

SINCRONIZACIÓN NO-LUMINOSA: ¿OTRO TIPO DE SINCRONIZACIÓN? PRIMERA PARTE¹

Alberto Salazar-Juárez*, Leticia Parra-Gámez**, Susana Barbosa Méndez*, Philippe Leff*, Benito Antón*

SUMMARY

One of the most important functions in which the circadian system participates is to assess that the behavioural and physiological variables adjust appropriately to daily events in the environment, a process referred to as entrainment. Since in the nature the food disposition and predators' activity also are cyclical, the temporary relation between the circadian rhythm and periodic environmental signals maximizes the survival of each species in its temporary niche.

Thus, through this mechanism, the organisms adapt to their environment through circadian system which entrain the organism activities to different external signals. In nature environments the predominance of photic entrainment like primary zeitgeber of the biological clock (suprachiasmatic nucleus) is a clear adaptation to the earthly life; nevertheless other biological advantages can be conferred to an individual if the circadian system also is sensible to other environmental signals that they provide from the external time.

In such way, the light is not the only synchronizer affecting the biological clock. Other stimuli like the temperature and locomotor activity induced by novel stimuli and certain drugs are also able to entrain the biological clock. These signals have been described like non-photic stimuli.

The general effects of the non-photic signals are able to generate phase response and entrain a free running rhythm, only during the subjective day, time in which the biological clock is sensible to these signals which are able to generate phase advances. These phase response are of great magnitude, even of greater magnitude than the induced ones by a light signal.

The non-photic signals are also able to induce residual effects (after-effects) on entrainment process, thereby generating changes in the endogenous period, therefore affecting the phase angle in a cycle L:O and promoting the development of locomotor activity rhythm splitting. Furthermore, the light entrainment has been characterized in a wide variety of diurnal and nocturnal species. While, the non-photic entrainment only appears in nocturnal rodents. Being the hamster's biological clock one of that responds to the greater number of biological non-photic signals such as the acute exposition to sexual odors, social interactions, as well as by simple injection of saline solution, all of these non-photic signals

are able to induce phase advances of the locomotor activity rhythm in free running when they are applied onto the subjective day. The entrainment to a non-photic stimulus is also observed in humans.

Among the non-photic stimuli we can have the pharmacological treatments, social stimuli, stress, food restriction and communication between mother and product in the foetal and neonatal life. These later stimuli are of a particular importance to optimize the circadian function and sensitize the newborn to external environment. Thus the non-photic stimuli could be categorized like behavioural or pharmacological stimuli. These manipulations involve an increase in the locomotor activity, excitation or states able to phase resetting the circadian clock and peripheral oscillators in different species.

The non-photic stimuli can affect to the biological clock through an afferent projection from the SCN that translate the non-photic information and is able to induce phase responses. Additionally, non-photic stimuli could also affect the biological clock through the action of a peripheral oscillator, which is sensitive to this type of signals. These peripheral oscillators translate the non-photic information and it communicates with the SCN, through synaptic and no-synaptic mechanisms.

With regard to the physiological mechanisms involved on this process, there has been suggested to participate four neurotransmitter systems in the circadian system: a) the serotonergic system originating from the raphe nucleus, b) the NPY system from the leaflet intergeniculate (IGL), c) the GABAergic system, which it is present in most of the neurons of the SCN and IGL (the afferent projections of the raphe and the IGL nucleus make synapse with GABAergic neurons in the SCN) and 4) finally a neural system involving dopamine and melatonin signals, which have been importantly implicated in the brain in the foetal and neonatal life.

In comparison to the cascade of intracellular signals caused by glutamatergic stimulation associated to photic entrainment, which excites to the SCN cells, the transmitters implicated in the non-photic entrainment typically inhibit the SCN neurons. For example the melatonin's main action on the SCN neurons is inhibiting adenylyl cyclase and the translation of related signals driven by the AMPc, such inhibition of activity of the protein kinase depended of AMPc (PKA), which give rise to a decreased phospho-

*Subdirección de Investigaciones Clínicas, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente.

**Departamento de Anatomía, Facultad de Medicina. UNAM.

Correspondencia: Alberto Salazar Juárez. Subdirección de Investigaciones Clínicas. Laboratorio de Neurobiología Molecular y Neuroquímica de las Adicciones. Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente. Calz. México-Xochimilco 101. San Lorenzo Huipulco, Tlalpan. 14370, México DF Tel: (5255) 5655-2811(Ext. 528 o 105), Fax: (5255) 5513-3722, Email: asalazar@ifc.unam.mx

¹En la segunda parte de este artículo aparecerán las referencias. Vol. 30, No. 4, julio-agosto de 2007.

Recibido: 30 de agosto de 2006. Aceptado: 26 de octubre de 2006.

rylation of the transcription factor CREB. In this way, the phase responses induced by non-photic stimuli are not associate with the phosphorylation of the transcription factor (CREB) associated to responsive DNA-elements to binding AMPcíclico or with the transcription of early expression genes in the SCN, events of metabothrophic signalling pathway of the photic entrainment.

The phase responses generated by the non-photic signals occur during the subjective day, time in which the spontaneous expression of clock genes is high in diurnal and nocturnal animals. A reason why the phase resetting of biological clock to non-photic signals can be generated by a fast suppression in the expression levels of the genes clock. The decrease of Per1 and Per2 messenger RNA's expression levels in the SCN generated by non-photic stimuli occurs during a half of the subjective day, not during the subjective night, which suggests that these genes may participate in the phase resetting of biological clock during the subjective day.

The interactions between phase response induced by the light and those induced by non-photic stimuli have been described previously. When a photic stimulus is applied after a non-photic signal during subjective day, with the purpose of studying the interaction between photic stimuli and non-photic stimuli, the photic stimulus blocks or attenuates the phase advances generated in response to different non-photic stimuli applied, such as the forced locomotor activity, sleep privation, NPY administration, or serotonergic agonists (8-OH-DPAT) administration.

