RIDAA
Repositorio Institucional
Digital de Acceso Abierto de la
Universidad Nacional de Quilmes

Universidad
Nacional
de Quilmes

Casiraghi, Leandro Pablo

Caracterización de un modelo novedoso de desincronización circadiana y sus consecuencias sobre el metabolismo

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:
Casiraghi, L. (2018). Caracterización de un modelo novedoso de desincronización circadiana y sus consecuencias sobre el metabolismo. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/862

Puede encontrar éste y otros documentos en: https://ridaa.unq.edu.ar

Universidad
Nacional
de Quilmes
Roque Sáenz Peña 352 // Bernal
Buenos Aires // Argentina
t.: (+41 11) 4365 7100
f.: (+54 11) 4365 7101
info@unq.edu.ar

Casiraghi, Leandro Pablo, Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto,
Marzo de 2015, 189 pp.,
http://ridaa.unq.edu.ar,
Universidad Nacional de Quilmes, Secretaría de Posgrado,
Doctorado en Ciencias Básicas y Aplicadas

Caracterización de un modelo novedoso de desincronización circadiana y sus consecuencias sobre el metabolismo

TESIS DOCTORAL

Leandro Pablo Casiraghi

leandrocasiraghi@gmail.com

Resumen

Todas las funciones fisiológicas en seres humanos y animales poseen alguna forma de organización temporal a lo largo del día. En mamíferos, el sistema circadiano responsable de la orquestación de los ritmos biológicos del organismo es un sistema complejo que involucra distintos niveles de organización. El reloj central del éste se encuentra en los núcleos supraquiasmáticos del hipotálamo (NSQ), una estructura de decenas de miles de neuronas que es el marcapasos principal capaz de organizar el funcionamiento conjunto del sistema circadiano. La “puesta en hora” de los NSQ se produce mediante el procesamiento de la información lumínica del entorno, principalmente, de la luz solar. A los seres humanos (animales diurnos si los hay), la vida moderna nos presenta numerosos desafíos para el funcionamiento normal del sistema circadiano. La cantidad de personas que debe desarrollar tareas y funciones en horarios poco naturales, en esquemas de turnos rotativos o nocturnos, ha ido creciendo progresivamente en los últimos 50 años, y los problemas de salud asociados a este fenómeno no han tardado en aparecer. Tanto en estudios epidemiológicos en distintos ámbitos laborales como en condiciones experimentales en el laboratorio con modelos animales, se han descrito numerosos y variados efectos de la alteración de la función circadiana sobre la salud orgánica y mental. Una de los modelos de estrés del sistema circadiano mejor caracterizado es la que se denomina jet lag, que se produce frente al cambio abrupto en la fase del ciclo de luz diario que sufre una persona al volar a través de uno o más husos horarios.

Experimentalmente, se puede simular un evento de jet lag en el laboratorio mediante el adelanto o retraso de algunas horas en el esquema de iluminación al que se someten los animales bajo estudio.

En esta tesis nos pusimos como objetivo el desarrollo y caracterización de un modelo de alteración del sistema circadiano en ratones C57Bl/6 a través un jet lag experimental crónico (JLC). En el Capítulo I describimos cómo un protocolo de avances crónicos de ciclo de luz-oscuridad (LO) de 6 horas cada dos días produce en ratones lo que se conoce como desincronización forzada de los ritmos de actividad locomotora general, un fenómeno en el que se aprecian dos ritmos independientes: uno que se ajusta a la luz ambiente, y otro que continúa de forma independiente. La desincronización forzada en estos animales puede observarse también a nivel de los ritmos de temperatura. En base a estos resultados desarrollamos un modelo matemático del sistema circadiano que nos permitiera explicar el comportamiento observado, y más tarde logramos comprobar algunas de las predicciones de éste en el laboratorio. Además, describimos variables que pueden prevenir la aparición de la desincronización forzada, como la adición de una rueda a la jaula o la implementación de retrasos del ciclo de luz en vez de adelantos. Nuestro modelo y los experimentos realizados nos permiten proponer una teoría original acerca de la sincronización del sistema circadiano a los protocolos de JLC, agregando importancia teórica al trabajo presentado en este capítulo.

En el Capítulo II, nos dedicamos a caracterizar particularmente el efecto que pudiera tener la desincronización provocada por el JLC sobre la función metabólica. Pudimos comprobar que bajo el procotolo de JLC previamente estudiado los ratones C57Bl/6 aumentan anormalmente de peso respecto a animales controles. Este mayor aumento puede verificarse muy rápidamente luego del comienzo del JLC y continúa luego de los más de 80 días durante los cuales monitoreamos a los animales. El aumento anormal de peso bajo JLC se ve acompañando por alteraciones metabólicas a nivel tisular, celular y plasmático que se acentúan sensiblemente durante el segundo mes bajo el protocolo. Comprobamos también que otros protocolos de JLC que previamente habían demostrado no producir desincronización, como con la inclusión de una rueda o los esquemas de retrasos, no produjeron modificaciones en la tasa de aumento de peso. Estos experimentos sugieren una correlación entre la desincronización forzada previamente descrita con el aumento de peso elevado en ratones C57Bl/6. Tampoco pudimos detectar un aumento anormal de peso cuando los ratones fueron alojados en grupos de 3 o 4 animales.

En resumen, los resultados presentados en esta tesis presentan un nuevo modelo de desincronización forzada a través de jet lag crónico en ratones C57Bl/6. Este modelo no sólo se presta como una herramienta novedosa para el estudio de los mecanismos de adaptación del sistema circadiano a los cambios del ciclo de luz-oscuridad (tal como en las simulaciones matemáticas que presentamos en el primer capítulo), sino como un excelente escenario en que evaluar las alteraciones sobre el organismo producidas por el estrés sobre los ritmos biológicos. En este sentido, hemos comenzado con el estudio de los disturbios sobre el metabolismo provocados por la desincronización, aportando en consecuencia un modelo novedoso de los graves trastornos metabólicos observados en seres humanos bajo condiciones adversas para la función circadiana normal.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

TRABAJO PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS BÁSICAS
Y APLICADAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE QUILMES

"Caracterización de un modelo novedoso de desincronización circadiana y sus consecuencias sobre el metabolismo"

Autor: Lic. Leandro Pablo Casiraghi

Director: Dr. Diego Golombek

Laboratorio de Cronobiología

Departamento de Ciencia y Tecnología

Universidad Nacional de Quilmes

2015

A los incondicionales

Índice

		Pág.
Resumen		3
Prefacio		9
Introducción	*Los ritmos biológicos*	15
	El sistema circadiano de mamíferos	42
	Ritmos biológicos y salud en humanos y animales	75
	Referencias	83
Capítulo I:		
Desincronización forzada en un modelo de jet-lag crónico en ratones		
	Objetivos	89
	Materiales y métodos	89
	Resultados	99
	Discusión	118
	Resumen final	129
	Referencias	130
Capítulo II:		
Estudio de variables metabólicas en el modelo de desincronización por jet lag crónico		
	Objetivos	135
	Materiales y métodos	135
	Resultados	142
	Discusión	154
	Resumen final	162
	Referencias	164
Conclusiones finales		167
Anexo		175
Agradecimientos		185

PREFACIO

Reflexión obligada acerca de El Tiempo

¿Qué es *El Tiempo*? No hay tesis en cronobiología que pueda prescindir de unas palabras preliminares acerca de esta cuestión trascendental. No pienso arriesgar una respuesta a tal pregunta o siquiera repasar el vasto número de teorías (científicas o filósóficas) que se han propuesto a lo largo de la historia. ¿Es el tiempo sólo una dimensión del Universo por la cual nos vemos transportados, irremediablemente?¿Está cuantizado el tiempo? ¿Es cíclico, tal como tantos mártires han sostenido? ¿Es nuestra vida el sueño de un cerebro flotando en el laboratorio de un científico sexópata?[1] No me permito mayores reflexiones acerca de todo esto excepto, claro, acerca de la cuestión del cerebro flotante, que me resulta fascinante.

Sin embargo, voy a permitirme una pequeña consideración acerca de una de las escasas y precarias certezas que tenemos acerca del Tiempo. Como lo atestiguan mis cada día más numerosas canas y los agujeros en la memoria, *El Tiempo pasa*. Si hay algo de lo que no dudamos, lamentablemente, es que el tiempo pasa mucho más rápido de lo que nos gustaría.

La noción ordinaria acerca del paso del tiempo es que mientras que los lapsos de aburrimiento se alargan insoportablemente, los intervalos en los que nos divertimos y somos felices avanzan con una fluidez pasmosa. Sin embargo, en retrospectiva, las cosas son bastante distintas. En "La Montaña Mágica", Thomas Mann dice que los períodos de mayor movimiento, de sorpresas y alegrías, son percibidos como largos y llenos; los largos períodos de

---

[1] Probablemente no viene al caso, pero es una de mis teorías preferidas. Revisar la imprescindible película "La venganza del sexo/The curious Dr. Humpp" (1969) de Emilio Vieyra.

inactividad, de tedio y de rutina, pasan volando: cada día que transcurre es igual al anterior y al que vendrá luego, y cuando miramos el calendario, ha transcurrido un mes, un año, o más. La vida, y en particular la vida del tesista de doctorado, es un ida y vuelta entre ambos estados, de forma impredecible mayormente, y cuando se llega a *este* momento (el de encontrarse frente a la primer página en blanco de su bienamada u odiada tesis), resulta difícil estimar si el tiempo transcurrido fue corto o largo, o ninguna de las dos.

Resulta entonces más sencillo, y más agradable, pensar en qué fue lo que dejó ese tiempo, y no tanto en cuán largo fue. Y de que dejó cosas, más rápida o más lentamente, de eso sí estoy seguro: amigos del alma acá y afuera, anécdotas y chismes de todo tipo y color, miles de fotos de viajes (pocas de trabajo), novedosas recetas de tragos, moretones de paleta y un crecimiento profesional y fundamentalmente personal invaluable.

Quizás "el tiempo" sea aquello que debemos invertir a cambio de semejantes tesoros.

INTRODUCCIÓN

Introducción

I) Los Ritmos Biológicos

Eppur si muove: el origen natural de los ritmos biológicos.

El planeta Tierra, como bien sabemos, no se encuentra estático en el conjunto que forma con el resto de sus compañeros en el Sistema Solar, sino que desarrolla diversos movimientos con una periodicidad implacable. La Tierra tiene movimientos intrínsecos, los cuales incluyen la *rotación* alrededor de su propio eje y el conjunto de los que modifican la inclinación y posición del mismo. También se traslada alrededor de la estrella que llamamos Sol, en una forma elíptica descrita por Kepler hace 250 años, a través de un movimiento denominado justamente *traslación*, que además modifica su posición con respecto al resto de los planetas. A su vez, el único satélite natural de la Tierra, La Luna, tiene su propia traslación alrededor de nuestro planeta. Como si fuera poco, el Sistema Solar orbita alrededor del núcleo de nuestra galaxia Vía Láctea, y la Vía Láctea dentro del cúmulo de galaxias locales, y el cúmulo de galaxias locales... En fin, realmente nada en el Universo está quieto, como bien deben haber intuido Copérnico y Bruno hace mucho tiempo.

La mayoría de estos movimientos (se podría discutir que todos ellos) tienen efectos significativos sobre la superficie y la atmósfera de nuestro planeta, y en consecuencia, sobre el ambiente en el que se originaron y subsisten los organismos vivos. Particularmente hay tres entre ellos que debido a su relativa frecuencia y la repetitividad de sus efectos son sumamente importantes a lo

largo de las (astronómicamente hablando) cortísimas vidas que nos corresponde vivir al conjunto de los seres vivientes. El movimiento de *rotación* genera variaciones en el ambiente debidas a la presencia o ausencia de la radiación solar, con un período de 24 horas: luz y oscuridad, diferencias de temperatura, incidencia de luz UV, y una larga lista de etcéteras. La *traslación* se hace evidente a través de los cambios climáticos asociados a las estaciones climáticas que se suceden una y otra vez cada aproximadamente 365,25 días.[1] La propia traslación de la Luna alrededor de la Tierra genera los ciclos lunares con un período de 28 días. Por último, y quizá de forma no tan evidente para quienes no tenemos un contacto cotidiano con el mar, el efecto gravitatorio combinado sobre las grandes masas de agua del Sol y la Luna girando alrededor de la Tierra, provoca el conocido fenómeno de las mareas.

No debería sorprendernos, entonces, que a lo largo de los millones de años de evolución de los organismos vivos hayan aparecido y luego sido perfeccionados mecanismos fisiológicos para predecir y adaptarse a estos diversos cambios ambientales cíclicos: hablamos, señores, de los *Ritmos Biológicos*. Los ritmos biológicos están presentes en todos los reinos de la naturaleza y en todos los niveles de organización, desde la bioquímica más básica hasta los patrones de comportamiento animal más sofisticados. Véase la Figura 1.1 para apreciar la variedad de ritmos presentes en la naturaleza.

[1] En rigor, el movimiento de traslación por sí mismo no es responsable de la variación de las estaciones. El segundo factor indispensable es la inclinación del plano del ecuador terrestre con respecto al de la elíptica (actualmente de 23,5º) que permite que el ángulo de incidencia la radiación solar sobre las distintas partes del globo varíe a lo largo del año. Si éstos fueran perfectamente paralelos, no podríamos disfrutar de la romántica primavera, el libertino verano, el reflexivo otoño y el desafiante invierno.

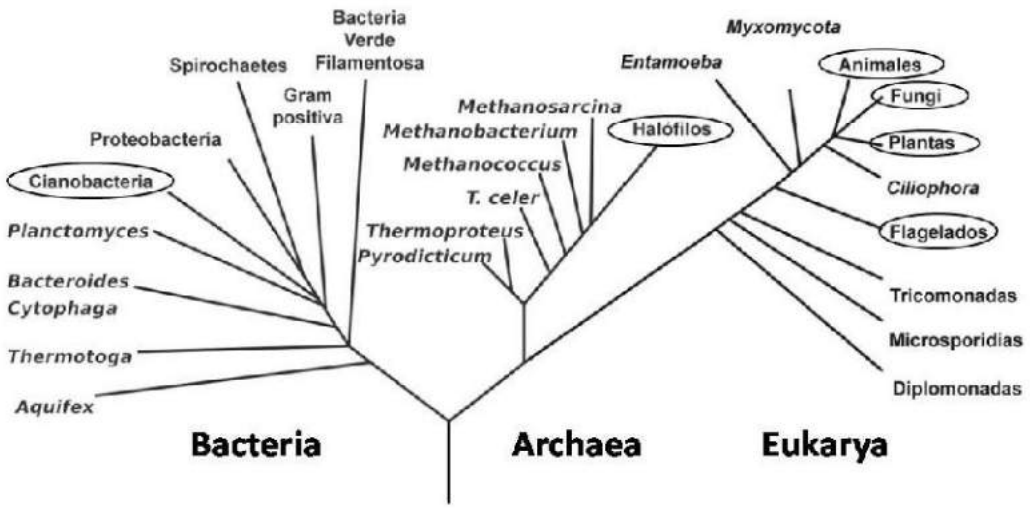


Figura 1.1 – Existencia de ritmos circadianos en organismos pertenecientes a los tres dominios. *Árbol filogenético donde se describen las subdivisiones de cada uno y se señala con un círculo en cuáles se han hallado ritmos circadianos.*

Pone una planta a la sombra y se hace famoso sin saberlo: el nacimiento de la Cronobiología.

Si bien sabemos que los antiguos griegos (¡cuándo no!) tenían conocimiento de algunos fenómenos biológicos asociados con el perpetuo ciclo del día y la noche, o de la luz y la oscuridad, hubo que esperar unos dos mil años para que alguien más se los tomara en serio y decidiera estudiarlos con un poco más de atención.

El primer experimento cronobiológico de la historia se lo debemos al astrónomo francés Jean Jacques d'Ortous de Mairan, allá por el año 1729. Según sabemos a partir del relato que su amigo y botanista Jean Marchant publicara posteriormente, de Mairan tomó nota de los movimientos periódicos de las hojas de la *Mimosa pudica* que adornaba su observatorio y se vio vivamente

interesado por el fenómeno. Durante el día las hojas de la Mimosa permanecían abiertas, mientras que a la noche se cerraban invariablemente. La cuestión que de Mairan se planteó resolver entonces fue la siguiente: ¿era el movimiento de las hojas de la planta un efecto directo de la acción de la luz solar, o existía otro mecanismo responsable del mismo? De Mairan no lo pensó en estos términos pero la pregunta fundamental detrás del experimento, y de la proto-ciencia que así inauguraba, era si la planta poseía o no un reloj biológico intrínseco que controlara el movimiento diario de sus hojas.

