB, Universidad Veracruzana,  
A.P. · 114, Xalapa, Veracruz  
mcaba@uv.mx

(RAR) Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México  
(RT) (EC)

Ciencias Biológicas, UAM, México

Artículo recibido: 12 de mayo de 2004

Artículo aceptado: 4 de diciembre de 2004

**RESUMEN.** Los ritmos circádicos son variaciones que ocurren en un período de aproximadamente 24 horas y el más notable en nuestra especie es el ciclo sueño-vigilia. En los mamíferos dichos ritmos están controlados por un reloj maestro que se localiza en el núcleo supraquiasmático (NSQ), ubicado en el cerebro. Estos ritmos son endógenos pero necesitan sincronizarse a los ciclos externos de luz-oscuridad para que tengan una función adaptativa a los organismos. La información fótica externa es transmitida a través del tracto retinohipotalámico, una haz de fibras que va de la retina hasta el núcleo NSQ. En el presente trabajo se estudió la anatomía y el desarrollo ontogenético de dicho tracto en el conejo en dos condiciones, cuando su sincronizador principal es el alimento (día postnatal 1 y 9) y en adultos cuando su principal sincronizador es la luz, con el trazador  $\beta$  toxina de cólera. El tracto está presente desde los días 1 y 9 postnatal cuando los individuos aún no abren los ojos y presenta un desarrollo gradual de inervación en el NSQ. Esto es en el día 1 se observan escasas fibras en el núcleo, pero en el día 9 ya se observa una intensa inervación, la cuál es similar a la del adulto. Sin embargo se debe determinar si tanto en el día 1 y 9 dicha inervación ya es funcional, esto es, si responde a la estimulación fótica ya que el principal sincronizador de estos sujetos es el alimento y no la luz.

**Palabras clave:** tracto retinohipotalámico, ritmo circadico, núcleo supraquiasmático, conejo.

**ABSTRACT.** Circadian rhythms are fluctuations with a period around 24 hrs and the most remarkable in humans is the awake-sleep cycle. In mammals these rhythms are under control of a master clock in the suprachiasmatic nucleus (SCN), in the brain. However these rhythms are endogenous, need to be synchronized to the external light-dark cycles in order to have an adaptive value for the individuals. Photic external information is transmitted through retinohypothalamic tract, a bundle of fibers from retina to SCN. In the present contribution we analyzed the anatomy and ontogenetic development of this tract in rabbits in two conditions, when their main synchronizer is food (postnatal days 1 and 9) and in adults when their main synchronizer is light, with aid of the tracer cholera toxin  $\beta$ . Retinohypothalamic tract is present at postnatal days 1 and 9 when eyelids are closed and presents a gradual development; scarce fibers on postnatal day 1, but on day 9 it has a dense innervation, similar to adult subjects. It remains to determine whether the tract is functional at postnatal day 1 and 9, i.e., if responds to photic stimulation when the main synchronizer at these age is food, not light.

**Key words:** retinohypothalamic tract, circadian rhythm, suprachiasmatic nucleus, rabbit.

## INTRODUCCIÓN

Durante el proceso de evolución los organismos han desarrollado estrategias para adaptarse al medio ambiente, el cuál presenta variaciones cíclicas diarias y

estacionales a lo largo del año. Durante este proceso se desarrolló un complejo de mecanismos fisiológicos adaptados a dichos cambios medioambientales denominado sistema circádico. La función de este sistema, en conjunto, es la de proveer ritmos biológicos a los organismos. Por ejem-