If the genes clock responds to the non-photic stimuli, then the lack of some of them will have to generate alterations in the response to non-photic signals. In the Clock mutant mice, the biological clock responses to the non-photic signals applied during the subjective day generate phase responses in opposed direction from those generated by intact subjects. This latter suggests that different genes clock participate in the generation of the phase response to a non-photic stimulus.

The non-photic entrainment of the circadian system has a biological and/or social importance in several contexts. In the early products life, the communication of circadian information from the mother is important in regulating the biological clock of the foetus or newborn before they are sensitive to light. Under circumstances where the social and work routines are altered, by changes of constant "work turn" (shift work), the biological clock receives photic and non-photic signals which generate a dysfunction and poor work efficiency. The absence of non-photic signals followed by a social abstinence can induce alterations in the mental health (depression). The sleep disorder, experimented blind subject can arise from a lost of the social entrainment, therefore a decrease in the efficiency of the clock mechanism. Thus latter alterations of the clock, it could be possible to develop new forms of pharmacological and behavioural treatments.

Key words: Biological rhythms, non-photic entrainment, biological clock.

RESUMEN

Una de las funciones más importantes del sistema circadiano es asegurar que las variables conductuales y fisiológicas de un organismo se ajusten apropiadamente a los eventos diarios en el ambiente, en un proceso llamado sincronización. En la naturaleza, la predominancia de la luz (sincronización luminosa) como el sincronizador principal del reloj circadiano (NSQ) es una clara adaptación a la vida terrestre. Sin embargo, otras ventajas biológicas

pueden ser conferidas a un individuo si el sistema circadiano también es sensible a otras señales ambientales que proporcionen un estimado real del tiempo externo. De tal modo, la luz no es el único sincronizador que puede afectar al reloj biológico. Otros estímulos, como la temperatura, la actividad locomotora inducida por estímulos novedosos y ciertas drogas y fármacos, también son capaces de sincronizar el reloj biológico. En conjunto, estas señales han sido descritas como estímulos no luminosos. Durante el día subjetivo, tiempo en el cual el reloj biológico es sensible a estas señales, todas las manipulaciones no luminosas son capaces de generar avances de fase y de sincronizar un ritmo en corriente libre. Las respuestas de fase generadas por las señales no luminosas son de gran magnitud, aun de mayor magnitud que las inducidas por la luz. Asimismo, estas señales son capaces de inducir efectos residuales (*after-effects*) sobre la sincronización, de generar cambios en el periodo endógeno, de afectar el ángulo de fase en sincronización a un ciclo L:O y de promover el desarrollo del fenómeno de partición (*splitting*) del ritmo de actividad locomotora. Finalmente, la sincronización a la luz ha sido caracterizada en una amplia variedad de especies diurnas y nocturnas; en cambio, la sincronización no luminosa sólo se presenta en roedores nocturnos. Los estímulos no luminosos pueden ser categorizados como estímulos conductuales o farmacológicos. De entre los diferentes tipos de estímulos no luminosos que conforman estas categorías, destacan los tratamientos farmacológicos, los estímulos sociales, el estrés, la restricción de alimento y la comunicación entre la madre y el producto en la vida fetal y neonatal. Este último es de particular importancia para optimizar la función circadiana y sensibilizar al neonato a los ambientes externos. Con respecto a los mecanismos fisiológicos involucrados en este proceso, se ha sugerido que participan cuatro de los sistemas de neurotransmisión implícitos en el sistema circadiano: a) el sistema serotoníngérgico proveniente del núcleo del rafé, b) el sistema inmuno-reactivo a NPY proveniente de la hojuela intergeniculada (HIG), c) el sistema GABAérgico que se encuentra presente en la mayoría de las neuronas del NSQ y de la HIG (las proyecciones aferentes del núcleo del rafé y de la HIG hacen sinapsis con neuronas GABAérgicas en el NSQ) y 4) finalmente un sistema que implica señales dopaminérgicas y melatoninérgicas, las cuales se han implicado importantemente en sujetos en la vida fetal y neonatal.

En comparación con la cascada de señales intracelulares involucradas en la sincronización luminosa, las respuestas de fase inducidas por estímulos no luminosos no se asocian con la fosforilación de factores de transcripción que se unen a elementos de respuesta al AMPcíclico (CREB) o con la transcripción de genes de expresión temprana en el NSQ, eventos de señalización característicos de la sincronización luminosa. Las respuestas de fase generadas por las señales no luminosas ocurren durante el día subjetivo, tiempo en el cual la expresión espontánea de los genes reloj es alta en animales diurnos y nocturnos. Lo anterior sugiere que el reinicio de fase del reloj biológico a señales no luminosas puede ser generado por una supresión rápida en los niveles de expresión de los genes reloj. La disminución generada por los estímulos no luminosos en los niveles de expresión del RNA de Per1 y Per2 en el NSQ sólo ocurre durante la mitad del día subjetivo, no durante la noche subjetiva, lo cual sugiere que estos genes participan de modo importante en el reinicio de fase durante el día subjetivo.

En los ratones *knockout* del gen *Clock* se modifican las respuestas del reloj biológico a las señales no luminosas. Cuando al ratón mutante *Clock*, se le aplican, durante el día subjetivo, paradigmas de actividad locomotora forzada, se generan respuestas de fase en dirección opuesta a las generadas por sujetos intactos. Esto sugie-

re que los distintos genes reloj participan en el origen de las respuestas de fase a estímulos no luminosos.

Palabras clave: Ritmos biológicos, sincronización no luminosa, reloj biológico.