El experimento que diseñó, y que sigue siendo emulado hoy a más de 300 años de distancia, consistió en colocar a la planta dentro de un gabinete en su sótano, donde no pudiera recibir luz natural, y una vez allí verificar el estado de apertura o clausura de las hojas a lo largo de día. Las observaciones comprobaron sus sospechas: las hojas seguían abriéndose y cerrándose durante el día y la noche, respectivamente, a pesar de que la planta no pudiera "ver" el Sol (Figura 1.2). A pesar de tan revelador hallazgo, de Mairan no quedó enteramente convencido de lo que implicaba y asignó el resultado a otros factores, como la variación diaria de la temperatura ambiente o del campo

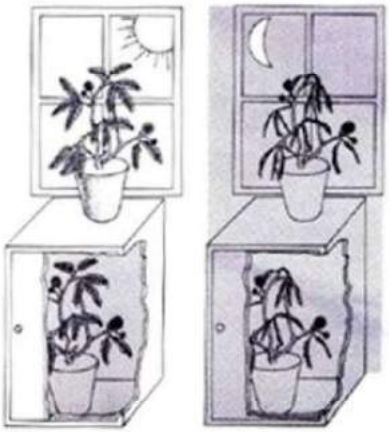


Figura 1.2 – El experimento clásico de De Mairan. *De Mairan colocó su planta de Mimosa púdica en un gabinete a cubierto de la luz solar y verificó que la apertura y clausura de sus hojas seguían el curso del día y la noche. De esta forma realizó un experimento cronobiológico fundacional en condiciones que hoy conocemos con el nombre de "libre curso".*

magnético terrestre, y así fue como sus experimentos quedaron inéditos hasta su publicación por el mentado Marchant, quien así vendría a ser a de Mairan lo que Max Brod a Kafka, salvando las distancias. Otro francés, Henri-Louis Duhamel du Monceau, retomó con mayor dedicación y sofisticación los experimentos de de Mairan, obteniendo idéntica mínima repercusión.

Unos cien años más tarde, un botánico suizo llamado Augustin Pyramus de Candolle, basándose en las observaciones de de Mairan y de algunos otros para quienes sus resultados no habían pasado desapercibidos, realizó una serie de experimentos que fortalecerían la idea, todavía en pañales, de la existencia de relojes biológicos endógenos en los organismos vivos. En un experimento análogo al de de Mairan, de Candolle midió el período del ritmo de apertura y clausura de las hojas de *M. pudica* en condiciones de luz constante (lo cual le facilitaba mucho las cosas en la práctica), y encontró que el mismo tenía un período que variaba entre las 22 y 23 horas. El hecho de que el este período fuera tan distinto a las 24 horas de duración del día solar indujo a de Candolle a plantear, con toda lógica, que dicho ritmo no podía estar regido por ninguna variación periódica ambiental diaria y que debía existir un mecanismo intrínseco (es decir, un reloj biológico endógeno) responsable de dichos ritmos. No mucho tiempo después el mismísimo Darwin sugeriría que el movimiento de las plantas seguía un ritmo gobernado por mecanismos intrínsecos a las mismas.

A pesar de semejante descubrimiento, la aceptación de la existencia de auténticos relojes biológicos en la naturaleza no fue aceptada ampliamente en la comunidad científica, y no fue hasta las primeras décadas del siglo XX, con los trabajos de Erwin Bunning en plantas, y de Maynard Johnson en mamíferos

que la idea se estableció definitivamente dentro de las ciencias biológicas. Sus experimentos, controlados y precisos, comprobaron que los ritmos en condiciones constantes de sus modelos de estudio diferían significativamente de las 24 horas del día terrestre. Volveremos a este punto más adelante, cuando describamos las características fundamentales de los ritmos circadianos.

Hacia la mitad del siglo XX, ya existían en el mundo numerosos laboratorios interesados en el estudio de los ritmos biológicos en diversas especies y condiciones, entre ellos, los dirigidos por tres grandes científicos responsables de la fundación de la cronobiología como disciplina científica moderna y de cuyo trabajo hablaremos más adelante: Jurgen Aschoff en Alemania, Colin Pittendrigh y Franz Halberg, ambos en los Estados Unidos. A pesar del creciente cuerpo de conocimientos, y de investigadores, que se iba generando en el área, hacía falta todavía unificar conceptos, desarrollar una terminología específica y métodos de análisis estandarizados; en resumen, una actualización general y una puesta en común del estado actual de una ciencia que estaba todavía estaba en gestación.

El nacimiento "oficial" de la Cronobiología como ciencia moderna se produce en el año 1960, cuando se celebra el Simposio Anual de Cold Spring Harbour en Biología Cuantitativa en Relojes Biológicos, el primero en reunir a los investigadores de todo el mundo, y en el que se pusieron en común los conceptos centrales, se establecieron las principales incógnitas por resolver y también, como era inevitable, se generaron las principales controversias de esta nueva ciencia.

A partir de ese momento, nuestra comprensión acerca de la naturaleza y el

funcionamiento de los sistemas circadianos encontrados en incontables especies ha crecido abrumadoramente, tanto "hacia adentro", en la descripción de sus mecanismos fundamentales, como "hacia afuera" en lo que se refiere a las numerosas interacciones de los mismos con el resto de los sistemas y aparatos fisiológicos. Más adelante retomaremos este recuento histórico, y nos ocuparemos de algunos temas específicos importantes en el marco de esta tesis. Para un recuento ameno y entretenido de la historia de la Cronobiología, recomiendo el libro de Russell Foster y Leon Kreitzman "Rhythms of life" (Foster & Kreitzman, 2004).

¿Ritmos biológicos? ¿No es más fácil mirar por la ventana?

"Sun, Sun, Sun / here it comes"
George Harrison, *"Here comes the Sun"*

Hasta ahora hemos eludido hábilmente algunas preguntas que deben estar molestando al lector desde la primera página de esta tesis. ¿Para qué sirven los ritmos biológicos? ¿Y, en todo caso, para qué es necesario un *reloj* biológico? ¿No alcanza con fijarse si es de día o de noche, y actuar en consecuencia? Intentemos, entonces, convencer al lector acerca de la importancia de los ritmos biológicos y los sistemas que los generan, y ahuyentemos sus sombras de duda acerca del sentido de este trabajo.

Recordemos primero la famosa frase de Thedodosius Dobzhansky: "En biología nada tiene sentido, si no es a la luz de la evolución". Por supuesto, los fenómenos asociados a los ritmos biológicos no pueden escapar a esta máxima. Los cambios en el ecosistema producidos por los diversos movimientos astronómicos de los que hablamos al principio de esta

Introducción presentan incontables desafíos y oportunidades para los organismos vivos que los experimentan. Un ser vivo está expuesto a cambios que pueden ser puramente medioambientales, como por ejemplo, la alternancia entre temperaturas altas y bajas, o bien relativas al resto de los organismos con los que convive, que pueden determinar por ejemplo la presencia o ausencia de un depredador peligroso, o la disponibilidad de un tipo particular de alimento.

Resulta lógico pensar que un organismo que logra agrupar los períodos de mejor predisposición a la actividad física, de eficiencia metabólica, y de mayor capacidad cognitiva y de alerta en los momentos en los que debe proveerse de alimento o salir a la intemperie, y que en los momentos en que el entorno le resulte adverso, esté a salvo disminuyendo su actividad y reponiendo energías, tendrá mayor éxito frente a otro que simplemente organice sus funciones de forma aleatoria durante el día. De la misma manera, una especie que concentre su período de nacimientos en períodos del año apropiados tendrá mayor eficiencia reproductiva que una especie similar que distribuya sus nacimientos indistintamente a lo largo del año. En resumen, poseer ritmos biológicos adaptados al entorno en el que los organismos se desarrollan representa una ventaja adaptativa para la supervivencia y éxito de la especie.

Ahora, ¿cuál sería la necesidad de poseer un sistema endógeno que controle los ritmos biológicos? Podría pensarse que le alcanzaría al organismo con ser capaz de detectar los cambios ambientales y rápidamente ajustarse a los mismos, especialmente cuando para prevenirlos probablemente se requiera el desarrollo de un sistema complejo y costoso. Una respuesta rápida viene del sentido común: *más vale prevenir que curar*. Un organismo capaz de prever un

cambio ambiental cíclico siempre estará más preparado que aquél que esté aguardando dicho cambio para adaptarse a él. Este último correrá siempre el riesgo de adaptarse *un poco demasiado tarde* para que no se lo coma otro, o para que sus crías resistan un descenso abrupto de la temperatura, por ejemplo.

El conjunto de procesos fisiológicos (genéticos, hormonales, etcétera) necesarios para la adaptación a los cambios ambientales requiere un tiempo considerable y una organización precisa para que ésta sea exitosa. La presencia de un sistema endógeno (un *reloj biológico*) capaz de gobernarlos en tiempo y forma, gracias a su capacidad de predecir los cambios del ambiente antes de que se produzcan, representa una ventaja adaptativa mayor. La segunda razón, derivada de lo anterior, que justifica la necesidad de un reloj maestro y el sistema que éste controla, tiene que ver con la orquestación de los distintos ritmos del organismo. Las adaptaciones fisiológicas a los cambios ambientales son numerosas y a distintos niveles biológicos, y no necesariamente conviven en momentos de día idénticos (es decir, no coinciden sus *fases*, un concepto que veremos en breve), por lo que es indispensable un sistema capaz no sólo de controlar una variedad de ritmos grande, sino también de hacer que éstos conserven una organización temporal estricta.

Bien, esperamos haber podido convencer al lector de que los ritmos biológicos y los relojes endógenos que los controlan representan desarrollos evolutivos de altísimo valor adaptativo, y que tienen importancia en prácticamente todos los niveles de la organización fisiológica. Habiendo al menos tratado de despejar estas dudas, continuemos con nuestra introducción específica al mundo de los ritmos circadianos.

Entrando en ritmo: propiedades descriptivas de los ritmos biológicos.

Ante todo, definamos primero formalmente *qué* es puntualmente un ritmo, para luego poder enfocarnos cómodamente en *cómo* son y *cómo se analizan* los ritmos biológicos.

En pocas palabras, un ritmo es un proceso que se repite cíclicamente con una periodicidad determinada. Puesto en términos matemáticos, podría decirse que se trata de una función que repite un comportamiento equivalente (no necesariamente el alcance de un valor específico, pero sí un desarrollo de su pendiente) cada cierto intervalo de tiempo estable. Ejemplos sencillos serían el ritmo descripto por la función que define la intensidad de la luz natural en un cierto punto de la Tierra a lo largo del día, o la función que define la distancia de la Tierra al Sol en un año.

Para describir sintéticamente un ritmo en particular, nos alcanza con tres parámetros que lo definen adecuadamente. El intervalo necesario para completar un ciclo completo se denomina *período* (*tau*) del ritmo, y es el inverso de la *frecuencia* del mismo. En los ejemplos anteriores, el ritmo de intensidad de la luz sobre un punto de la Tierra tiene un período de 24 horas, mientras que el ritmo de la distancia entre nuestro planeta y el Sol tiene un período aproximado de 365 días.

La diferencia entre los valores medio y máximo de la variable se denomina *amplitud* e indica qué tan importante es la variación presentada por el ritmo. Por ejemplo, la excentricidad de la órbita de Plutón alrededor del Sol determina que la amplitud de la función que define la distancia entre ambos tenga una amplitud mucho mayor a la que presentan los planetas gigantes como Neptuno

o Urano que poseen órbitas más "redondas". La amplitud del ritmo diario de intensidad lumínica en un punto sobre el Ecuador es mucho mayor que la observada en un punto cercano al Polo Sur.

El momento, de acuerdo a un marco de referencia temporal, en que se produce un evento específico del ritmo se denomina *fase* (usualmente indicado con la letra griega φ). Por ejemplo, la fase de la mayor intensidad lumínica sobre un punto en la Tierra se produce a las 12 del mediodía (de acuerdo al marco de referencia-*hora reloj*), mientras que la fase de la menor distancia entre la Tierra y el Sol se produce durante el verano austral (de acuerdo al marco de referencia-*estaciones climáticas*). En la Figura 1.3 se ilustra de forma gráfica

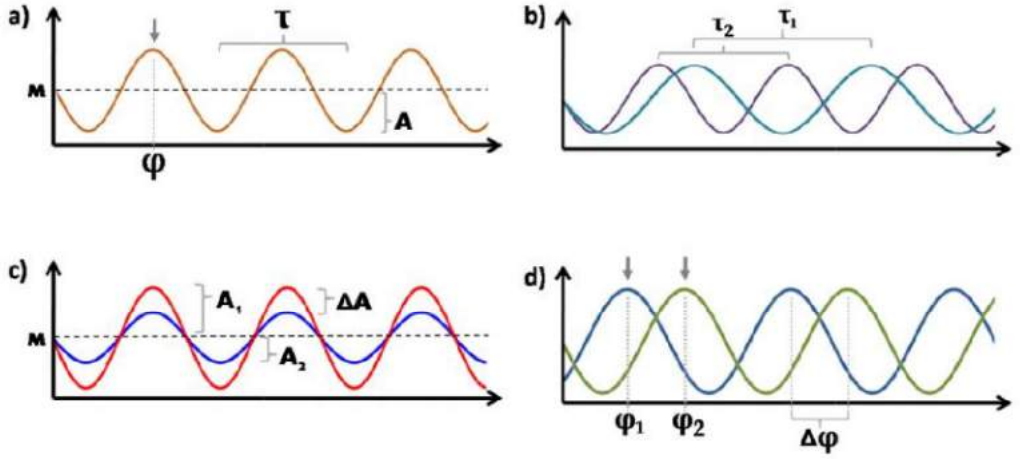


Figura 1.3 – Características descriptivas de un ritmo biológico. a) *Representación gráfica de un ritmo de forma sinusoidal del que se indican su mesor, su período, su amplitud y su fase.* ***b)*** *Comparación entre dos ritmos de distintos períodos.* ***c)*** *Comparación entre dos ritmos de distinta amplitud.* ***d)*** *Dos ritmos con una distinta fase. La relación de fases es justamente la diferencia temporal entre las mismas. Si se tratara de la representación de un mismo ritmo antes y después de un cierto evento, podríamos hablar de un cambio de fase en dicho ritmo.*

matemática un ritmo sencillo de forma sinusoidal, y se indican los tres parámetros que lo definen: *período*, *amplitud* y *fase*.

Cabe resaltar que las tres características pueden utilizarse para describir tanto a los ritmos biológicos que estemos estudiando como a un ciclo ambiental o experimental externo bajo el que se realice una observación, ya que el mismo no es más que un ritmo como cualquier otro, con su período (en el caso de un ciclo ambiental, T), amplitud y fase.

A los bifes: los ritmos circadianos.

Dentro del abanico de los ritmos biológicos, existe una clasificación principal general basada en el período que exhiben los mismos. Los ritmos *circadianos* (del latín *circa diem*, cercano al día) son aquellos que tienen un período de alrededor de 24 horas, y tienen su origen en los cambios ambientales asociados al movimiento de rotación de la Tierra. Los ritmos *infradianos* son aquellos que exhiben períodos superiores a las 24 horas y son originados principalmente por los movimientos celestes de menor frecuencia, como la traslación terrestre y la órbita lunar. Los ritmos *ultradianos* tienen períodos menores a las 24 horas. En la Tabla 1 se indican ejemplos de ritmos biológicos observados en cada uno de estos grandes grupos. En esta tesis nos centraremos en los ritmos circadianos, y a partir de este punto nos referiremos exclusivamente a éstos.

Los ritmos biológicos que se originan por cada uno de los fenómenos cíclicos ambientales pueden observarse tanto al nivel individual y grupal (ritmos de actividad, alimentación, hormonales), como al nivel de la especie (tasa de

Tabla 1.1 – Ritmos biológicos clasificados de acuerdo a su período.

Clasificación	*Ritmo observado*	*Período*
Ultradiano	Frecuencia cardíaca	0,75 segundos
	Liberación de hormonas	
	Estadíos del sueño	90 -120 minutos
Circadiano	Sueño-vigilia	
	Melatonina	*Circa* 24 horas
	Glucemia	
Infradiano	Ciclo menstrual	28 días
	Hibernación	1 año

crecimiento poblacional y reproducción, ritmos de muerte o nacimientos). Los ritmos al nivel de especie pueden observarse en fenómenos que por su naturaleza no se presentan de forma rítmica en un individuo, o que se ajustan a un cambio ambiental que no llega a ser experimentado por el mismo debido a la longitud de su sobrevida, sino por la especie en conjunto.

Los ritmos circadianos, como se mencionó más arriba, comparten la propiedad de desarrollarse con un período que se encuentra dentro de la escala de las 24 horas, y que se originan como consecuencia de los cambios ambientales producidos por la rotación terrestre alrededor de su eje.

La importancia fundamental de los ritmos circadianos dentro de la organización biológica implica una complejidad que los distingue de otros ritmos y procesos fisiológicos. El canon establece que un reloj circadiano, y en consecuencia los ritmos que éste genera, deben cumplir con tres propiedades fundamentales:

1) Poseer un período en ausencia de estímulos ambientales cíclicos (en *libre curso*) cercano, pero ligeramente distinto, a las 24 horas, y una ligera variación interindividual. De ahí el término *circadiano* (*circa diem*, “cercano a un día”),

acuñado por Franz Halberg en los años 50. Si un ritmo, en un entorno supuestamente libre de sincronizadores ambientales, tuviera un período idéntico a las 24 horas, y se repitiera en cada uno de los individuos estudiados en una especie, cabría afirmar que se encuentra dominado por algún sincronizador ambiental no detectado. De hecho fue esta la hipótesis que retrasó considerablemente la aceptación general de la idea de ritmos biológicos endógenamente generados, asignando a factores exógenos difíciles de controlar (como el campo magnético terrestre) la responsabilidad por los ritmos reportados. Como ya indicamos más arriba en nuestra introducción histórica, los experimentos fundacionales de Candolle, primero, y Bunning, más tarde, con plantas y de Pittendrigh con *Drosophila* demostraron ritmos en libre curso con períodos variables y ligeramente distintos a las 24 horas y terminaron de probar la existencia de ritmos generados endógenamente.