Una de las funciones más importantes del sistema circadiano es asegurar que las variables conductuales y fisiológicas se ajusten apropiadamente a los eventos diarios del ambiente, en un proceso llamado sincronización. Dado que la disposición de alimento y la actividad de los predadores también son cíclicas en la naturaleza, la relación temporal entre los ritmos circadianos y las señales ambientales periódicas maximiza la supervivencia de cada especie a su nicho temporal. De esta manera, los organismos vivos se adaptan a su ambiente a través del sistema circadiano, el cual sincroniza las actividades del organismo a las distintas señales ambientales externas. En la naturaleza, la predominancia de la luz (sincronización luminosa) como principal sincronizador del reloj circadiano (núcleo supraquiasmático-NSQ) es una clara adaptación de los organismos a la vida terrestre. Sin embargo, otras ventajas biológicas pueden ser conferidas a un individuo si el sistema circadiano también es sensible a otras señales ambientales que le proporcionen un estimado real del tiempo externo (126). Por ejemplo, en organismos unicelulares, factores como la disponibilidad de nutrientes y la temperatura ambiental pueden alterar la fase de distintos ritmos circadianos. La luz tiene la capacidad de inducir respuestas de fase por parte del reloj circadiano, las cuales son estudiadas usualmente por medio de la curva de respuesta de fase (CRF). Sin embargo, la luz no es el único sincronizador que puede afectar el reloj biológico. Otros estímulos, como la temperatura, la actividad locomotora inducida por estímulos novedosos y ciertas drogas y fármacos, también son capaces de sincronizar el reloj biológico (86); en conjunto, estas señales se han descrito como *estímulos no luminosos* (80). Los estímulos no luminosos son capaces de generar respuestas de fase y patrones de sincronización (41). Sin embargo, la CRF para pulsos de luz y para estímulos no luminosos difiere en algunos aspectos. La luz induce retrasos de fase alrededor del inicio de la noche subjetiva y avances de fase al final de la misma, cuando estímulos no luminosos, como la actividad locomotora inducida por estímulos novedosos y las inyecciones de triazolam, generan avances de fase durante el día subjetivo y ligeros retrasos de fase al inicio de la noche subjetiva (110). Entre los estímulos no luminosos más comunes podemos encontrar los tratamientos farmacológicos, los estímulos sociales, el estrés, la restricción de alimento y la comunicación en-

tre la madre y el producto en la vida fetal y neonatal. Esta última es de particular importancia para sensibilizar al neonato a los ambientes externos. De tal manera, los estímulos no luminosos pueden ser categorizados de manera general como estímulos conductuales o farmacológicos (85). En su mayoría, estas manipulaciones involucran un aumento en la actividad locomotora, excitación o estados correlacionados capaces de reiniciar la fase del reloj circadiano y de los osciladores periféricos en diferentes especies. Los efectos que inducen las señales no luminosas son diferentes a los efectos generados por las señales luminosas.

Durante el día subjetivo, tiempo en el cual el reloj biológico es sensible a estas señales e insensible a un estímulo luminoso, todas las manipulaciones no luminosas son capaces de generar avances de fase y de sincronizar un ritmo en corrimiento libre (79, 114). Estas respuestas de fase son de gran magnitud, aun de mayor magnitud que las inducidas por la luz. Las señales no luminosas también son capaces de inducir efectos residuales (*after-effects*) sobre la sincronización (115), de generar cambios en el periodo endógeno (84), de afectar el ángulo de fase en sincronización a un ciclo L:O (46) y de promover el desarrollo del fenómeno de partición (*splitting*) del ritmo de actividad locomotora (100). Finalmente, la sincronización a la luz ha sido caracterizada en una amplia variedad de especies diurnas y nocturnas; en cambio, la sincronización no luminosa sólo se ha observado en roedores nocturnos (37). Siendo el reloj biológico del hamster el que responde al mayor número de señales biológicas no luminosas - como la exposición aguda a olores sexuales, interacciones sociales, manipulación o por la simple inyección de solución salina- todas estas señales no luminosas son capaces de inducir avances de fase del ritmo de actividad locomotora en corrimiento libre cuando son aplicadas en el día subjetivo. La sincronización a estímulos no luminosos también se observa en humanos (76), como en el caso de sujetos en aislamiento temporal experimental o sujetos que viven en intensidades de luz bajas de manera permanente, como en el invierno polar, donde las señales cognitivas asociadas con el conocimiento del tiempo externo no son suficientes para impedir que algunos de sus ritmos circadianos se expresen en corrimiento libre (69). Sin embargo, estos sujetos pueden sincronizar sus ritmos biológicos por medio de la imposición de programas conductuales, o a la interacción social con otros sujetos o a episodios simples o repetidos de programas de ejercicio. Estos programas conductuales evitan la tendencia del reloj biológico a expresarse en corrimiento libre en sujetos ciegos.

CURVA DE RESPUESTA DE FASE

La curva de respuesta de fase (CRF) típica para estímulos no luminosos muestra las siguientes características: una región donde el estímulo no luminoso no induce cambios de fase, la cual se localiza entre CT 12 y CT 20 (la zona muerta); una región de ligeros retrasos de fase de CT 21 a CT 2 (zona de retrasos de fase), y una región de grandes avances de fase de CT 2 a CT 11 (zona de avances de fase). Este patrón de respuesta de fase es muy similar al inducido por los diferentes tipos de estímulos no luminosos usados, como puede ser la actividad locomotora forzada o la inyección de triazolam (101). Sin embargo, la CRF para estímulos no luminosos se altera en sujetos con una mutación en alguno de los genes que componen la maquinaria molecular del reloj biológico (14). Los ratones mutantes tau muestran un aumento en la magnitud de las respuestas de fase, de cerca de siete horas, en respuesta a un estímulo no luminoso. Además, la forma de la CRF es diferente en estos sujetos, ya que la zona sensible a los estímulos no luminosos cambia. Un problema potencial para la obtención de la CRF para estímulos no luminosos es el marcador de fase del ritmo de actividad locomotora que se usa para determinar la fase a la cual se debe aplicar el estímulo (figura 1).