La descripción de un ritmo circadiano debe hacerse en condiciones de libre curso, debiendo además establecerse las características del libre curso (por ejemplo, si se utilizaron condiciones de oscuridad o luz constante). Cuando describimos un ritmo presente bajo condiciones cíclicas de un *zeitgeber*, debemos hablar en principio de un ritmo *diario*, hasta que pueda demostrarse que la variable en cuestión pueda mantener un ritmo en condiciones constantes, luego de lo cual podremos hablar de un ritmo circadiano. La distinción se realiza porque las características de un ritmo particular en general difieren entre ambas condiciones (e incluso, por motivos que no vienen al caso ahora, en distintas condiciones de libre curso), y principalmente además porque existen variables que muestran ritmos diarios que no necesariamente se mantienen en condiciones constantes.

2) Ser factibles de ser sincronizados por un estímulo ambiental de período cercano a las 24 horas. ¿Cuál sería la utilidad de un reloj biológico incapaz de adaptarse a los cambios de su entorno? Como ya hemos dicho, no alcanza con *tener ritmos*, sino que es esencial la correcta organización temporal de los mismos. La fase de un ritmo debe conservar una relación estable (y adecuada) con la fase del estímulo sincronizador. En la naturaleza, el ciclo de luz y oscuridad es el estímulo más importante en lo que a sincronización de los ritmos biológicos se refiere, si bien existen otros de relativa importancia de acuerdo a la especie estudiada. Todos los factores cíclicos capaces de sincronizar un reloj circadiano son conocidos en la jerga de la cronobiología como *zeitgebers* (término introducido por Jurgen Aschoff; del alemán, "dadores de tiempo"), y son generalmente utilizados como marcadores temporales de las fases de los ritmos estudiados.

3) Estar compensados frente a los cambios de temperatura. El período de un ritmo debe mantenerse relativamente constante a pesar de posibles cambios en la temperatura ambiente. Esto es especialmente fundamental para los organismos ectotérmicos, hongos, plantas, o bacterias, incapaces de controlar la temperatura de su medio interno. Por convención, se dice que el valor de Q_{10} del período un ritmo (el cambio en el período producido por una variación de 10 grados Celsius en la temperatura) debe estar entre 0,90 y 1,10.

Este último punto ha sido, y lo sigue siendo hasta el día de hoy, uno de los puntos más controversiales dentro de la cronobiología. Como sabemos, todas las reacciones biológicas varían su velocidad rotundamente de acuerdo a la

temperatura en la que se producen (aproximadamente, la velocidad se duplica cada 10º de aumento), por lo que es difícil explicar cómo pueden existir sistemas biológicos capaces de compensar tan eficientemente abruptos cambios de temperatura. Frank Brown Jr. fue uno de los mayores opositores a la hipótesis establecida mayoritariamente en el Simposio de CSH que establecía la existencia de relojes endógenos compensados por temperatura, aduciendo con cierta razón que no existían experimentos fehacientes que lo comprobaran. Peor aún, los experimentos realizados hasta el momento indicaban completamente lo contrario. Algunos años más tarde, comenzaron a aparecer reportes de ritmos biológicos en distintas especies compensados ante cambios de temperatura, y lo que en un principio era una hipótesis acerca de la naturaleza de los relojes biológicos se vio finalmente convertida en un hecho comprobable. Sin embargo, cincuenta años después, la cuestión acerca de los mecanismos a través de los cuales los relojes circadianos consiguen compensar los cambios de la temperatura ambiental sigue sin resolver.

¿Actogramas? ¿Y eso con qué se come?

"Mide lo que sea medible y haz medible lo que no lo sea"
Atribuido a Galileo Galilei (posiblemente apócrifa)

Para poder avanzar en nuestra introducción a la Cronobiología y el estudio de los ritmos biológicos, necesitamos ahora detenernos momentáneamente en el desarrollo teórico para enfocarnos en cuestiones metodológicas de análisis indispensables para el camino que nos queda por delante.

Para poder describir cuali-cuantitativamente sus modelos de trabajo, los cronobiólogos emplean herramientas de análisis que si bien no son exclusivas

están particularmente indicadas para el estudio y la descripción de los ritmos biológicos. La mayor parte de ellas trabajan sobre la *serie temporal de datos* derivados de la práctica experimental. Una serie temporal de datos no es otra cosa que una sucesión de los valores que adquiere una variable bajo estudio ordenados cronológicamente. La serie se caracteriza por su frecuencia de muestreo, que es el intervalo de tiempo (ya sea fijo, o más raramente, variable) que separa cada una de las determinaciones experimentales, y que debe estar calculada de acuerdo al período de los fenómenos que se pretenden describir. El ejemplo clásico, y del cual encontraremos un caso en esta tesis, es el registro de la actividad locomotora en rueda de un roedor, en la que se utiliza un sensor capaz de medir las revoluciones individuales de la rueda que se producen cada *x* minutos. El resultado de dicho protocolo será una serie de *datos-revoluciones* obtenidos con una frecuencia de muestreo de *x* minutos. Es importante establecer que la frecuencia de muestreo determina finalmente cuál es nuestra precisión en las determinaciones que realicemos posteriormente, por lo cual debemos definirla *a priori* de acuerdo a nuestras necesidades experimentales.

Cuando necesitamos analizar series temporales de datos que comprenden pocos ciclos de la variable rítmica en estudio, digamos, unos pocos días, resulta práctico graficar la evolución de la misma en un par de ejes cartesianos simple (como en el ejemplo gráfico de un ritmo sinusoide que vimos más arriba). Cuando la serie es corta, la apreciación de un gráfico cartesiano sencillo puede brindar bastante información de forma rápida e intuitiva. Sin embargo, es más frecuente encontrarse con series temporales de datos que cubren muchos días y que permiten un estudio más extenso y a largo plazo de

la variable de interés. En estos casos un gráfico cartesiano resulta inconveniente y muy difícil de interpretar. Por eso es que debemos acudir a métodos especializados para el análisis de series temporales de períodos extensos de tiempo.

Una de las herramientas de aplicación exclusiva en cronobiología, de utilidad tanto cualitativa como cuantitativa, y que se presentará hasta el cansancio en las páginas de esta tesis es el *actograma*. Un actograma es una representación gráfica del comportamiento de una variable (originalmente, pero no exclusivamente, de la actividad locomotora; de allí su nombre) a lo largo de varios días consecutivos. Para confeccionarlo, se realiza un gráfico muy particular a partir de la serie temporal de datos obtenidos en un experimento. Véase la Figura 1.4 para observar de forma esquemática cómo se obtiene un actograma convencional. Cada fila del gráfico representa un día completo (cuya duración puede ser de 24 horas, o de cualquier otro *módulo* que se considere práctico para el caso), representándose la hora del día en el eje horizontal, y el valor alcanzado por la variable en el vertical. El actograma se construye apilando uno debajo del otro en orden cronológico los perfiles diarios de la variable. De esta forma se puede comparar el valor alcanzado por la misma a lo largo de los sucesivos días en horas determinadas. Una variante muy común del actograma simple que suele utilizarse y que permite una más fácil apreciación de la evolución del ritmo es la confección de un *actograma doble*. Éste se construye fácilmente mediante la anexión al gráfico original de una copia exacta del mismo pero desplazada una fila hacia arriba, de forma que en cada nueva fila del actograma doble puedan apreciarse dos días consecutivos, el segundo de los cuales se repite al comienzo de la siguiente fila.

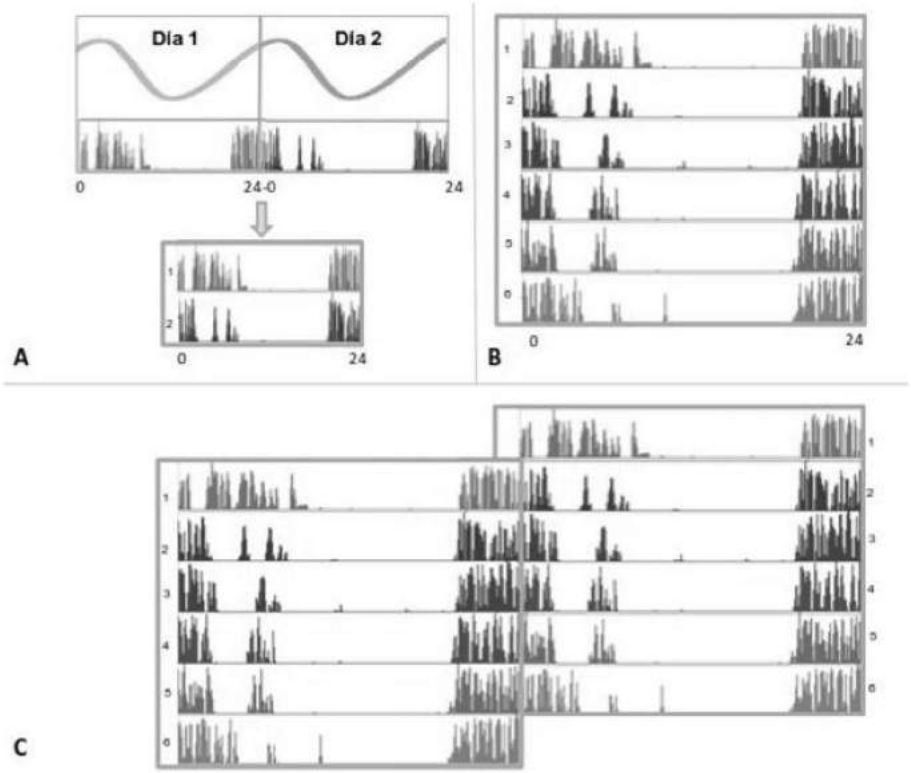


Figura 1.4 – Construcción de un actograma. a) *Típico gráfico de un ritmo representado por una curva sinusoidal y un ritmo de actividad locomotora real, durante dos días. Para la construcción de un actograma se "corta" el día 2 y se pone debajo del día 1.* ***b)*** *Actograma de gráfico simple. Gráfico que se obtiene al hacer lo esquematizado en A con los días sucesivos: con las horas del día en el eje x y días sucesivos en el eje y (cada día está representado con un color diferente).* ***c)*** *Actograma de gráfico doble (double plot). En este caso, se construye un actograma sencillo y luego se coloca "al lado" una copia del mismo de manera que queden desfasados los días. Así, cuando termina el día 1, comienza (al lado) el día dos. De esta manera podemos ver la sección de actividad completa que en el gráfico simple quedaba fragmentada en dos segmentos.*

Un elemento importante que acompaña al actograma es la indicación acerca de las características y marco temporal del ciclo de luz (o el *zeitgeber* que se estudie) a lo largo de los días. Esta indicación se puede realizar de varias formas: con barras por encima o por debajo del actograma, sombreando el

fondo del mismo, o mediante escalas laterales (aunque esta última no permite determinar visualmente la fase del *zeitgeber*).

El actograma permite realizar distintas determinaciones acerca de las características del ritmo estudiado ya sea a simple vista o mediante herramientas cuantitativas de análisis: fases de eventos y cambios en las mismas a lo largo del tiempo, período y posibles cambios en el mismo, evolución de la amplitud, entre otras. La fase de un evento cualquiera del ritmo (inicio o final de la actividad del mismo, o su pico máximo, por poner ejemplos) se puede calcular en un día específico determinando su posición en la fila correspondiente. El período del ritmo graficado se puede evaluar calculando la pendiente que observa alguna fase determinada a lo largo del actograma: cuando el período del ritmo es menor a 24 horas (o al módulo que se utilice para la confección del actograma), lo que veremos es que la fase está ligeramente *adelantada* en cada uno de los días sucesivos (ya que cada día la actividad comienza un poco más temprano); en cambio, si el período es mayor podremos ver un retraso en la fase. La amplitud se puede evaluar de forma más intuitiva comparando los niveles de la variable entre los días y noches sucesivos. La Figura 1.5 muestra cómo puede utilizarse un actograma doble para detectar y cuantificar algunos de los parámetros de un ritmo de actividad locomotora.

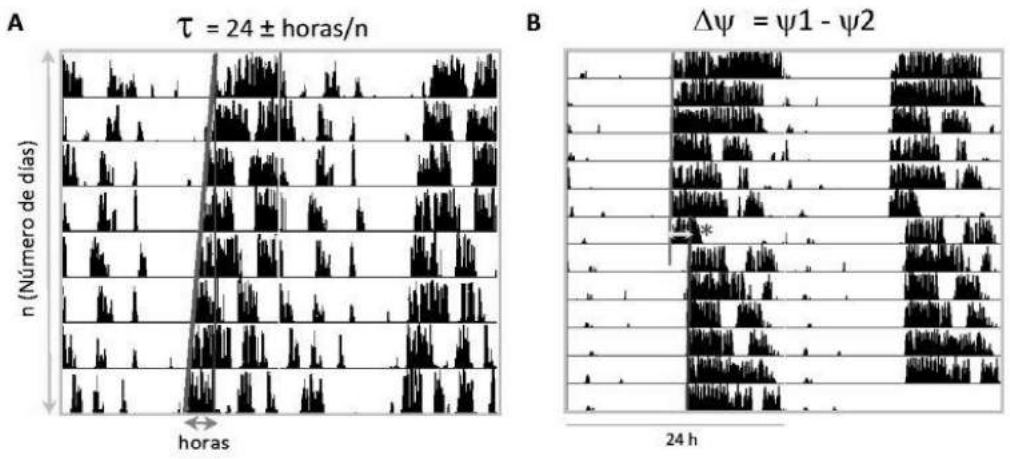


Figura 1.5 – Análisis de parámetros circadianos a partir de un actograma. a) *Medición del período (τ) de un ritmo. Luego de trazar una línea uniendo los onsets, se mide la distancia entre "la hipotenusa" y el cateto mayor del triángulo recto formado. Esa distancia (que forma el cateto menor) corresponde a una cantidad de horas (ya que el eje x consta de 24 h). Si se dividen esas horas por el número de días analizado, obtenemos el valor de horas de diferencia diarias entre el período del actograma (24 h) y el período del animal.* ***c)*** *Medición de cambios de fase (Δψ). En este caso se trazan líneas uniendo los onsets previos y los posteriores, a un estímulo (indicado con el asterisco). La diferencia entre estas dos líneas, medida el día del estímulo (convertida en horas), corresponde a la fase previa "menos" la fase posterior y es lo que denominamos cambio de fase.*

Ahora es un buen momento para retomar en detalle una característica de los ritmos en general que no es necesariamente sencilla de comprender (y que, a pesar de ello, ha sido mentada en abundancia; sepa disculpar el lector), y que con nuestra nueva herramienta podremos encarar con mayor confianza. Se trata de la determinación de la *fase* de un ritmo. Si bien el período y la amplitud son parámetros sencillos de comprender (ya que no dependen de otra cosa que de las características del ritmo), la fase representa un concepto más complejo. Para poder determinar un fase cualquiera en un momento preciso, es necesario contar con un marco de referencia a partir del cual medirla (por

ejemplo, el eje de coordenadas arbitrario en la Figura 1.3). Las referencias temporales pueden estar referidas a parámetros externos, cuando existe un ciclo ambiental bien definido, o un evento agudo (como la administración de una droga o un cierto tratamiento experimental), o intrínsecas al propio ritmo en estudio.

Cuando un ritmo es observado bajo condiciones de luz-oscuridad definidas (como en la primera mitad de la Figura 1.6) o cualquier otro tipo de ciclo ambiental, el marco de referencia puede determinarse fácilmente utilizando los momentos específicos en los que cambian las condiciones de iluminación, que están establecidos de antemano, ya sea experimental o naturalmente. Los momentos en los que la variable ambiental cambia de un estado definido a otro (por ejemplo, de luz a oscuridad), pueden tomarse como puntos de referencia a partir de los cuales medir el resto de las fases. En cronobiología se utiliza un estándar en el que se define cada ciclo de un *zeitgeber* (o de un ritmo *per se*, como veremos más adelante) como un *día circadiano* de 24 *horas circadianas*, independientemente de la duración real del ciclo. Por convención, se define la escala temporal como "hora del *zeitgeber*" ("*zeitgeber* time", ZT), fijando la hora ZT12 (hora del *zeitgeber* 12) al momento del comienzo de la "noche" de la variable, que en el caso del ciclo más utilizado de luz-oscuridad es el momento de apagado de la luz. A partir de ZT12, el resto del ciclo puede ser coordenado a través de la división de su período en 24 "horas circadianas" (que pueden tener una duración mayor o menor a una hora real de acuerdo con el período del ciclo; ver más abajo). En base a este marco de referencia temporal, puede asignarse una fase a cualquier evento a lo largo del ciclo, ya sea relativo al ritmo o por ejemplo a una intervención experimental, de acuerdo a su

coordenada ZT.

Cuando no existe un ciclo ambiental en las condiciones de estudio, es decir, cuando se analiza un ritmo "en libre curso", deben tomarse referencias temporales observables sobre el ritmo bajo estudio. A este marco de referencia temporal definido por eventos intrínsecos del ritmo se lo denomina "hora circadiana" ("circadian time", CT), y también se puede dividir internamente el ciclo en 24 horas circadianas (cuya duración en este caso dependerá del período del ritmo que se estudia). En estos casos, resulta útil dividir esta escala temporal dada por el ritmo en un *día* y una *noche subjetivos*. En el caso más común de los ritmos de actividad locomotora de un animal nocturno, se utiliza por convención como referencia del inicio de la *noche subjetiva* el momento en el que comienza el intervalo de actividad, el cual se define como CT12 (hora circadiana 12; en el caso de un animal diurno, las definiciones de día y noche subjetivos se invierten). A partir de allí, eventos específicos a lo largo del tiempo pueden referirse de acuerdo a CT12, quedando el *día subjetivo* localizado temporalmente entre las horas CT0 y CT12. Véase la Figura 1.6 para mayor claridad.

Vale la pena remarcar que la duración de las horas circadianas depende directamente del período del ciclo o del ritmo, según el caso, de acuerdo al cociente T (o *tau*) / 24 horas o T (o *tau*) / 1440 minutos; resumidamente, un ritmo de período menor a 24 horas implicará horas circadianas de menos de 60 minutos reales, y un ritmo de período mayor, horas circadianas de más de 60 minutos reales. De nuevo, consúltese la Figura 1.6 para ilustración.

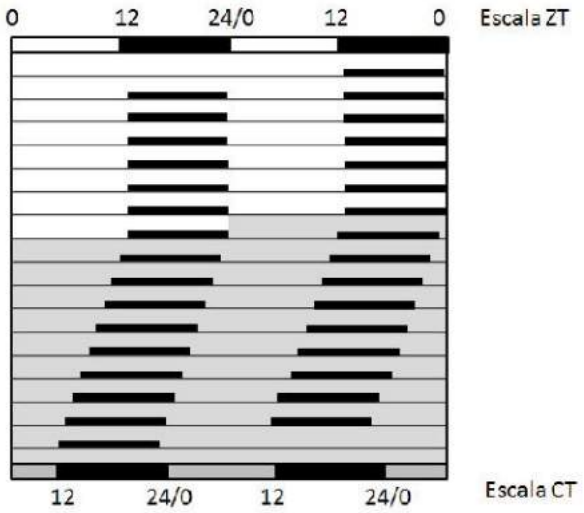


Figura 1.6 – Escalas temporales de referencia. *Cuando el animal, o cualquiera que sea el objeto de estudio, se encuentra bajo un zeitgeber, se puede establecer una escala basada en las transiciones de éste. En la parte superior del actograma, podemos establecer el ZT 12 (tiempo del zeitgeber 12) como el momento en el cual se apaga la luz, y a partir de este punto establecer una escala temporal. Cuando el animal se encuentra en libre curso, como en la segunda mitad del actograma, sólo pueden tomarse referencias temporales intrínsecas a algún ritmo observado. Por convención, se considera como CT (tiempo circadiano 12) al momento en el que comienza el período de actividad del ritmo, y a partir de dicho punto se establece una escala temporal de referencia.*

Otra de las herramientas de análisis que se emplean con frecuencia en esta tesis es la que se conoce como *periodograma*. Las diferentes técnicas para la realización de periodogramas se conocen desde fines del siglo XIX, cuando surgieron para su empleo en el estudio de fenómenos astronómicos. Con el tiempo han ido perfeccionándose y haciéndose específicos para sus diferentes campos de aplicación. Puesto en términos sencillos, un periodograma es un método estadístico que calcula la significancia de diferentes frecuencias en una serie temporal de datos en busca de algún período intrínseco en la misma. Es

decir, calcula, para cada una de las frecuencias o períodos en una ventana determinada (por ejemplo, si quisiéramos evaluar la probable existencia de un ritmo circadiano en una serie temporal, evaluaríamos una ventana de períodos desde las 20 a las 28 horas) un valor de significación estadística de acuerdo a los valores de la serie temporal analizada. En palabras un poco más complicadas, lo que se calcula es el valor de variabilidad o amplitud que se obtiene de ajustar la serie temporal a cada frecuencia o período; la frecuencia o período que genere una variación más grande de los datos dentro de cada ciclo (es decir, que maximice la amplitud), será la más significativa. La representación gráfica del resultado consiste en un gráfico cartesiano con las frecuencias o los períodos evaluados en el eje horizontal, y el valor estadístico obtenido para cada uno en el eje vertical. Los picos de la curva obtenida que superan un cierto valor establecido estadísticamente suelen considerarse como los períodos significativos que pueden encontrarse en la serie de datos estudiada.

Para el análisis de series temporales de variables biológicas en períodos prolongados de tiempo, con frecuencias de muestreo fijas, suele utilizarse el periodograma conocido como *chi cuadrado* (χ^2), o Sokolove-Bushell (en honor a quienes lo propusieron como herramienta de preferencia en estudios cronobiológicos), y es el que se utiliza en esta tesis. En la Figura 1.7 se pueden apreciar periodogramas evaluados sobre distintas secciones de una serie temporal.

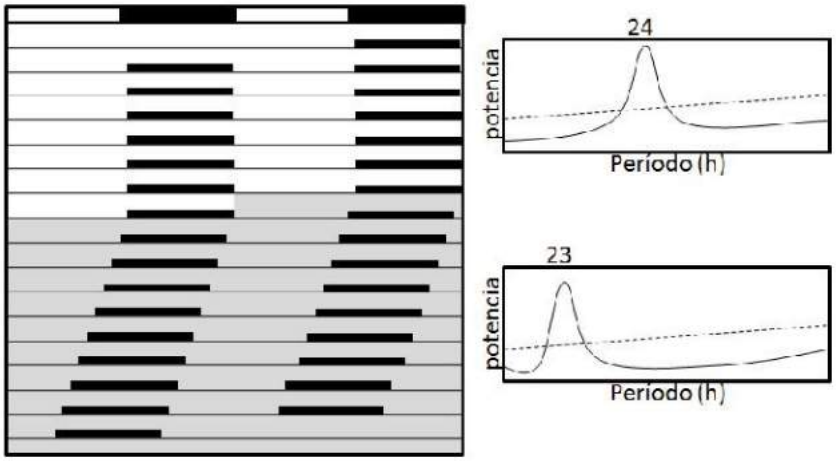


Figura 1.7 – Periodogramas. *Los dos periodogramas a la derecha analizan las dos secciones del actograma colocado como ejemplo. En el superior, se analiza la significancia de los períodos mientras el animal se encuentra sincronizado bajo un ciclo LO; la mayor varianza de los datos (la mayor potencia estadística) se encuentra con un período de 24 horas, como cabía esperar. El periodograma inferior busca determinar el período en libre curso bajo oscuridad constante; puede observarse que el período endógeno del animal tiene un período de 23 horas. Las rectas discontinuas que atraviesan las gráficas indican el umbral de significancia estadística.*

La tercera herramienta importante que se emplea repetidas veces en esta tesis es la que se conoce como test *z* de Rayleigh. Lo que permite este método de estadística es evaluar la significancia de una agrupación de puntos sobre una dimensión circular, como pueden ser las fases de distintos eventos o las fases de un mismo evento para distintos individuos a lo largo de un día. Para la realización del test se requiere especificar el tamaño de la dimensión circular y las posiciones de los puntos cuyo agrupamiento pretende evaluarse. En nuestro caso, especificaremos el período del ciclo sobre el que se proyectan los puntos, que son las fases del evento o eventos que se estén estudiando. La representación gráfica del test z de Rayleigh consiste en un gráfico circular

sobre el que se indica la posición relativa de los puntos y los valores de las determinaciones estadísticas calculadas. Véanse ejemplos en la Figura 1.8.

Ahora que tenemos bien cubiertas las definiciones y las herramientas necesarias para enfrentarnos a los ritmos circadianos y sus demonios, pongámonos cómodos para entrar de lleno en el mundo de los mamíferos y sus particulares mecanismos de temporización biológica.

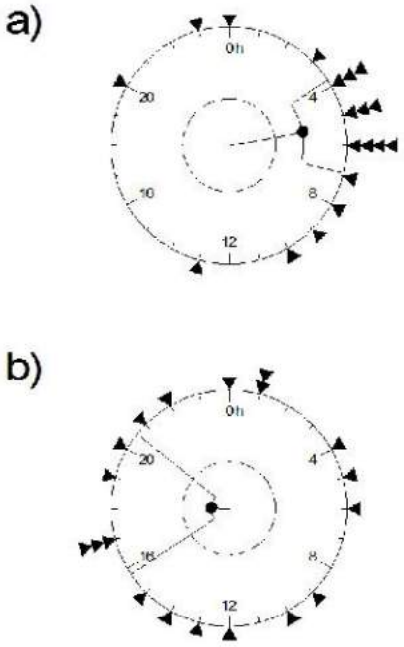


Figura 1.8 – Test z de Rayleigh. *Se muestran dos ejemplos de tests de Rayleigh en los que se analiza el agrupamiento de las fases de 19 eventos (indicados por triángulos negros) alrededor de un ciclo de 24 horas. El vector que nace en el centro del gráfico indica si el agrupamiento supera el umbral de significancia indicado por el círculo discontinuo. El agrupamiento en a) es estadísticamente significativo alrededor de la hora 6, mientras que el agrupamiento en b) si bien muestra una tendencia alrededor de la hora 18 no alcanza a superar el umbral de significancia estadístico.*

II) El Sistema Circadiano de mamíferos

"Marco Polo describe un puente, piedra por piedra.
- ¿Pero cuál es la piedra que sostiene el puente? - pregunta Kublai Kan.
- El puente no está sostenido por esta piedra o por aquélla - responde Marco-, sino por la línea del arco que ellas forman.
Kublai permanece silencioso, reflexionando. Después añade: -¿Por qué me hablas de las piedras? Es sólo el arco lo que me importa.
Polo responde: - Sin piedras no hay arco."
Italo Calvino, "Las Ciudades Invisibles"

Características fundamentales de los sistemas y los ritmos circadianos.

En todos los organismos vivos, el proceso y el mecanismo a través del cual se generan y se mantienen los ritmos circadianos tiene una estructura general que consiste en tres elementos fundamentales y los mecanismos de interacción entre ellos. Los elementos fundamentales son:

- Uno exógeno: el *zeitgeber*, "dador de tiempo", el factor del ecosistema cíclico que se impone sobre el organismo.
- Otro que es endógeno: el reloj o conjunto de relojes, que determinan el orden interno de las funciones biológicas.
- Los ritmos biológicos propiamente dichos, que representan la salida del sistema.

Estos tres elementos, y sus interacciones que veremos más abajo, pueden organizarse en un esquema conocido en la jerga como *eskinograma* (debido a

su popularizador Arnold Eskin) (Eskin, 1979), que se observa en la Figura 1.9. Como se puede observar, los tres elementos básicos se relacionan entre sí mediante interacciones uni o bidireccionales que son indispensables para el correcto funcionamiento del sistema y para conferirle una flexibilidad apropiada para adaptarse a diversos entornos.

El *zeitgeber* es capaz de *sincronizar* (también llamado entrenar o encarrilar) al reloj marcapasos a través de las rutas de entrada del sistema. A su vez, el reloj, a través de las vías de salida, *acopla* los ritmos biológicos en los distintos niveles orgánicos. Un ejemplo que comúnmente se utiliza para ilustrar este esquema es el de un reloj ordinario: el *zeitgeber* es la mano que ajusta la hora,

Figura 1.9 – Eskinograma del sistema circadiano. *En este esquema se puede apreciar la organización entre los tres componentes principales del sistema circadiano y las relaciones entre ellos. El zeitgeber sincroniza al oscilador central a través de las vías de entrada. El reloj a su vez acopla los ritmos biológicos a través de las distintas vías de salida. Sin embargo, el zeitgeber puede actuar directamente sobre la salida de los ritmos biológicos mediante mecanismos de enmascaramiento. Finalmente, los ritmos biológicos pueden retroalimentar hacia el reloj central afectando su fase.*

el reloj biológico es la máquina y sus engranajes, y los ritmos no son otra cosa que las agujas del reloj.

Un modelo primitivo del sistema circadiano podría contar con estas dos interacciones solamente, sincronización y acoplamiento, pero tal simplicidad conferiría al sistema una rigidez poco conveniente. Para aliviar esta falta de adaptabilidad, existen mecanismos adicionales que permiten al sistema tener un control más flexible de su función. El *zeitgeber* puede actuar directamente sobre los ritmos biológicos sin depender de la acción del reloj, a través de lo que se conoce como *enmascaramiento*. Esto permite realizar ajustes rápidos de la salida del sistema antes cambios ambientales repentinos o inesperados. A su vez, ciertos ritmos biológicos pueden *retroalimentar* al reloj biológico, modificando su funcionamiento y permitiendo un control fino y autorregulación de los mismos.

El funcionamiento esquematizado de un sistema circadiano modelo es el que puede apreciarse en el diagrama previamente mencionado. Con este modelo en mente vamos ahora a estudiar la identidad y las propiedades de cada una de sus partes tal como se presentan en los mamíferos

El reloj maestro de los núcleos supraquiasmáticos.

La historia del descubrimiento de la localización y la identidad del temporizador central en mamíferos es sumamente interesante y relativamente muy reciente. Uno de los más grandes placeres del joven estudiante de cronobiología es conocer e interactuar con grandes científicos que tuvieron una participación

activa en los mayores descubrimientos de su corta historia.

El pionero de la búsqueda del reloj circadiano en mamíferos (en particular en ratas, un modelo muy conveniente) fue Curtis Richter. Meticuloso al punto de la obsesión, Richter se encargó de trastornar todos y cada uno de los posibles candidatos anatómicos y fisiológicos a convertirse en el reloj endógeno de las pobres ratitas, hasta llegar a identificar una zona en la región hipotalámica del cerebro que al ser lesionada producía arritmicidad (Moore-Ede et al., 1982; Richter, 1967). Algunos años más tarde, F. Stephan y R. Moore por separado, el primero mediante lesiones cuidadosas de regiones hipotalámicas y el segundo mediante seguimiento de la señal retiniana, identificaron la región de

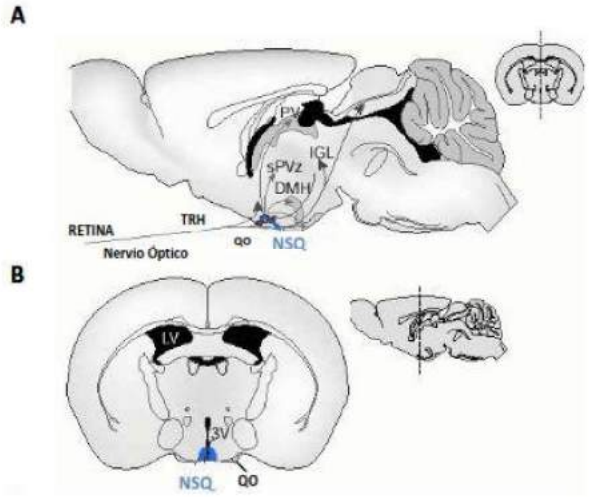


Figura 1.10 – Ubicación de los Núcleos Supraquiasmáticos. *Distintos cortes la posición de los NSQ en el cerebro de roedores, junto con la posición relativa de algunas de las vías de entrada y salida del reloj. A) Corte sagital en un plano cercano al tercer ventrículo. B) Corte coronal de la región hipotalámica. TRH: tracto retino-hipotalámico; IGL: hojuela intergeniculada; QO: quiasma óptico; PV: núcleos para-ventriculares del hipotálamo; sPVz: zona subparaventricular; DMH: núcleo dorsomedial hipotalámico.*

los Núcleos Supraquiasmáticos del hipotálamo (NSQ; Figura 1.10) como un candidato a marcapasos central, ya que no sólo al ser lesionados producían arritmicidad sino que también recibían la señal lumínica proveniente de la retina (Moore & Eichler, 1972; Stephan & Zucker, 1972).

Claro que estas evidencias no alcanzaban para determinar fehacientemente que los NSQ eran efectivamente el reloj; sólo indicaban que probablemente representaban una pieza indispensable dentro del sistema circadiano y que eran necesarios para mantener la ritmicidad.

Durante décadas, se fueron describiendo diversas características de los NSQ que reforzaban los argumentos de su candidatura, como la presencia de ritmos circadianos tanto *in* y *ex vivo* de actividad eléctrica y expresión génica, tanto al nivel del tejido como de sus neuronas, y ritmos metabólicos. Sin embargo, por más alentadores que resultaban estos experimentos, seguían sin poder dilucidar si los NSQ eran el reloj circadiano maestro o simplemente una pieza más del sistema circadiano.