Después de aplicar un estímulo no luminoso en ciertas CTs es común observar cambios en el periodo endógeno (τ) junto con las respuestas de fase (123). Esto crea un problema muy grave, debido a que la magnitud y la dirección de las respuestas de fase dependen de la comparación prepulso y pospulso de una fase de referencia en un mismo periodo; si τ se altera, entonces sería arbitraria la determinación de la fase estable. Debido a que se observa un sobrelapamiento en la CRF a estímulos no luminosos entre la actividad locomotora espontánea del animal, observada en la noche subjetiva tardía con la actividad locomotora inducida por un estímulo no luminoso, sugiere la presencia de un asa de retroalimentación negativa a través de la cual un ritmo circadiano controlado por el reloj biológico (ritmo de actividad locomotora) induce el reinicio de fase del marcapaso (NSQ); sin embargo, esta relación ha sido poco estudiada. Por otro lado, debido a que el principal efecto de un estímulo no luminoso es el aumento de la actividad locomotora del sujeto, es muy importante determinar la actividad locomotora promedio sin estimulación (basal). Ya que se ha reportado que a más actividad locomotora basal, mayor es la magnitud de las respuestas de fase; entonces conocer umbral de la actividad locomotora basal nos permitirá predecir la magnitud de las respuestas de fase. Debido a que la forma de la CRF para la administración de triazolam y para estímulos novedosos en

oscuridad continua o a animales enucleados genera respuestas de fase similares a las obtenidas en un ciclo luz:oscuridad (113), este hecho sugiere que las respuestas de fase inducidas por los estímulos no luminosos no son inducidas por la cantidad de luz que el sujeto percibe en el momento del estudio. Además, las respuestas de fase generadas en la mitad del día subjetivo, la zona temporal de la CRF en la cual los estímulos no luminosos inducen respuestas de fase, es justo la porción de la CRF para luz (zona muerta) en la cual el estímulo luminoso no genera respuestas de fase. Lo anterior sugiere que la luz no es indispensable para la expresión de respuestas de fase a estímulos no luminosos. Esto implica dos vías de señalización: una que media la sincronización luminosa y otra que media la sincronización no luminosa; ambas son capaces de reiniciar la fase del reloj biológico. Este mecanismo redundante es tal vez una adaptación de los organismos a su ambiente, lo cual aumenta sus probabilidades de supervivencia en su nicho temporal. La proyección glutamatérgica proveniente de la retina es la encargada de transmitir la información luminosa al reloj. Sin embargo, el sistema neuroquímico a través del cual la información no luminosa es transmitida al reloj biológico y/o a osciladores periféricos no está determinado aún.

Recientemente se ha reportado que condiciones de luz continua (L:L) por dos-tres días potencian las respuestas de fase inducidas por estímulos no luminosos (51). El mecanismo por el cual se induce este aumento en las respuestas de fase no se ha determinado aún; es probable que la luz continua afecte el funcionamiento de alguna de las proyecciones aferentes al reloj biológico (figura 2).

TIPOS DE ESTÍMULOS NO LUMINOSOS

a) Locomoción forzada. Los estímulos no luminosos inducen un incremento en la actividad locomotora del sujeto (86). Entre los protocolos de estimulación no luminosa más usados en la investigación que inducen un incremento en la actividad locomotora se encuentran: la locomoción inducida por estímulos novedosos, el confinamiento a nuevas ruedas de giro (locomoción forzada), patrones periódicos de ejercicio (29, 56) y la privación de sueño. Todos ellos son capaces de inducir el reinicio de la fase del reloj biológico. En comparación con la luz, no todas las especies de mamíferos son sensibles a este tipo de estímulo no luminoso. Por ejemplo, en el hamster, la locomoción inducida por estímulos nuevos o por privación de sueño induce respuestas de fase predecibles (74). En algunas especies diurnas, como la ardilla y las marmotas, el confinamiento a ruedas de giro por tres horas induce