Se necesitaron más de 20 años de experimentos para determinar que efectivamente los NSQ son el reloj circadiano maestro en mamíferos. La respuesta al enigma comenzó a gestarse cuando en una serie de experimentos maravillosos grupos independientes en Japón y México demostraron que el transplante de NSQ sanos a animales cuyos NSQ habían sido lesionados lograba restablecer los ritmos circadianos en los animales transplantados (Drucker-Colin et al., 1984; Sawaki et al., 1984). El problema era que los ritmos que se recuperaban no diferían significativamente de los que el animal mostraba antes de la lesión, por lo cual el resultado no podía interpretarse más que como el simple reemplazo de una rueda pinchada, a pesar de lo genial del

experimento. Hacía falta demostrar que los NSQ hacían algo más que restablecer un comportamiento esperable, que tenían propiedades intrínsecas que podían ser transmitidas al sistema y en último término, a los ritmos.

Para solucionar este problema se necesitó un golpe de suerte, y como muy acertadamente dice el proverbio, alguien que estuviera atento a aprovecharlo. Martin Ralph, en el laboratorio de Michael Menaker, uno de los próceres de la historia de la cronobiología (y discípulo de Pittendrigh, por si hacía falta), estudiaba los ritmos de actividad locomotora en hámsteres cuando detectó que un lote de animales recién llegados presentaba un ritmo en libre curso con un período de 22 horas, notoriamente más corto que las 24,1 horas del común de la especie. Tras verificar varias veces el resultado, Ralph y Menaker concluyeron con emoción que tenían en sus manos un auténtico mutante circadiano, el primero en ser descubierto entre los mamíferos (Ralph & Menaker, 1988). Bautizaron al mutante *tau* (por su alteración en el período), y comprobaron también que la cruza *tau*/wt poseía un período endógeno intermedio entre el homocigota y el tipo salvaje.

La aparición del mutante representaba la llave para la resolución de la cuestión acerca de la función de los NSQ en el sistema circadiano, y lo sabían. Lo que hicieron entonces fue repetir los experimentos de transplantes de NSQ, pero con transplantes cruzados entre hámsteres *tau* y normales. Lo que vieron fue que el período de los ritmos recuperados por los animales transplantados dependía exclusivamente del fenotipo del animal donante de los NSQ. Los animales *wild type* lesionados rescatados con los NSQ de un hámster *tau* recuperaban un ritmo de actividad locomotora en libre curso de 22 horas de período, y a la inversa, cuando un *tau* recibía los NSQ de un animal corriente,

recuperaba un ritmo de 24 horas (Ralph et al., 1990). Este experimento demostraba que la fuente de la ritmicidad circadiana residía específicamente en los NSQ, los cuales determinaban fase y período de los ritmos circadianos.
Desde entonces se ha avanzado considerablemente en el estudio intensivo de los NSQ, su comportamiento a nivel celular y molecular, sus conexiones con otras estructuras en el cerebro, la identidad de los neurotransmisores involucrados en su funcionamiento, y una larga lista de etcéteras.

Los núcleos supraquiasmáticos son estructuras muy pequeñas ubicadas en el hipotálamo, a ambos lados del tercer ventrículo y justo por encima del quiasma óptico. Poseen alrededor de 16 mil neuronas cada uno y otras tantas células gliales (Reppert & Weaver, 2001; van den Pol, 1980). Si bien hablamos corrientemente de los NSQ como una estructura única (ignorando en primera instancia que hay dos núcleos y que pueden funcionar cada uno perfectamente ante de la ausencia del otro), existe una división bastante importante en lo que se refiere a su función y la expresión de neuropéptidos diferenciales (Figura 1.11). La división más importante dentro de cada NSQ individual, es entre las que se denominan región ventrolateral y región dorsomedial (Moore, 1996).
La región ventrolateral (o *core*) se caracteriza por la expresión diferencial del péptido vasoactivo intestinal (VIP) y el péptido liberador de gastrina (GRP). A esta región llegan la mayoría de las aferencias de la retina (ver abajo) ya sea directamente a través del tracto retino hipotalámico como indirectamente desde el rafe y la hojuela intergeniculada.

La región dorsomedial (o *shell*) se caracteriza por una densidad neuronal mayor y por la expresión de arginina vasopresina (AVP) y calbindina (CAL). El *shell* a diferencia del *core* posee ritmicidad endógena sostenida en libre curso, modulada su vez por las señales de la región ventrolateral. Desde esta región se extienden proyecciones a diversas zonas del hipotálamo, como los núcleos paraventriculares, el hipotálamo dorsomedial, y otras. Se sabe también que el *shell* es sensible a estímulos sincronizadores no fóticos y modulatorios (Abrahamson & Moore, 2001; Kalsbeek et al., 2006).

Resumiendo, podríamos decir que mientras el *core* representa la zona dedicada a la entrada de la señal fótica, mientras que el *shell* es responsable de la transmisión de la ritmicidad del reloj al resto del sistema circadiano.

Como el lector puede intuir, el acoplamiento entre ambas regiones de los NSQ es indispensable para el correcto funcionamiento del sistema circadiano todo. La comunicación entre células intra e inter zonas dentro del reloj central se

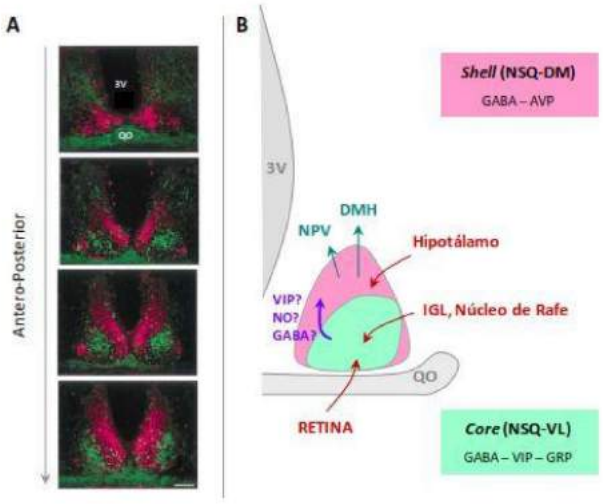


Figura 1.11 – Características neuro- anatómicas de los NSQ de ratón. a) *Fotografías de NSQ de ratón donde se observa en rojo la distribución de AVP (shell) y en verde células GRP positivas (core) (imágenes modificadas de (Karatsoreos et al., 2004)).* ***b)*** *Distribución esquemática de las regiones de uno de los NSQ resaltando la expresión de los neuropéptidos más importantes. Las flechas rojas indican las aferencias y las verdes, eferencias.*

produce por una lista de moléculas y péptidos que sigue creciendo actualmente y que incluye a NO, GABA, VIP (Hastings & Herzog, 2004; Plano et al., 2007).

El sistema circadiano distribuido.

"El ritmo es algo que o tienes, o no tienes; pero cuando lo tienes, lo tienes por todos lados"

Elvis Presley

Si bien el reloj de los NSQ es el oscilador central maestro, existen numerosos relojes periféricos o "esclavos" con sus propiedades rítmicas particulares y que se encuentran en fase de acuerdo a las directivas de oscilador central. Estos órganos y tejidos osciladores, entre los que están diversas regiones del cerebro, el hígado, los pulmones, el bazo, y la mismísima sangre (y, en rigor, se cree que todas las células del organismo son rítmicas), tienen a cargo funciones importantes dentro de los ritmos biológicos incluyendo la regulación del metabolismo, del sistema inmune, de capacidades cognitivas, y una larga lista de etcéteras (Dibner et al., 2010).

Suele hablarse del sistema circadiano como un sistema “distribuido”, debido a que se organiza jerárquicamente a diferentes niveles que aportan a la orquestación integral de los ritmos biológicos. La génesis de los ritmos biológicos se encuentra, como veremos dentro de poco, en mecanismos moleculares inherentes a células individuales (Reppert & Weaver, 2001). Sin embargo, cada una de estas células osciladoras necesitan acoplarse entre sí (como por ejemplo, dentro de los NSQ) para poder transmitir un impulso rítmico amplificado y en correcta fase. A su vez, grupos de osciladores deben

comunicarse de forma de mantener relaciones de fase estables dentro del marco general temporal establecido por el reloj central.

Más adelante veremos que la relación entre las fases de los diversos componentes del sistema circadiano puede alterarse de forma aguda o crónica. En el primer capítulo de esta tesis estudiaremos un modelo animal en el que el acoplamiento de algunas funciones rítmicas se encuentra sensiblemente afectado. Y, si el lector no se nos aburre antes, al final de esta Introducción analizaremos brevemente cómo las alteraciones de la armonía de los diversos componentes del sistema circadiano pueden afectar la fisiología tanto en humanos como en los pobrecillos animales de laboratorio.

"El tiempo entra por los ojos;...

... eso lo sabe cualquiera"

Julio Cortázar

En los mamíferos, como en la mayor parte de los organismos vivos, el principal *zeitgeber* sincronizador de sus ritmos circadianos es el ciclo de luz-oscuridad. Como bien intuyó Julio Cortázar, los signos del paso del tiempo ingresan al sistema circadiano a través de los ojos (al menos en algunos organismos que tienen ojos). La retina de mamíferos cuenta con células fotorreceptoras de distintos tipos, incluyendo los comúnmente conocido conos y bastones, pero también aquellas que poseen el fotopigmento melanopsina y que son particularmente las principales en la transducción fótica del sistema circadiano (Panda et al., 2002). Estas células fotorreceptoras captan la luz del ambiente y envían la señal fótica hacia los NSQ, a través de primero los nervios ópticos y

luego del tracto retino-hipotalámico (Golombek & Rosenstein, 2010).

Si bien la luz es el principal sincronizador de los NSQ, existen otras vías tanto neurales como humorales que pueden transmitir información sincronizadora al reloj central. Una de las más importantes es la señal que proviene de la glándula pineal, a través de la liberación de melatonina. La mayoría de estas vías adicionales tienen importancia en las vías de retroalimentación del sistema circadiano, una estrategia que como ya comentamos colabora con la regulación y la precisión de todo el mecanismo temporizador.

Existen otros estímulos sincronizadores de los ritmos circadianos, con sus vías de entrada y relojes periféricos específicos afectados. Si bien ninguno logra superar en capacidad sincronizadora a la luz, eso no significa que no tengan una función importante. La disponibilidad de alimento funciona como un potente sincronizador de relojes periféricos, entre ellos el hígado, si bien todavía no hay consenso de acuerdo a la ubicación del reloj responsable de su acción (un Oscilador Entrenable, o Sincronizable, por Alimento, o por sus siglas en inglés, FEO) (Mistlberger, 2011; Schibler et al., 2003; Stokkan et al., 2001).

Las vías de salida de los NSQ.

Si el reloj central de los NSQ es el mayor responsable del mantenimiento de la función circadiana del organismo, cabe esperar que existan numerosas y variadas vías de salida de la información que produce. Se han descripto vías tanto humorales como neuronales.

Los ritmos de actividad locomotora se controlan aparentemente por vías humorales, ya que se han descrito factores liberados por los NSQ como por

ejemplo TGFα (factor de crecimiento transformante alfa), PK2 (proquinecitina 2) y CLC (citoquina similar a cardiotrofina), que han mostrado inhibir la actividad locomotora en animales sin afectar el mecanismo de generación de los ritmos (Cheng et al., 2002; Kramer et al., 2001; Kraves & Weitz, 2006).

Los experimentos de lesión y transplante de NSQ demostraron que el ritmo de actividad locomotora se recupera pero no ocurre lo mismo con algunos ritmos neuroendócrinos. Las eferencias de los NSQ culminan fundamentalmente en centros autonómicos (simpáticos o parasimpáticos) y neuroendócrinos en el hipotálamo, que controlan directa o indirectamente las oscilaciones en tejidos blancos.

Brevemente, los NSQ controlan distintos ritmos hormonales mediante neuronas "endócrinas" (presentes en los NPV y en el DMH) y neuronas preautonómicas (NPV, médula espinal). Asimismo, la sensibilidad de los tejidos blanco a la información enviada vía neuronas endócrinas puede ser modificada mediante neuronas preautonómicas. De esta última clase neuronal existen células que se conectan con centros autonómicos simpáticos y otras con centros parasimpáticos, entre estos últimos el Núcleo Motor dorsal del Nervio Vago (Kalsbeek et al., 2006).

Por lo tanto, los NSQ pueden controlar ritmos fisiológicos diversos (entre ellos ritmos hormonales, pero también ritmos de otros tipos) que tienen fases completamente diferentes entre sí mediante señalización neuronal y humoral; comunicando "qué hora es", en respuesta a señales externas e internas, a los osciladores periféricos presentes en el resto del organismo.

Bases moleculares de los ritmos circadianos de mamíferos.

Ya hemos establecido la ubicación del reloj central de mamíferos en los NSQ, y hemos descripto como los mismos se componen de miles de neuronas y células gliales, y como existen a su vez dentro de los NSQ zonas diferenciadas de acuerdo a la expresión de ciertas proteínas o su actividad a la luz.

La génesis de los ritmos circadianos que los NSQ transmiten al resto del organismo está en ciclos moleculares intrínsecos a cada una de las neuronas que los componen, que concluyen luego, de forma general con el resto de las neuronas, en una señal rítmica transmisible (Reppert & Weaver, 2001).

Lo que se conoce como modelo genérico de un reloj molecular implica un ciclo de retroalimentación transcripcional negativa con elementos positivos y negativos. De forma muy básica, tal como se aprecia en la Figura 1.12a, los elementos positivos activan la transcripción de los elementos negativos, los cuales a su vez inhiben su propia expresión. De esta forma, se genera un ritmo en la disponibilidad de los elementos negativos, los cuales a su vez pueden funcionar como acopladores de la salida del reloj.

Como seguramente debe estar prediciendo el lector, los relojes moleculares en la naturaleza son mucho más complejos, si bien se conserva el mismo núcleo genérico en todas las especies en las cuales se han logrado caracterizar relojes moleculares. El alto grado de homología tanto funcional como secuencial detectado en genes y promotores de las más dispares especies indica un origen muy primitivo de los primeros relojes transcripcionales.

En mamíferos, el modelo más aceptado implica un ciclo de retroalimentación que involucra la transcripción, traducción, y modificación post-traduccional de

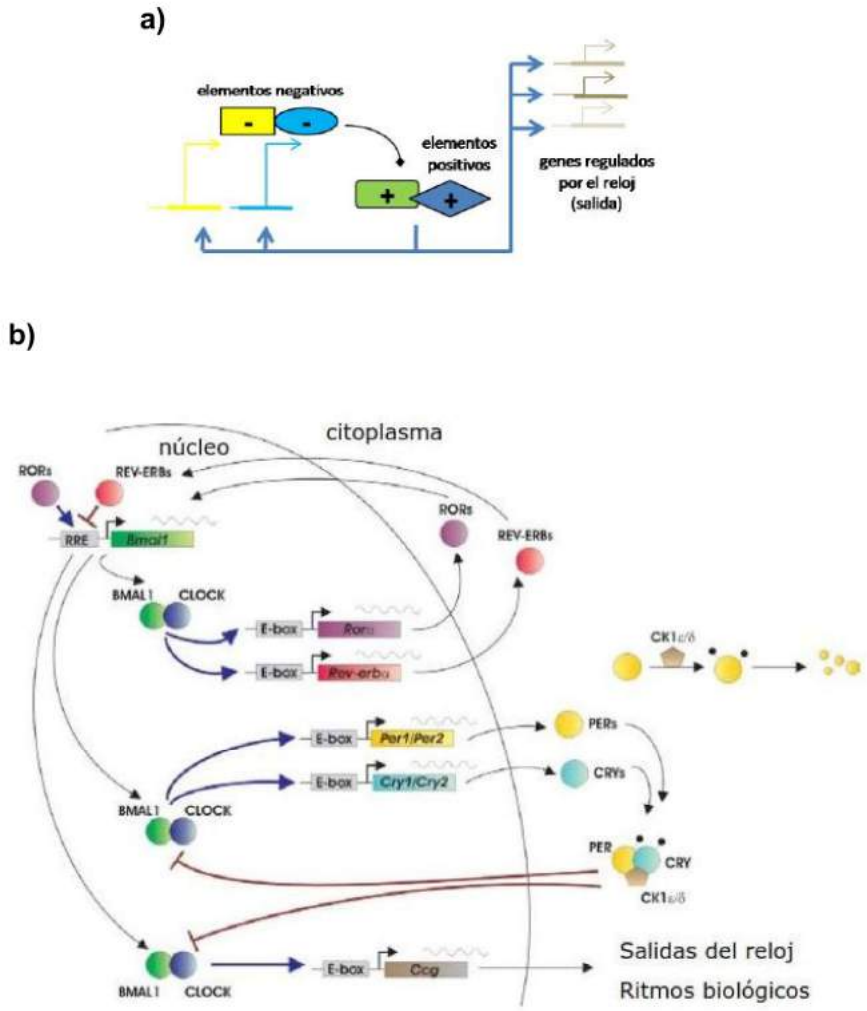


Figura 1.12 – Mecanismos de generación de ritmos a nivel molecular. a) *Ciclo genérico de retroalimentación transcripcional-traduccional.* ***b)*** *Los dos ciclos de retroalimentación más importantes se muestran en la figura: el dímero CLOCK-BMAL1 activa la transcripción de diversos genes, entre ellos Per, Cry, Rev-Erbα y los genes controlados por reloj. Las proteínas PER y CRY heterodimerizan y en el núcleo se unen a CLOCK-BMAL1 inhibiendo la transcripción de los genes controlados por cajas E. El mecanismo se completa con la inhibición de la transcripción de Bmal1 por Rev-Erbα, las modificaciones post-traduccionales de PER y CRY, y la degradación regulada de las proteínas reloj. Modificado de (Ko & Takahashi, 2006).*

un número de genes reloj y otros genes accesorios. Los elementos positivos son los genes *bmal* y *clock*, mientras que los negativos son los genes de las

familias *per* y *cry*, y son conocidos como *genes reloj*. Estos elementos fundamentales son acompañados por otros que tienen funciones regulatorias de todo tipo y que permiten aumentar flexibilidad y eficiencia en la adaptación del sistema ante cambios en el ambiente sincronizador, señales endógenas, u otros factores (Ko & Takahashi, 2006). En la Figura 1.12b se ilustra un modelo simplificado del reloj molecular de mamíferos.

Sincronización y enmascaramiento.

Como hemos afirmado más de una vez, es la luz el principal estímulo sincronizador de los ritmos circadianos en mamíferos. Veamos, ahora que el lector ha perdido el miedo a los actogramas, las características de la sincronización fótica y sus fenómenos asociados. Antes hemos utilizado como ejemplo el caso de un roedor nocturno para introducirnos en la técnica del actograma. Volvamos a ese ejemplo y utilicémoslo para profundizar en este tema.

La primer cuestión recae en definir qué significa que un ritmo circadiano esté *sincronizado* a (también expresado como "*estar en fase con*") un ciclo ambiental. La sincronización implica una estabilidad en la relación de fases entre el ritmo biológico y el ciclo ambiental, siempre y cuando la fase de dicho ritmo se conserve una vez retirado dicho estímulo. En nuestro ejemplo en la Figura 1.13a, el roedor está sincronizado al ciclo de luz-oscuridad porque su ritmo de actividad locomotora posee una relación estadísticamente estable entre su fase de inicio (en inglés, *onset*) y la fase de apagado de la luz, y porque además, al apagarse definitivamente la luz, esta fase de *onset* se

conserva sin modificaciones.

El concepto de sincronización también puede aplicarse a un caso de dos ritmos circadianos distintos. Los ritmos de temperatura corporal y de actividad suelen estar sincronizados entre sí, y mantienen relaciones de fase muy estables.

De acuerdo a la segunda condición para considerar un ritmo sincronizado con un ciclo ambiental es que la fase del mismo se mantenga estable luego de la desaparición del estímulo sincronizador. Para evaluar la sincronización del ritmo, cuando se suprime el ciclo ambiental, como ya hemos dicho antes, el ritmo debe entrar en libre curso y su fase debe corresponderse con la mostrada previamente, a pesar del posible cambio en el período del ritmo (¿recuerda, lector, que por algo los llamábamos *ritmos circadianos*?). En la figura 1.13b podemos observar un caso en el que dicha condición no se cumple: al suprimirse el ciclo de luz-oscuridad, la fase del ritmo en libre curso "salta" hacia una posición impredecible a partir de su fase previa. Este fenómeno se conoce como *enmascaramiento*. Aquí el ritmo no se corresponde directamente con una salida del oscilador, si no que se expresa siguiendo únicamente la directiva del *zeitgeber*.

El enmascaramiento suele ser menospreciado por el común de los cronobiólogos como un fenómeno de poca importancia (y sumamente molesto en el análisis de resultados). Sin embargo y como mencionamos en la descripción de las propiedades del sistema circadiano, tiene una función importantísima ya que flexibiliza el sistema permitiéndole la adaptación aguda a cambios difíciles de predecir o de procesar, saltando el control del reloj maestro.

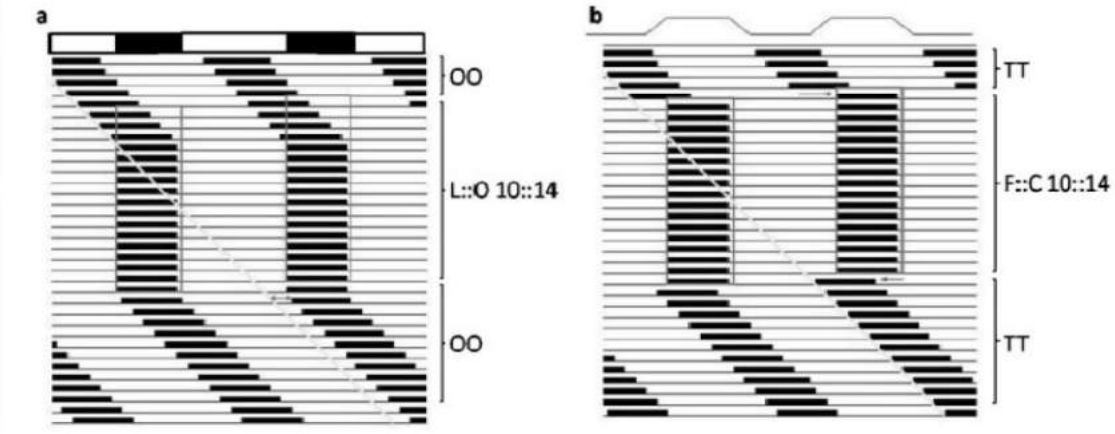


Figura 1.13 – Sincronización vs. enmascaramiento. a) *Sincronización: Actividad locomotora de un animal nocturno bajo una secuencia de condiciones de luz-oscuridad: OO, LO, y nuevamente OO. El animal ajusta su período y fase al ciclo LO, y al regresar a la condición de oscuridad constante, su fase se corresponde con la determinada por ciclo de luz anterior.* ***b)*** *Enmascaramiento: Actividad locomotora de un animal bajo una secuencia de condiciones de temperatura: TT (temperatura templada constante), FC (ciclo frío-calor), y regreso a TT. Si bien el animal es capaz de ajustar su fase y período al ciclo FC, al regresar a la condición de libre curso, la fase del ritmo observado no corresponde con la de dicho zeitgeber sino con la fase del ritmo de libre curso observado previamente.*

El enmascaramiento puede ser de varios tipos. Se dice que hay enmascaramiento negativo cuando lo que se detecta es una supresión de la variable rítmica por efecto del estímulo ambiental, y positivo cuando se produce una activación de la misma.

Vale la pena aclarar que sincronización y enmascaramiento no necesariamente se excluyen entre sí. No es difícil encontrar casos en los que un ritmo se encuentre tanto sincronizado como enmascarado simultáneamente por un ciclo ambiental. En el caso más común, un ritmo de actividad de fase nocturna puede estar perfectamente sincronizado al ciclo de luz-oscuridad, pero a su vez su *onset* estar suprimido mediante enmascaramiento (negativo) por los últimos

minutos del período de luz. Al transferir el animal a oscuridad constante, podremos observar como la fase del *onset* se adelanta algunos minutos a la prevista a partir del comportamiento previo. En este caso, no debe considerarse enmascarado al ritmo sino simplemente a su *onset*.

Distintos modelos para explicar la sincronización. De yapa, la curva de respuesta de fase.

Ya hemos hablado acerca de la sincronización y lo que la misma significa, pero hasta ahora no hemos discutido los mecanismos mediante los cuales se produce la sincronización. Ahora que estamos por dedicarnos al fenómeno de *resincronización*, es conveniente que pasemos un tiempo estudiando cómo se produce la sincronización del oscilador maestro a las señales externas. En particular, a partir de ahora, estaremos hablando de la sincronización a los estímulos fóticos (no entremos en detalles, pero estos incluyen a la luz tanto como todos aquellos que funcionan mediante mecanismos equivalentes).

A esta altura debiera ser fácil intuir que el reloj es capaz de ser estimulado por la luz, y a partir de ello, experimentar cambios en su comportamiento. De otra forma, ¿cómo podría sincronizarse a un ciclo de día y noche? Existen dos modelos que explican la susceptibilidad del reloj circadiano a la luz, y que desde que han sido propuestos en épocas tempranas, han vivido en constante pugna.

El modelo ***no paramétrico*** (o discreto) de la sincronización fótica implica que un reloj previamente en libre curso es afectado por la administración de pulsos

de luz (o de oscuridad). Este es el modelo que fue propuesto y defendido por Pittendrigh en los albores de la cronobiología moderna (Daan & Pittendrigh, 1976).

Dependiendo la fase (relativa al CT del ritmo) en la que se administra un pulso de luz, el efecto sobre el reloj puede significar un avance o un retraso de su fase, o puede no existir efecto alguno. Si evaluamos el efecto sobre un ritmo en libre curso producido por un estímulo (en nuestro caso un pulso de luz, pero es aplicable a cualquier tipo de estímulo que se pretenda testar) a distintas horas circadianas, lo que obtendremos es lo que se conoce como una **curva de respuesta de fase** (CRF), que es característica del tipo de estímulo testeado (identidad, intensidad, duración, etcétera) y del reloj (especie) y ritmos sobre el que se evalúe. La Figura 1.14 ilustra el proceso que se sigue para la confección de una CRF.

Vamos a relajarnos un poco, y quizás aprendamos algo. Pongámonos por un momento en la piel de un roedor de actividad nocturna, en libre curso en oscuridad constante. Nuestros NSQ no necesitan andar "mirando por la ventana" para ver si es de día o de noche porque saben perfectamente cuando nos encontramos en la noche o el día subjetivo como para preocuparse. Una noche subjetiva de esas, tempranito, a eso de las CT15 (tres horas desde que empezamos a hacer un poco de ejercicio), mientras andamos por ahí lo más contentos, se prende de repente una luz fuerte. Mientras nos paralizamos del susto, la señal fótica que recogieron nuestros fotorreceptores melanopsina-positivos llega en forma de una liberación de glutamato a nuestros NSQ, que se dicen "¡Oia! Yo pensé que ya era de noche". Inmediatamente el engranaje

molecular del reloj *retrasa* su fase para ajustarnos de acuerdo a la nueva información recibida: al otro día, nos indica que empecemos a correr un rato más tarde. A los pocos días, cuando estamos preparándonos para terminar con el trabajo nocturno, a eso de las CT20, volvemos a sufrir el ataque de una luz sorpresa, y esta vez en los NSQ se escucha "¡Válgame! ¿Tan tarde era?". El reloj adelanta su fase y al otro día nos indica que comencemos a correr un rato más temprano. Días más tarde, mientras dormimos a pata suelta en la comodidad de nuestra viruta, la luz traicionera aparece por tercera vez, a lo que tanto nosotros como nuestros NSQ respondemos con un irónico "Contame algo que no sepa", y seguimos durmiendo. El reloj, consciente de su día subjetivo, no acusa recibo de una luz que de todas formas estaba allí, al menos en espíritu.

Este pequeño interludio nos permite explicar la forma que suele tener una CRF *fótica* típica como la que se muestra en la Figura 1.13: los pulsos en la noche temprana producen retrasos de fase, mientras que en la noche tardía producen adelantos, y no tienen prácticamente efecto cuando son aplicados durante el día. Es importante aclarar que si bien los cambios de fase se producen rápidamente en el reloj, no son instantáneos en los ritmos de saida del sistema. Esto puede provocar, por ejemplo en el caso de los ritmos de actividad, que para cuantificar el verdadero cambio producido por un pulso de luz haya que esperar un cierto número de *días de transiente* durante los cuales el ritmo no termina de alcanzar una fase estable. Esto tiene implicaciones importantes en el proceso de resincronización y su relación con la salud del organismo.

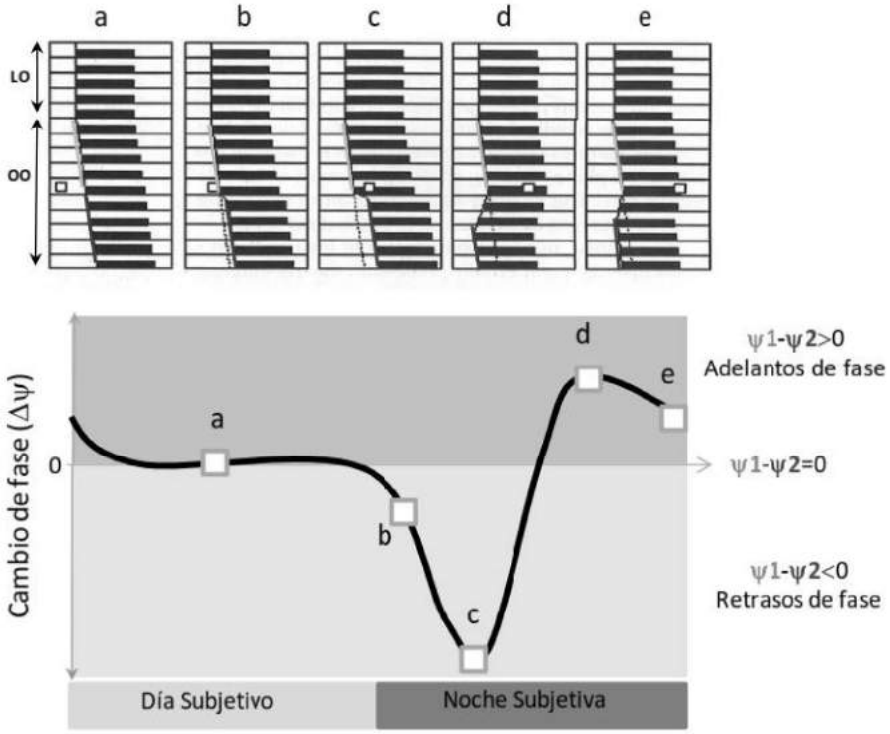


Figura 1.14 – Curva de respuesta de fase. *En el panel superior se muestran cinco actogramas diferentes. Cada uno de ellos representa la actividad de un animal a lo largo de 24 h durante 5 días en LO y el resto en OO. En el día y hora señalados en cada uno de los actogramas se trató a los animales con pulsos de luz. La fase previa y posterior al estímulo se señala con líneas verdes y violetas, respectivamente. La diferencia entre ambas fases determina el cambio de fase. Cuando estos datos de ψ1 - ψ2 se grafican en el eje "Y" versus el CT de administración del pulso, se obtiene la CRF. Los puntos correspondientes a el actograma* ***b*** *y* ***c*** *representan retrasos de fase, mientras que los correspondientes a* ***d*** *y* ***e****, adelantos. En* ***a****, no hay cambio de fase.*

Las CRF de tipo fóticas no sólo involucran estímulos lumínicos sino que el término se extiende a todos los estímulos sincronizadores en diversas condiciones (*in* o *ex vivo*) que poseen una curva con sus características. Las CRF conocidas como *no fóticas* tienen una forma característica que muestra principalmente adelantos de fase durante el día subjetivo. Algunos estímulos que tienen este efecto no fótico en roedores son el cambio en la viruta de la jaula, la inclusión de una nueva rueda, o el contacto con otros roedores.

Volviendo al modelo de sincronización no paramétrica, entonces podemos decir que se basa en la CRF para explicar el proceso de sincronización de un reloj circadiano a un ciclo de luz-oscuridad. El reloj recibe cada día pulsos de luz que están cíclicamente ajustando su fase de forma de mantener una relación estable entre el oscilador maestro y el ciclo ambiental.

El otro modelo que fuera propuesto por Aschoff en oposición al de Pittendrigh es el modelo de sincronización **paramétrica** (o continua). Este modelo propone que el oscilador está continuamente bajo el efecto del *zeitgeber*, de acuerdo con la intensidad del mismo. El modelo postula que la luz tiene un efecto continuo sobre el reloj durante la sincronización, acelerándolo en los intervalos de luz y decelerándolo durante la oscuridad. Este modelo deriva de la conocida como Ley de Aschoff, que establece que la velocidad del reloj en condiciones de luz constante depende de la intensidad de dicha luz.

No vamos a ahondar en las razones que sustentan uno u otro modelo, pero a lo largo del tiempo se ha visto que puestos a elegir, el modelo discreto de la sincronización ha demostrado ser el más conveniente para explicar la mayoría de los fenómenos observados. La batalla entre los partidarios de ambos modelos de la sincronización fótica ha amainado considerablemente en los últimos años, probablemente bajo la pacifista y más razonable hipótesis de que ambos modelos contribuyan en cierto grado al éxito de los osciladores biológicos en la adaptación a los ciclos ambientales.

Rango de entrenamiento.

Antes de continuar, tendremos que ocuparnos de un tema algo complejo, pero que espero no ahuyente al valiente lector que ha sobrevivido hasta este punto. Hemos hablado acerca de la sincronización de los ritmos a ciclos ambientales, pero no hemos dicho nada acerca de la capacidad de los mismos para hacerlo. ¿Acaso el reloj, luego los ritmos, pueden sincronizarse a cualquier estímulo rítmico? El lector puede responder acudiendo a su sentido común: "¡seguro que no!". Pues claro que no.