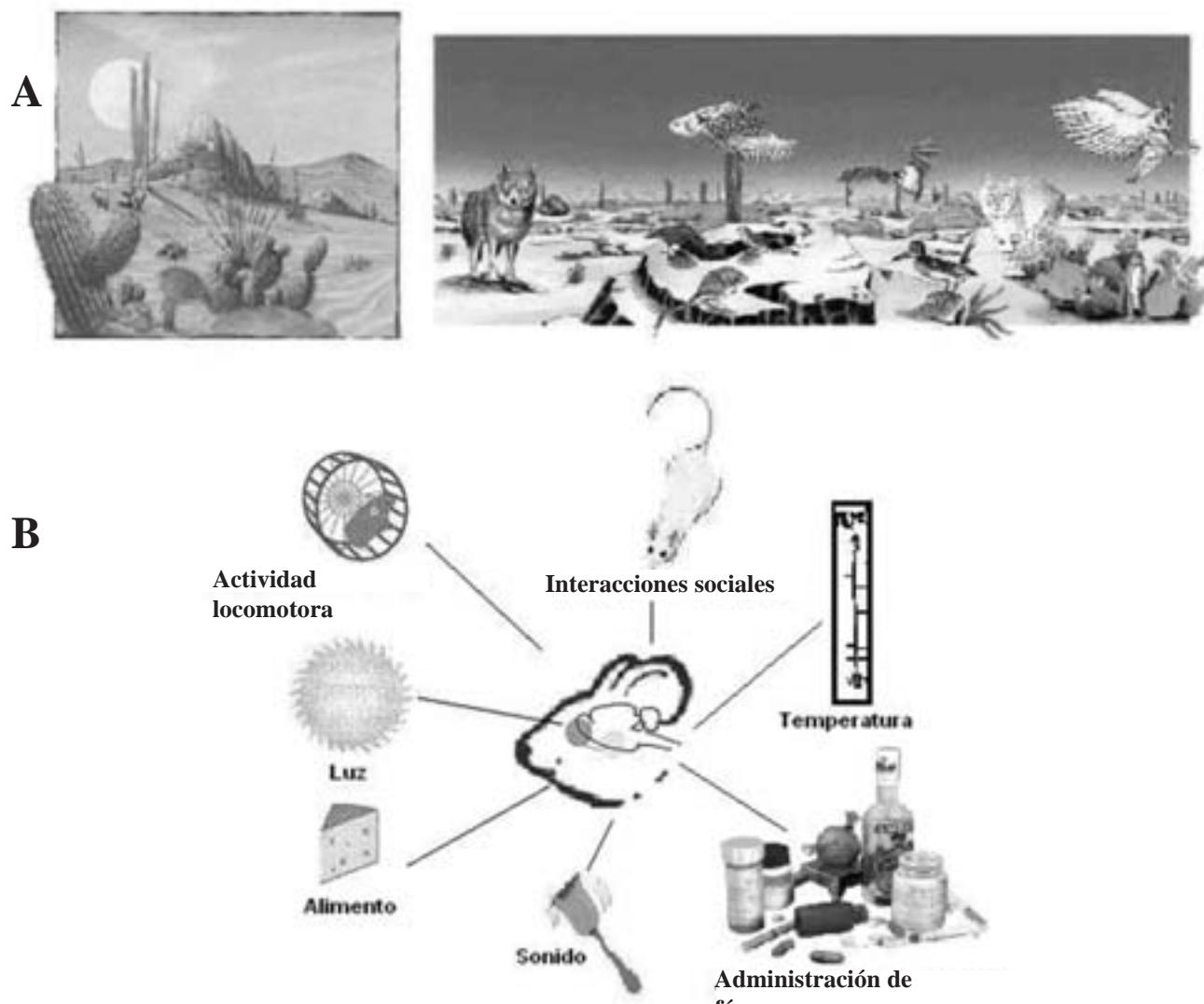


Fig. 1. Tanto en la naturaleza (A) como en condiciones de laboratorio (B), el reloj biológico es sensible a otras señales ambientales periódicas. El valor adaptativo de la sincronización no lumínosa se refleja en condiciones naturales donde la disponibilidad de alimento y la actividad de los predadores provocan que los sujetos ajusten su actividad a estas señales más que al ciclo de iluminación, lo cual se refleja en su supervivencia. En B se ejemplifican los diferentes sincronizadores no luminosos que inducen la sincronización del reloj biológico.

un aumento en la actividad locomotora. En el *Octodon degus*, la actividad locomotora forzada altera la distribución temporal de los ritmos circadianos de actividad locomotora y de otros ritmos biológicos, alarga el periodo endógeno del ritmo de temperatura corporal y revierte la preferencia diurna de estos sujetos a una nocturna. En el ratón, un protocolo de actividad locomotora forzada induce respuestas de fase y sincronización de los ritmos circadianos. Una hora de actividad locomotora forzada aplicada siempre a la misma hora es suficiente para sincronizar el reloj biológico del ratón. Por ejemplo, el ratón C57BL/6 muestra un periodo endógeno en corrimiento libre de menos de 24 horas. Estos sujetos se sincronizan a patrones de ejercicio periódicos por medio de retrasos de fase, que ocurren a la mitad de la noche subjetiva. Otras

especies son menos sensibles a los patrones de actividad locomotora forzada; por ejemplo, la rata sujeta a patrones diarios de 2-3 horas de actividad locomotora forzada en rueda de giro o a la privación de sueño, muestra sólo efectos moderados sobre el periodo endógeno y la sincronización sólo se observa en pequeños grupos de animales. En humanos, los patrones de ejercicio forzado aplicados a la mitad de la noche subjetiva inducen retrasos de fase del ritmo circadiano de temperatura corporal y hormonal. Lo anterior sugiere que el reloj biológico de los humanos también es sensible a este tipo de señales. La CRF para este tipo de estímulos, por ejemplo a tres horas de actividad locomotora inducida por estímulos novedosos (una nueva rueda de giro), se caracteriza por avances de fase durante la mitad del día subjetivo y retrasos de fase a la