La capacidad de un oscilador (y a partir de aquí, podemos hablar indistintamente del oscilador o de los ritmos que representan su salida o su lectura) para sincronizarse a determinado *zeitgeber* depende de varios factores, tantos propios de sí mismo como otros que corresponden al estímulo sincronizador. El oscilador posee un período intrínseco y una flexibilidad (la cual no vamos a discutir cuantitativamente ahora). A partir de estas características, la capacidad del oscilador de sincronizarse a un *zeitgeber* va a depender de la combinación del período y la amplitud de éste (Abraham et al., 2010; Aschoff & Pohl, 1978). Evaluando la sincronización de un oscilador o de un organismo modelo a ciclos sincronizadores con distintas combinaciones de período y amplitud nos permite determinar el "*rango de entrenamiento*" de dicho oscilador u organismo ante un tipo de estímulo. En la Figura 1.15 podemos apreciar un ejemplo gráfico del rango de entrenamiento de un oscilador modelado: en el eje X se ubican los períodos (generalmente centrados alrededor del período intrínseco del sistema oscilatorio en cuestión) y en el eje Y las amplitudes, y con un código de colores se indica si el oscilador

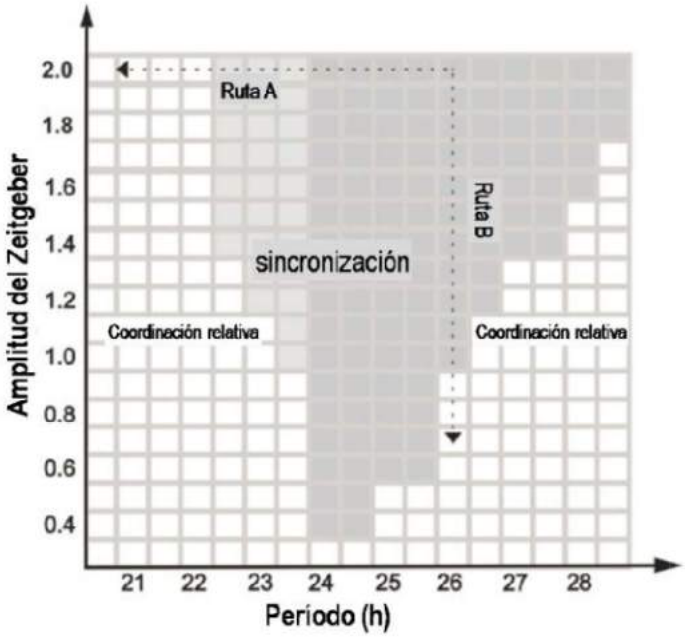


Figura 1.15 – Rango de entrenamiento. *El siguiente ejemplo corresponde a un oscilador que presenta una CRF asimétrica, con mayor amplitud de retrasos. Se muestra el comportamiento del oscilador en términos de sincronización (zona gris) o coordinación relativa (zona blanca) en respuesta a distintos zeitgebers con combinaciones de período y amplitud.*

puede o no sincronizar a un *zeitgeber* con cada combinación de parámetros. Lo que puede observarse claramente es que la capacidad desaparece a medida que la amplitud disminuye (manteniendo fijo el período; ruta B en el gráfico) o cuando el período del sincronizador se aleja del intrínseco del oscilador (manteniendo fija la amplitud; ruta A).

Un *zeitgeber* de períodos similar al del oscilador y de gran amplitud puede ser considerado "fuerte", mientras que el alejamiento del mismo del período intrínseco del oscilador o la baja de su amplitud lo "debilita". Mientras más el período del *zeitgeber* se aleje del período endógeno del oscilador, o mientras menor sea su amplitud, más difícil resultará al oscilador permanecer sincronizado al mismo. El rango de entrenamiento es específico del sistema

bajo estudio (ya sea una determinada especie, o un cultivo *ex vivo*, o un modelo matemático) para cada estímulo sincronizador.

Coordinación relativa.

Ahora, cuando el oscilador no puede sincronizarse a un cierto *zeitgeber* que está cercano pero fuera de su rango de entrenamiento, ¿qué pasa? Lo que se produce es lo que se conoce como *coordinación relativa*; porque el oscilador no logra sincronizarse, pero que lo intenta, lo intenta. Sucede que el oscilador trata de seguir el curso del *zeitgeber*, pero pierde la precaria sincronización alcanzada tras una cierta cantidad de ciclos, y se independiza del mismo por otro número de ciclos, hasta que vuelven a quedar en fase y el proceso se repite, lo que genera el patrón de comportamiento en forma de Z que puede observarse en la Figura 1.16. El patrón en forma de Z se debe a la alternancia entre estados de libre curso y de de sucesivos cambios de fase (que se producen cuando los períodos de luz coinciden con las zonas de la CRF capaces de responder al estímulo). Lo que se obtiene es un comportamiento que posee un período que es un promedio entre los de las dos partes de la coordinación relativa. La forma del patrón de coordinación relativa, y en consecuencia, el período promedio del mismo dependen de las características del *zeitgeber*. En las Figura 1.16a y 1.16b se ilustra (a través de simulaciones matemáticas) lo que se obtiene al someter a un oscilador a *zeitgebers* que se encuentran fuera de su rango de entrenamiento, siguiendo las rutas A y B de la Figura 1.15. Cuanto más débil sea el *zeitgeber* más débil (de menor amplitud) o cuanto más alejado del período intrínseco del oscilador esté, este período

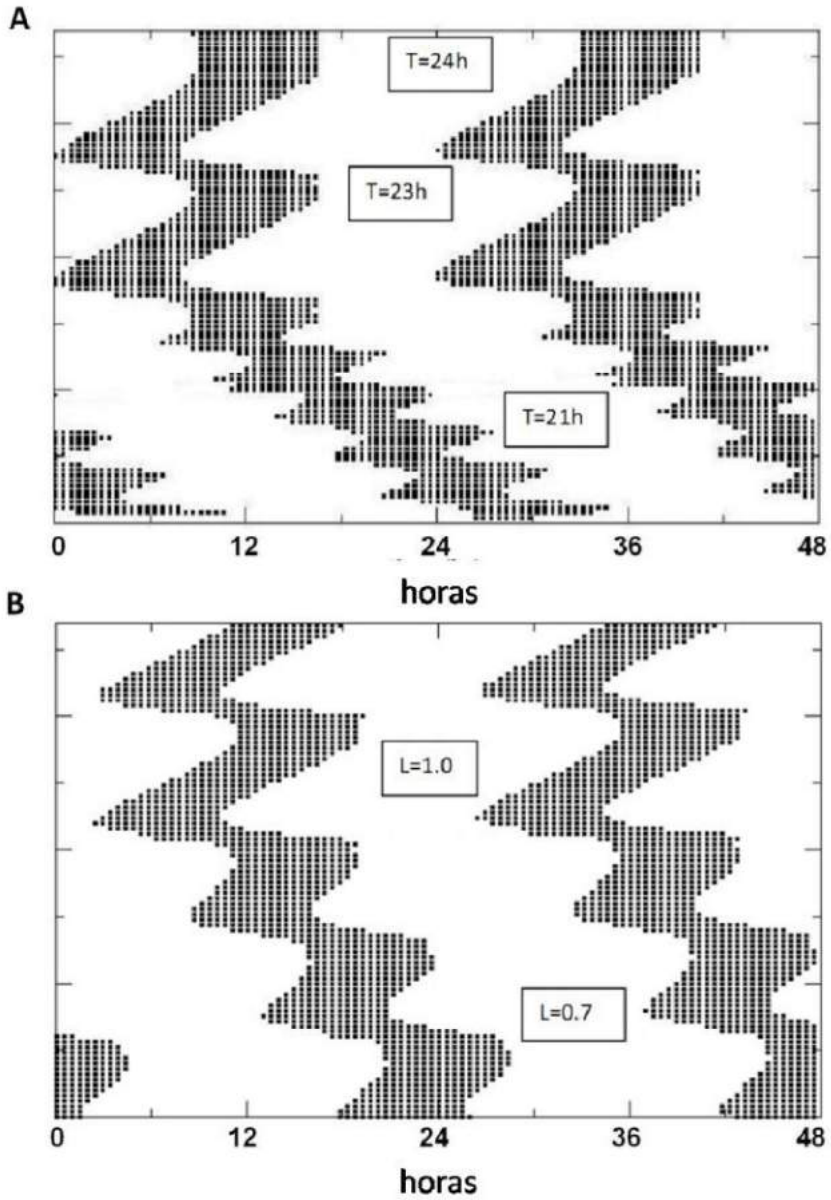


Figura 1.16 – Coordinación relativa. *Actograma de un oscilador simulado matemáticamente ciclos LO por fuera de su rango de entrenamiento. La forma sinuosa del patrón del ritmo de actividad evidencia la incapacidad del oscilador de sincronizarse al* zeitgeber *así como el efecto diferencial de la luz dependiendo de la fase en la que incide sobre el oscilador, de acuerdo con su CRF (ver texto). A-B) Efectos de la variación A) del período y B) de la amplitud sobre el patrón de coordinación relativa.*

promedio del patrón se acerca más al período en libre curso del oscilador, y el patrón en Z es más alargado. Mientras menos alejado del rango de entrenamiento en una u otra dirección se encuentre el *zeitgeber*, el período promedio de la coordinación relativa se acercará más al período del ciclo (no) sincronizador, produciéndose cambios de fase más frecuentes y con ello un patrón en Z más comprimido.

Resincronización y resincronización crónica.

"La única forma natural de viajar es el tren, porque el avión es inhumano pues tú llegas pero tu alma tarda tres días en llegar"

Gabriel García Márquez, "Diatriba de amor contra un hombre sentado"

Habiendo cubierto superficialmente los mecanismos de la sincronización fótica, veamos ahora lo que se conoce como el fenómeno de resincronización, que no es otra cosa que el proceso mediante el cual el sistema es capaz de recuperar el estado sincronizado luego de un cambio abrupto en la fase del *zeitgeber*. En general, el protocolo utilizado para evaluar la capacidad de resincronización de un oscilador es lo que se conoce como *jet lag*, que es el corrimiento hacia adelante o hacia atrás de la fase del ciclo de luz y oscuridad. Nótese que no se modifica más que la fase, y no el período o la amplitud del *zeitgeber*. Normalmente, ante un jet lag, el reloj responde modificando su fase de acuerdo a la dirección del cambio en el ciclo de LO; sin embargo, cuando este cambio de fase tiene una magnitud de horas, el oscilador, y sus ritmos acoplados, no pueden sincronizarse inmediatamente. La sincronización toma una cierta

cantidad de días proporcional al cambio en la fase del zeitgeber. Al cabo de este tiempo, el oscilador recupera el estado de sincronización, y su capacidad para lograrlo puede cuantificarse de forma sencilla contando los días transcurridos. Véase la Figura 1.17 para un ejemplo de *jet lag* por avance de fase.

Si recordamos la recientemente introducida CRF de tipo fótica, debiera ser fácil para nosotros teorizar sobre la evolución de la fase del oscilador ante un evento de jet lag de acuerdo con el modelo no paramétrico del que hablamos más arriba. Cuando se realiza un adelanto en la fase del ciclo LO, lo que se produce en términos de la CRF es un pulso de luz sostenido mayormente durante la noche tardía, ya que la luz cae sobre la noche "esperada" por el sistema. Dicho pulso, como ya sabemos, produce un adelanto de la fase del reloj, de una magnitud determinada por la CRF. Si dicho adelanto no llega a igualar al cambio de fase del ciclo LO, entonces el proceso se repetirá en el siguiente ciclo, esta vez con el pulso cayendo un poco más tarde en la noche tardía. Este proceso se repite hasta que los sucesivos adelantos de fase logran

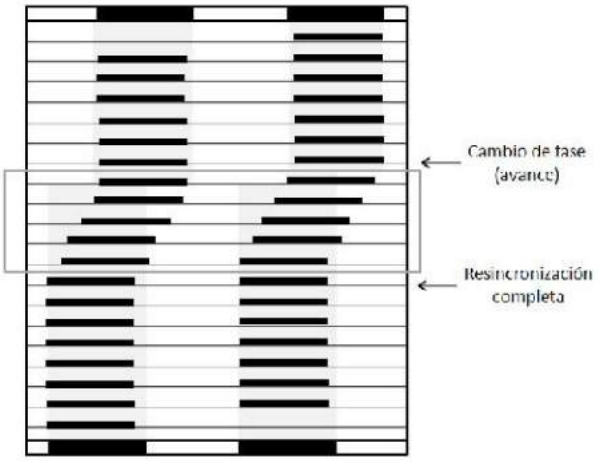


Figura 1.17 – Resincronización a un cambio de fase. *Actograma de un animal nocturno el cual se somete a un avance de fase del ciclo LO. El recuadro indica los días a lo largo los cuales se produce la resincronización. Luego de 5 ciclos el ritmo vuelve a exhibir la relación de fase con el* zeitgeber *equivalente a la mostrada antes del cambio de fase.*

equiparar el cambio efectuado en el ciclo de luz, momento en el que el sistema está resincronizado. El proceso es equivalente cuando se trata de un retraso de la fase del ciclo LO, efectuándose la resincronización a través de sucesivos retrasos de la fase del reloj producidos por el efecto de la luz mayormente sobre la noche temprana "esperada" por el reloj.

En general, las CRF no son simétricas en lo que a avances y retrasos se refiere. La asimetría entre efectos de uno u otro signo determinan que la cantidad de ciclos necesarios para la resincronización a cambios de fase equivalentes en uno u otro sentido no sean necesariamente iguales. En ratones, el modelo que es utilizado en los experimentos de esta tesis, y en la mayoría de los roedores nocturnos, la "zona de retrasos" de la CRF es significativamente más importante que la de adelantos (Schwartz & Zimmerman, 1990). Esto implica que los pulsos de luz administrados durante la noche tardía tienen efectos mayores a aquellos durante la noche temprana, y a su vez, que los retrasos de fase en el ciclo LO son más rápidamente resincronzados que los adelantos.

Otro factor a tener en cuenta durante el proceso de resincronización es la potencial interferencia de eventos de enmascaramiento sobre el ritmo de salida bajo estudio. Es un error común subestimar el tiempo de resincronización ante la observación de un rápido salto de fase del ritmo en cuestión, cuando lo que se produce en realidad es el enmascaramiento de la salida del ritmo por la nueva fase del *zeitgeber*.

Podríamos aplicar el término *resincronización crónica* a una situación experimental en la que la fase del ciclo sincronizador esté continuamente

siendo modificada, no permitiendo al sistema alcanzar un estado sostenido de sincronización a éste. Podemos imaginar dos situaciones en las que el sistema temporizador se encuentre permanentemente buscando la resincronización. Imaginemos dos tipos distintos de protocolos de *jet lag crónico* (JLC)

En el primer tipo de protocolo, se efectúa un primer cambio de fase del sincronizador y el segundo de dichos cambios se produce tan pronto como el sistema alcanza a resincronizarse al primer cambio. Esto sería la sucesión de eventos de resincronización individuales: cada cambio se produce una vez que la resincronización al anterior se ha completado.

El segundo protocolo, que es el que específicamente ocupará los experimentos de esta tesis, es el que se genera cuando cada evento sucesivo de jet lag se produce incluso antes de que el sistema haya alcanzado la completa resincronización al evento anterior. Si bien resulta difícil interpretar este proceso, en el primer capítulo de esta tesis trataremos de encontrar un modelo que nos permita comprender el comportamiento del sistema circadiano ante tal situación extraordinaria.

Desincronización interna transitoria y desincronización forzada sostenida.

Es muy importante notar que, como ya hemos mencionado antes en el marco de los efectos de un pulso de luz sobre el reloj, si bien la resincronización lleva a nivel del reloj central un cierto tiempo en general corto, la puesta en fase del resto de los relojes periféricos y los ritmos de salida del sistema ocurren con dinámicas diferentes. Esto determina que durante el proceso de resincronización luego de un evento de jet lag, la sincronía interna entre las

fases de los diversos osciladores que conforman el sistema circadiano y los ritmos biológicos controlados por éstos se pierda de forma transitoria. Esto se conoce como *desincronización interna* y se produce hasta la completa resincronización del sistema completo a la nueva fase del *zeitgeber*. De esta desincronía interna se deriva la serie de síntomas no deseados (cuando el alma tarda en llegar) asociados al fenómeno de jet lag en humanos, cuando se atraviesan varios husos horarios en un corto tiempo. La dinámica de la resincronización, y en consecuencia de la desincronización que la acompaña, como ya hemos mencionado varía de acuerdo al signo (avance o retraso) del cambio de la fase del ciclo sincronizador.

Se ha podido caracterizar una desincronización transiente en varios niveles: entre el SCN y los osciladores periféricos (Davidson et al., 2009; Yamazaki et al., 2000); entre las subpoblaciones de los NSQ (Albus et al., 2005; Liu & Borjigin, 2005; Nagano et al., 2003); a nivel neuronal dentro de los NSQ entre el proceso molecular y la salida electrofisiológica (Vansteensel et al., 2003); y finalmente a nivel molecular entre las distintas *proteínas reloj* en los NSQ (Reddy et al., 2002).