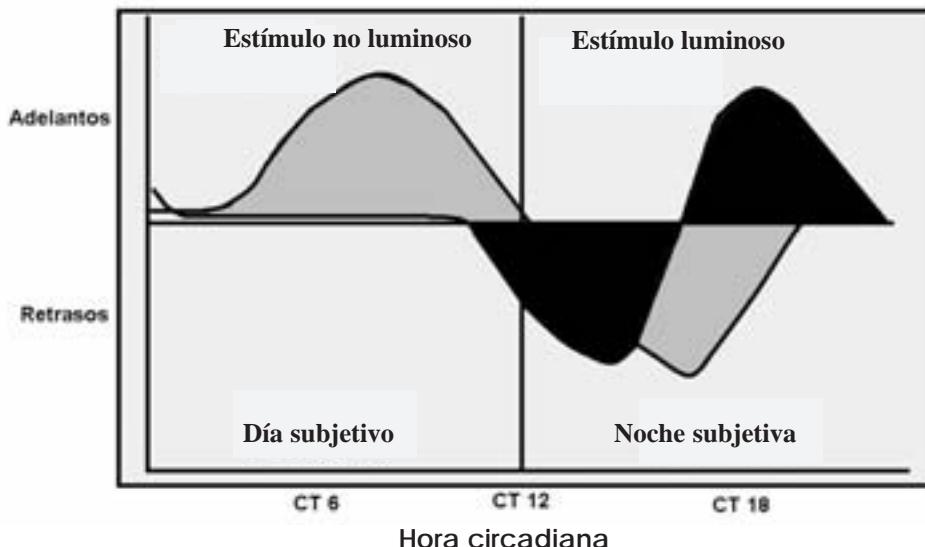


Fig. 2. Comparación de las curvas de respuesta de fase (CRF) a un estímulo luminoso y a uno no luminoso. En el caso de la CRF a pulsos de luz, se pueden reconocer tres regiones: una región donde no se observan cambios de fase, la cual corresponde a la zona muerta (día subjetivo); una región donde el reloj biológico responde con retrasos de fase (noche temprana), y una región donde se observan adelantos de fase (noche tardía). En cambio, la CRF a estímulos no luminosos también se caracteriza por presentar las tres regiones antes mencionadas. La diferencia radica en que en el día subjetivo, justo cuando la luz no tiene efecto, los estímulos no luminosos generan grandes avances de fase y en la noche tardía, justo cuando la luz tiene mayores efectos, las señales no luminosas no inducen cambios de fase.

mitad de la noche subjetiva. Sin embargo, la sensibilidad del reloj biológico a la actividad locomotora forzada reflejada en la CRF es diferente dependiendo de la especie estudiada. En la rata, los avances de fase inducidos por la actividad locomotora forzada son observados entre CT 13-15, en el hamster y en el ratón; los avances de fase ocurren durante la mitad del día subjetivo en CT 6. Algo muy interesante de las respuestas de fase generadas por la actividad locomotora forzada es la relación que guarda la magnitud de la actividad locomotora con el tipo de protocolo usado. Por ejemplo, en el hamster la magnitud de las respuestas de fase inducidas por un estímulo novedoso (nueva rueda de giro) es una función lineal de la cantidad total de actividad locomotora por unidad de tiempo. Sin embargo, se ha estudiado poco el mecanismo y la relación que guardan éstas.

b) Interacciones sociales. Las interacciones sociales entre individuos de una misma especie constituyen un tipo de sincronizador no luminoso muy común en algunas especies. En el roedor diurno *Octodon degus*, las interacciones sociales inducen que los sujetos se resincronicen más rápido después de un cambio en el inicio del ciclo luz-oscuridad (L:O) al actuar como un sincronizador débil que modula la sincronización luminosa. En el hamster, por ejemplo, cuando un macho se expone a una hembra en estro por tres horas, el día que se inicia el cambio en el ciclo de luz-oscuridad, la actividad locomotora del macho se resincroniza más rápido al nuevo ciclo de iluminación que cuando lo

hace sin el estímulo. Esto sugiere que las interacciones sociales complementan las respuestas del reloj biológico al sincronizador principal. Las señales olfatorias parecen ser necesarias para que este tipo de estímulo no luminoso surta su efecto, ya que la bulboctomía elimina el aumento en la velocidad de resincronización inducido por las interacciones sociales. Fue suficiente aplicar señales olfatorias a sujetos aislados de señales sociales para reducir el tiempo necesario para resincronizarse a un avance o a un retraso de fase de 6 horas en el inicio del ciclo L:O. Por otro lado, las interacciones sociales pueden alterar el periodo en corrimiento libre en el hamster, el ratón, la rata, las marmotas y las aves por medio de la coordinación del periodo endógeno de un sujeto con el periodo endógeno de los demás sujetos que conforman la colonia. En los humanos, las señales sociales pueden funcionar como sincronizadores muy potentes; sin embargo, los efectos de las interacciones sociales sobre la sincronización a la luz son difíciles de apreciar debido a la exposición simultánea de éstos con luz.

c) Alertamiento. Un paradigma de sincronización no luminosa muy usado en la investigación es someter a los sujetos a patrones de alertamiento, los cuales radican en que, en un tiempo circadiano determinado, el sujeto recibe una inyección subcutánea de solución salina (200 μ l). Esto genera la activación conductual del animal justo cuando éste debería estar en reposo (40). De esta manera, la respuesta asociada a la manipulación del animal y a la inyección de solución salina con-

forma en conjunto lo que se denomina señal de alertamiento (40). Esta simple manipulación experimental induce un avance de fase del ritmo de actividad locomotora en corrimiento libre, sólo en un estrecho lapso de tiempo circadiano, entre CT 8-10. El alertamiento también está asociado a un aumento en la actividad locomotora basal; sin embargo, se considera otro tipo diferente de estímulo no luminoso a los estímulos asociados con la locomoción forzada (75). Este estímulo no luminoso induce un rápido reinicio de fase del reloj biológico, donde el NSQ adopta una nueva fase en 1-2 horas después de la presentación del estímulo. Esta observación fue corroborada por medio del uso de un paradigma experimental de doble pulso, seguido de una inmunohistoquímica contra la proteína Fos (el cual es un marcador de fase de la actividad neuronal inducida por un estímulo). En este paradigma se aplicó el mismo día un estímulo de alertamiento en CT 10 (día subjetivo), el cual induce un avance de fase y un pulso de luz una hora después, en CT 11, fase en la cual no se induce la expresión de la proteína Fos. Si el estímulo de alertamiento induce un avance de fase rápido, entonces el pulso de luz aplicado una hora después no estaría en CT 11, pues caería en una hora circadiana en la cual la luz induciría una fuerte expresión de la proteína Fos, CT 12 (noche subjetiva temprana) como resultado del avance de fase inducido por el alertamiento. En cambio, si el alertamiento no induce un avance de fase rápido, entonces el pulso de luz caería en una hora circadiana en la cual la luz no induce la expresión de la proteína Fos, CT 11. El estímulo de alertamiento comparado con el estímulo luminoso generó una fuerte expresión de la proteína Fos en el NSQ, lo cual sugiere que el estímulo no luminoso (alertamiento) induce un rápido reinicio de fase del reloj biológico (64). Por otro lado, hamsters expuestos a un patrón diario de seis episodios de alertamiento iniciando en CT 10 con un periodo de 23 o 23.5 horas se sincronizan sólo por 3 o 4 ciclos, para después regresar a su periodo original con un avance de fase máximo de alrededor de 2.5 horas (105). Este patrón de sincronización inducido por el alertamiento es eliminado por la lesión de la HIG (59). Esto sugiere que el estímulo de alertamiento no afecta directamente la fase del reloj circadiano, pues probablemente las señales de alertamiento actúan sobre alguno de los osciladores periféricos (HIG), el cual no es capaz de mantener los efectos sobre la conducta. Se ha reportado que la administración de cafeína, un antagonista de la adenosina, induce alertamiento sin generar respuestas de fase (9); esto sugiere que la adenosina participa en la regulación de las señales inducidas por el alertamiento.

d) Patrones de ingesta de alimento. Los organismos vivos requieren suficiente energía para sobrevivir

y reproducirse. Consecuentemente, las fuertes presiones de la selección natural deben haber desarrollado diferentes estrategias de alimentación dependiendo del nicho temporal del organismo. En la naturaleza, las fuentes de alimento de los omnívoros y los carnívoros están disponibles únicamente durante ventanas temporales muy estrechas dentro del día o la noche, y éstas pueden cambiar durante las estaciones del año. Para los herbívoros, por ejemplo, las fuentes de alimento son constantes durante una etapa del año. A pesar de la abundancia de alimento, puede ser más ventajoso alimentarse únicamente en ciertos momentos del día con el fin de evitar a los predadores. Así, el tiempo de disponibilidad del alimento y el tiempo de alimentación son factores importantes para la supervivencia de los organismos. En el laboratorio se ha podido caracterizar la función del alimento como un sincronizador no luminoso, que impone a los animales horarios de alimentación restringidos a unas pocas horas del día. Este procedimiento genera un patrón de activación conductual de dos a tres horas antes de la hora de alimentación, conocido como actividad de anticipación al alimento (AA). Esta conducta se caracteriza por un incremento de la actividad locomotora dirigida a la búsqueda y adquisición del alimento. Investigaciones de los efectos de la restricción diaria de alimento sobre procesos fisiológicos revelan que la temperatura y los niveles de corticosterona sérica se elevan con anterioridad al acceso al alimento. Sin embargo, este tipo de paradigma, en que participa el alimento como una señal sincronizadora, involucra claramente un oscilador localizado fuera del NSQ, ya que la lesión de éste no elimina la anticipación conductual, de temperatura corporal y de corticosterona en ratas bajo restricción de alimento (58).

e) Administración de drogas.

I. Benzodiazepinas. La administración de benzodiazepinas como triazolam, midazolam o clorodiazepóxido durante el día subjetivo induce avances de fase y expresión de la proteína FOS en el reloj biológico (66, 131) del hamster, en donde las inyecciones administradas durante la noche subjetiva temprana inducen retrasos de fase. Por otro lado, las inyecciones repetidas de triazolam son capaces de sincronizar el ritmo de actividad locomotora en el hamster, el cual es mantenido por avances de fase diarios (114). Sin embargo, la inyección sistémica de triazolam en el hamster induce un aumento en la actividad locomotora visto a través de la conducta de rueda de giro, lo cual sugiere que la respuesta al triazolam depende de un aumento en la actividad locomotora, ya que si los animales son inmovilizados, se bloquean las respuestas de fase generadas por la administración de triazolam (81). Aunque la inyección sistémica de clorodiazepóxido induce efectos con-

ductuales similares al triazolam, el primero suprime la actividad locomotora forzada (11). Esto sugiere que la respuesta del reloj biológico a las benzodiazepinas es compleja e involucra la participación de varias vías de señalización. Recientemente se reportó que la administración de brotizolam induce avances de fase cuando se administra durante el día subjetivo (CT6-9) e inhibe la expresión de los genes reloj Per1-2 en el NSQ (127). La coadministración de 8-OH DPAT, un agonista del receptor 5HT_{1/7}, con brotizolam, no potencia los avances de fase ni la inhibición de los genes reloj, lo cual sugiere que ambos tienen un mecanismo común, ya que la administración de 8-OH DPAT disminuye la expresión de los genes reloj en el NSQ en CT9 (42). Pero, ¿cómo actúan las benzodiazepinas para generar las respuestas de fase? Se ha sugerido que las benzodiazepinas actúan a través de la neurotransmisión dependiente de GABA; esto es importante ya que la mayoría de las neuronas del NSQ y de la HIG son GABAérgicas (77). Recientemente se ha sugerido que las respuestas de fase inducidas por las benzodiazepinas (triazolam) requieren la participación del sistema serotoninérgico (67, 88) y de la presencia de una HIG intacta, ya que la lesión de la HIG atenúa las respuestas de fase inducidas por la administración de triazolam o la actividad locomotora forzada (47, 49, 124). Como se mencionó anteriormente, las benzodiazepinas potencian los efectos de la neurotransmisión GABAérgica mediante la activación del receptor GABA_A. Este receptor está ampliamente distribuido en el Sistema Nervioso Central (SNC). El núcleo del rafé es el sitio del SNC que presenta la mayor expresión de este tipo de receptor. El NSQ sólo presenta una modesta densidad de receptor GABA_A (68), por lo que el núcleo del rafé parecería ser el sitio donde actuarían las benzodiazepinas. Asimismo, por medio de la acción de las benzodiazepinas sobre las células del núcleo del rafé se afectaría la fase del reloj biológico, posiblemente a través de la modulación de la transmisión serotoninérgica a nivel del núcleo del rafé y/o del NSQ. La proyección serotoninérgica del rafé medial a la HIG es importante para las respuestas de fase inducidas por el triazolam, ya que los efectos de éste desaparecen en los sujetos con lesión de las vías serotoninérgicas (67, 88).

II. Péptidos opioides. La proyección del núcleo del rafé medial al NSQ es immunoreactiva a serotonina. En cambio, la proyección de la HIG al NSQ es inmunoreactiva a varios transmisores: NPY, GABA, neurotensina y encefalina (78). La encefalina lleva a cabo su acción biológica a través de la activación de los receptores opioides μ y delta; sin embargo, el receptor opioide delta es el blanco preferencial de la encefalina. La participación de las encefalinas en el sistema circadiano no se sustenta en evidencia que indica la presencia del

receptor opioide delta (δ) en el NSQ (18). La administración de agonistas de los receptores opioides delta y μ (μ), BW373U86, SNC 80, morfina y fentanil, durante el día subjetivo (CT 8-10) induce avances de fase del ritmo circadiano de actividad locomotora. Los niveles de actividad locomotora basal no se vieron afectados por la administración de los agonistas opioides delta. Sin embargo, la administración de agonistas opioides contra el receptor μ (morfina) y kappa aumentaron la actividad locomotora basal pero no indujeron respuestas de fase (17, 18, 55, 65, 73). Esto sugiere que, a través de la activación del receptor opioide delta, las encefalinas inducen respuestas de fase no luminosas. En cambio, la activación de los otros receptores opioides sólo afecta la actividad locomotora y no afectan el reloj biológico.

La administración de agonistas del receptor opioide delta bloquea las respuestas de fase inducidas por pulsos de luz aplicados durante la noche subjetiva tardía. Esto sugiere que la proyección de la IGL al NSQ puede modular los efectos de la luz sobre el NSQ en el día subjetivo (108) y que las neuronas del NSQ involucradas en las respuestas de fase inducidas por pulsos de luz están bajo el control modulatorio del sistema opioide. Ya que el tracto retinohipotalámico (TRH) y el tracto geniculohipotalámico (TGH) convergen en el mismo sitio dentro del NSQ, entonces es probable que la influencia luminosa y la opioide afecten a las mismas neuronas dentro del NSQ. A pesar de que no existe un acuerdo general acerca de la presencia de los diferentes tipos de receptores opioides en el NSQ, se ha reportado la presencia del receptor opioide μ en el NSQ de la rata. La administración de morfina durante la noche subjetiva induce un aumento en la actividad locomotora, pero no induce respuestas de fase (73). En cambio, la administración de morfina durante el día subjetivo induce respuestas de fase en el ratón C57BL/6j (55). La administración de morfina previa a la aplicación de un pulso de luz en la noche subjetiva tardía atenúa las respuestas de fase inducidas por la luz. Este efecto se antagoniza inmovilizando al animal (73). Por otro lado, la administración de fentanil, un potente y selectivo agonista del receptor opioide μ , aunque capaz de unirse al receptor opioide delta y kappa, induce respuestas de fase del ritmo de actividad locomotora e inhibe la actividad eléctrica y la expresión de los genes reloj en células del NSQ (65). Todos estos efectos son bloqueados con la administración de un antagonista opioide, la naloxona. Lo anterior sugiere que el efecto del fentanil sobre el sistema circadiano es a través de la activación del receptor opioide μ . Por otro lado, la administración de fentanil bloquea las respuestas de fase inducidas por la luz y ésta bloquea las respuestas de fase inducidas por la administración de fentanil. Esto

sugiere que el fentanil puede modificar la sensibilidad del reloj biológico a la luz al alterar la actividad eléctrica y la regulación de los genes reloj en células del NSQ. Asimismo, las neuronas del NSQ expresan el péptido opioide nociceptina, así como a su receptor ORL-1. La administración de nociceptina a rebanadas hipotalámicas que contienen al NSQ evoca corrientes de K^+ , reduce la concentración de Ca^{+2} intracelular, induce una hiperpolarización de las células del NSQ (4) y genera la inhibición de las corrientes excitatorias mediadas por glutamato e inducidas por la estimulación del nervio óptico (38). La administración de nociceptina previa a la exposición a un pulso de luz atenúa las respuestas de fase inducidas por la luz (4) e inhibe la expresión de la proteína FOS inducida por pulsos de luz. Este efecto es bloqueado mediante la administración de *compound B*, un antagonista del receptor ORL-1 (104). El agonista sintético contra el receptor ORL-1, 2-(3-(1-((1R9-acenapten-1-yl)piperidin-4-yl)-2-3-dihidro-2-oxo-benzimidazol-1-yl)-N-metilacetamida (W-212393), suprime la actividad eléctrica espontánea de las neuronas del NSQ; este efecto es bloqueado por un antagonista del receptor ORL-1, J-

113397. La administración de W-212393 induce respuestas de fase durante el día subjetivo de una magnitud mayor que las generadas por el 8-OH-DPAT o por la melatonina. Además, la administración de W-212393 aumenta la velocidad de resincronización del ritmo de temperatura corporal en respuesta a un cambio de seis horas en el inicio del ciclo L:O (107). La administración de W-212393 no induce un aumento en la actividad locomotora. Esto sugiere que los distintos receptores opioides expresados por las células del NSQ (δ , μ y ORL-1) modulan las respuestas de fase a la luz y generan respuestas de fase en el día subjetivo. El mecanismo a través del cual se llevan a cabo estos efectos aún es desconocido. Sin embargo, podemos sugerir que el efecto de los agonistas opioides puede ser mediado por un sitio fuera del NSQ (oscilador periférico), o que las neuronas del NSQ sólo sean sensibles a los péptidos opioides en ciertas fases circadianas, por ej. el día subjetivo.

Investigación apoyada por los proyectos: Fundación Gonzalo Ríos Arronte, INP-2040 Y SEP-CONACYT 2004-CO1-47804.