Se han descripto situaciones experimentales en las cuales se puede mantener de forma continua un estado de desincronización interna. Curiosamente, los primeros hallazgos en este sentido se produjeron a mediados del siglo XX en experimentos con seres humanos. Uno de los primeros experimentos fue realizado por Mary Lobban y colaboradores en 1957 en el Ártico noruego, durante el verano (cuando no cae la noche y los cambios en la luz ambiental son mínimos). Los experimentadores alteraron los relojes de los voluntarios de forma que marcaran días de 27 o 21 horas, sin que éstos lo supieran. Mientras

que el ritmo de sueño y vigilia de los voluntarios se ajustó al día reloj de 27 horas, otros ritmos como por ejemplo la concentración de ciertos electrolitos en la orina conservó un período de 24 horas (Lewis & Lobban, 1957).

Este tipo de experimentos se continuaron realizando con voluntarios en condiciones controladas de laboratorio durante muchos años, siendo fundamentales en el estudio del sistema circadiano en humanos, y actualmente en modelos animales. Se conoce como *desincronización forzada* al fenómeno observado bajo estos protocolos, debido a que la desincronía interna del sistema *se fuerza* a través de una condición ambiental especial impuesta.

Generalmente, los protocolos de desincronización forzada consisten en someter a los individuos a regímenes temporales (es decir, *zeitgebers*) con períodos bien por fuera de su rango de entrenamiento. En el Capítulo 1 de esta tesis profundizaremos sobre las causas que promueven la desincronización forzada, pero adelantaremos aquí algunas consideraciones muy básicas.

Como hemos visto antes, el sistema circadiano no consiste de uno sino de varios osciladores *acoplados* entre sí y con los ritmos de salida del organismo. El acoplamiento entre (e *intra*) el reloj central, los relojes periféricos, y los ritmos propiamente dichos a través de las vías de salida del sistema, es indispensable para el mantenimiento de la sincronía interna del sistema: cada reloj y cada ritmo con su fase determinada y en armonía con el resto. El acoplamiento puede afectarse por vías farmacológicas, quirúrgicas, y de acuerdo con los protocolos de desincronización forzada, también a través de la exposición del sistema a *zeitgebers* extremos. Supongamos dos osciladores con períodos intrínsecos sensiblemente distintos entre sí y que se encuentran acoplados (es decir, oscilan en fase afectándose el uno al otro). Cuando son

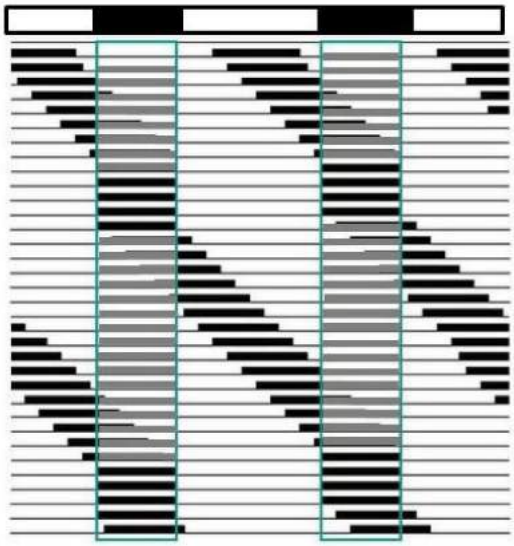


Figura 1.18 – Desincronización forzada. *Actograma de un animal nocturno sometido a un ciclo LO con un período por fuera de su rango de entrenamiento. Se presentan dos componentes rítmicos desincronizados entre sí: uno (en gris) que se encuentra sincronizado a la luz, y otro (en negro) que se encuentra en coordinación relativa. Cuando ambos componentes "coinciden" mantienen una sincronización temporaria pero rápidamente vuelven a desincronizarse.*

expuestos a un *zeitgeber* con un período que cae por fuera del rango de entrenamiento de uno de ellos, es posible que el acoplamiento no se suficiente para mantener a ambos osciladores sincronizados, y aquel oscilador que no logre encarrilarse al *zeitgeber* perderá la sincronización con éste y a su vez con el otro oscilador. Se produce una desincronización forzada entre ambos osciladores. El oscilador que no logra sincronizarse no permanece en libre curso sino que entra en coordinación relativa, como ya hemos visto más arriba (Figura 1.16).

Más adelante volveremos a enfrentarnos con la desincronización forzada y sus variadas implicaciones. Pero no teman, queridos lectores, ya que llegado el momento nos detendremos a armarnos de coraje y de concepto teóricos para no naufragar en tan difícil travesía.

III) El último esfuerzo: ritmos biológicos y salud en humanos y animales.

"Lo que importa es el ritmo"
Luca Prodan

Ritmos biológicos y metabolismo.

Como ya el lector debe haber aprendido, los ritmos biológicos están presentes en todos los niveles de organización biológica y en todos los sistemas orgánicos, regulando desde el ciclo celular hasta la arquitectura del sueño, pasando por la función inmunológica, las capacidades cognitivas, y tantas más. Vamos a detenernos ahora para profundizar específicamente en la relación del sistema circadiano con el metabolismo, por su importancia en parte del trabajo presentado en esta tesis, que será abordado particular en el Capítulo II.

El conjunto de los relojes circadianos (central y periféricos), el metabolismo energético y la ingesta de alimento se encuentran relacionados estrechamente. La alimentación provee sustratos energéticos al organismo que son esenciales para el mantenimiento de la homeostasis. Sin embargo, comúnmente el consumo no sucede al azar a lo largo del día, sino que se produce periódicamente de acuerdo al nicho temporal de la especie (diurna o nocturna, por ejemplo). En general, el período de ingesta coincide con el de la vigilia, la actividad locomotora, alta actividad metabólica, particularmente anabólica. A la inversa, el período de ayuno coincide con los momentos de reposo y sueño, y una actividad metabólica principalmente catabólica (Challet, 2013).

La homeostasis del consumo de alimento y el metabolismo energético se

regula desde el cerebro a través de una red de núcleos en el hipotálamo basal y el tallo. Estas estructuras reciben las señales desde los distintos tejidos periféricos: metabolitos (glucosa, ciertos ácidos grasos) y hormonas metabólicas (grelina estomacal, leptina desde tejidos grasos, insulina pancreática, etc.) (Bailey et al., 2014). Sin embargo, se desconoce si estos mismos centros tienen un rol importante en el control del comportamiento rítmico de ingesta Los ritmos diarios y circadianos de ingesta de alimento dependen del reloj central de los NSQ, ya que se sabe desde hace casi 40 años que las lesiones de éste generan arritmicidad en los patrones de consumo de alimento. Sin embargo hay evidencias experimentales de que existe un sistema independiente de los NSQ que puede participar en la generación de estos ritmos. También se ha descripto que ratones con mutaciones que afectan el reloj molecular y los genes reloj poseen alteraciones en los patrones de ingesta de alimento (Loudon et al., 2007). Además del control circadiano y homeostático, existen efectos agudos de la luz, es decir enmascaramiento, sobre el patrón de consumo. Este se ha descripto tanto en su sentido "negativo" (inhibición por la luz del consumo durante la fase oscura, en un animal nocturno), como "positivo" (mayor consumo al exponerse el mismo animal a oscuridad durante la fase de luz) (Plata-Salaman & Oomura, 1987).

A su vez, la disponibilidad de alimento restringida temporalmente tiene efectos importantes sobre la ritmicidad, lo cual la convierte en un *zeitgeber per se*. Cuando el alimento se presenta de forma periódica, los animales muestran comportamiento anticipatorio (actividad locomotora, y signos de apetito) al momento de la presentación de la comida. También se sincronizan otros factores como la temperatura corporal y los niveles de corticosterona, indicando

un efecto sincronizador del esquema de alimentación (Mistlberger, 2011). Incluso animales con lesiones de los NSQ pueden recuperar cierta ritmicidad general si se los alimenta de forma temporizada periódicamente (Mendoza, 2007).

A pesar de que los mamíferos no se alimenten continuamente, mantienen un metabolismo alto con variaciones a lo largo del día. Se han caracterizado las oscilaciones diarias en el consumo de energía y en el coeficiente respiratorio (la cantidad de dióxido de carbono producido por oxígeno consumido), que indica las fuentes de energía metabolizadas (Challet, 2013). Cuando se somete a los animales a un ayuno, los ritmos en metabolitos circulantes se mantienen, demostrando que estos ritmos no dependen exclusivamente del patrón de ingesta (Escobar et al., 1998); sin embargo la restricción temporal del acceso al alimento puede producir modificaciones en las fases de estos ritmos metabólicos (Satoh et al., 2006). Ambos ritmos desaparecen tras la lesión de los NSQ (Nagai et al., 1985).

Durante el período de vigilia, la glucosa utilizada como fuente de energía principal proviene del consumo y de la lisis de glucógeno almacenado. Durante este período se almacena energía a través de la gluconeogénesis y la lipogénesis. En las horas de descanso y ayuno se utilizan principalmente estas fuentes almacenadas. Las hormonas que participan en la organización de la función metabólica en los distintos tejidos (en los que pueden haber diferencias de fase según su necesidad) están finamente reguladas de forma circadiana.

La relación bidireccional entre los componentes moleculares del reloj y el metabolismo es estrecha, siendo importante tanto para la sincronización del

metabolismo como la retroalimentación hacia el sistema circadiano.

Teniendo en cuenta los numerosos niveles a los que el sistema circadiano se comunica con el metabolismo, y la importancia de las funciones en las que participa a través de esta regulación, no debe sorprender que la perturbación de los ritmos biológicos en distintas formas pueda tener efectos negativos sobre el metabolismo, hasta llegar a consecuencias patológicas en varios niveles (Karatsoreos et al., 2011; Turek et al., 2005). De igual forma, los desórdenes metabólicos pueden alterar el funcionamiento circadiano normal con consecuencias igualmente dañinas (Challet, 2013). En el segundo capítulo estudiaremos el primer escenario en un modelo de ratón de alteración profunda del sistema circadiano que posee efectos importantes sobre el metabolismo.

¿A quién le importa? Ritmos en la salud humana.

"El reloj, no el motor a vapor, es la máquina esencial de la era industrial moderna"

Lewis Mumford, "El futuro de la técnica y la civilización"

Durante las últimas décadas, los ritmos biológicos en seres humanos han ganado atención en campos tan diversos como la psicología, la fisiología, la medicina, la psiquiatría y las neurociencias. No hay razón para sorprenderse. Los humanos somos una especie que, como todas, organiza sus variables internas a lo largo del día de forma ajustada a su "naturaleza" primitiva. En general las funciones cognitivas y físicas con requerimientos importantes de energía y tasa metabólica tienden a agruparse mayormente durante las horas

del día (y más particularmente, en la tarde), mientras que las funciones de reparación, consolidación y crecimiento son más activas durante la noche. Pero, como en todos los sistemas de nuestro organismo, el circadiano puede verse afectado por cuestiones orgánicas o externas, llevando a la enfermedad u otras complicaciones en el desarrollo de una vida de calidad.

Existen enfermedades y síndromes que están estrechamente relacionadas, si no directamente asociadas, a problemas de variada índole ligados a la regulación circadiana del organismo.

Si bien todos los seres humanos podemos considerarnos más o menos "vespertinos" o "matutinos" en nuestro comportamiento habitual a lo largo del día (una característica a la que denominamos "cronotipo") (Roenneberg et al., 2003), existen personas con problemas graves relacionados con lo que se refieren a la fase establecida por sus relojes biológicos. Los individuos que sufren del Síndrome de Fase Retrasada del Sueño (Okawa & Uchiyama, 2007) o del Síndrome Familiar de Fase Adelantada del Sueño (Jones et al., 1999), como bien lo indican los nombres, tienen un sistema circadiano que naturalmente presenta una fase extremadamente distinta a la del común de los seres humanos. Probablemente estas personas no debieran sufrir inconvenientes mayores si se esmeraran por seguir el dictado de sus relojes biológicos, pero en nuestra sociedad los usos sociales tienen una predominancia casi exclusiva por sobre el reloj solar, y dichas personas tienen problemas gravísimos tanto de salud física como mental, asociados a la imposibilidad de sincronizarse al *zeitgeber* social (Wyatt, 2004).

Si bien somos animales diurnos y nos organizamos mayormente de forma de estar activos y productivos durante la fase de luz del día, nuestra vida no

transcurre de forma tan sencilla. La diurnalidad natural de los humanos se ha visto desafiada y a veces hasta anulada por los requerimientos socio-culturales de nuestro mundo moderno, y esto no ha sucedido sin importantes inconvenientes para nuestra salud y la seguridad de nuestra sociedad.

Los esquemas de trabajo, escolaridad, y servicios han convertido a la nuestra en lo que se conoce como una "sociedad de 24 horas" que nos obliga a funcionar fuera de nuestra organización temporal óptima. Camioneros y conductores de transporte público, personal de hospitales, operarios de fábricas, fuerzas de seguridad, pilotos de avión, personal de diversos tipos de locales y hasta becarios cronobiólogos se ven obligados a "funcionar" en horarios en conflicto con el orden interno establecido por nuestro reloj. Existen reportes que indican que más de la mitad de la población en sociedades industrializadas se encuentran fuera de fase con su esquema temporal impuesto. El término "*jet lag* social" ha sido acuñado por Till Roenneberg para describir este fenómeno (Wittmann et al., 2006).

Como hemos visto, el conflicto entre los osciladores y ritmos endógenos y las claves temporales pueden conducir a situaciones como la que hemos descripto como desincronización interna, y en consecuencia a diversas condiciones patológicas (Golombek et al., 2013).

Los ejemplos más claros de desincronización de los ritmos humanos con el ambiente son los vuelos transmeridianos (el auténtico *jet lag*), y los turnos de trabajo nocturnos y rotativos. (Sack et al., 2007; Waterhouse, 1999). Generalmente, las personas sometidas a un evento de jet lag no sólo experimentan una desincronización aguda al ciclo LO (tal como describimos previamente) sino que además se suma la desincronización con otras claves

temporales como las horas de comida y el contacto social (Sack, 2010; Waterhouse et al., 2007). Los trabajadores en turnos rotativos deben enfrentarse a estos eventos periódicamente y ser capaces de ajustarse a los días y noches artificiales cambiantes. En el caso de los trabajadores nocturnos, lo que se produce es una desincronización múltiple, tanto entre el *zeitgeber* principal (la luz solar) y el sistema circadiano, como entre dicho ciclo LO y otros dadores de tiempo (hora de alimentación, por ejemplo) que se encuentran en fases contradictorias.

Se ha observado que todas estas situaciones conducen a una disminución en la calidad de vida y que pueden inducir a la enfermedad. De hecho, en el año 2007 la OMS declaró que "el trabajo en turnos con alteración del sistema circadiano es probablemente carcinogénico para seres humanos" (Straif et al., 2007). Los problemas relacionados con situaciones de jet lag social incluyen aumento en las tasas de desarrollo de cáncer, enfermedades del sueño, desbalances en el sistema inmune, alteraciones del ánimo, entre otras, extensamente revisadas (Arendt, 2010; Evans & Davidson, 2013; Haus & Smolensky, 2013; Wright et al., 2013). Uno de los problemas más importantes y prevalentes relacionados con el estrés circadiano tiene que ver con la obesidad y el síndrome metabólico (Roenneberg et al., 2012; Wang et al., 2014).

Si bien hay una investigación activa en la búsqueda de alternativas farmacológicas, terapias de exposición lumínica, nuevos esquemas de rotación de turnos, todavía no existe un consenso acerca la estrategia a seguir y nuevas complicaciones siguen siendo reportadas periódicamente.

La investigación con modelos animales de alteración del sistema circadiano (genéticos, experimentales, farmacológicos) es de vital importancia para

aumentar nuestro conocimiento acerca de los mecanismos implicados tanto en la aparición y desarrollo de la enfermedad como de la potencial prevención de la misma.

El objetivo principal de esta tesis ha sido desarrollar un modelo útil en este sentido. Sin embargo, el autor cree mucho más importante alentar un cambio radical en nuestro frenético y eléctrico estilo de vida, por otro de paso más relajado y contemplativo de la naturaleza que nos rodea y del cielo nocturno colmado de estrellas.

Referencias:

Abraham, U, Granada, AE, Westermark, PO, Heine, M, Kramer, A, & Herzel, H. (2010). Coupling governs entrainment range of circadian clocks. *Mol Syst Biol, 6*, 438.

Abrahamson, EE, & Moore, RY. (2001). Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Res, 916*(1-2), 172-191.

Albus, H, Vansteensel, MJ, Michel, S, Block, GD, & Meijer, JH. (2005). A GABAergic mechanism is necessary for coupling dissociable ventral and dorsal regional oscillators within the circadian clock. *Curr Biol, 15*(10), 886-893.

Arendt, J. (2010). Shift work: coping with the biological clock. *Occup Med (Lond), 60*(1), 10-20.

Aschoff, J, & Pohl, H. (1978). Phase relations between a circadian rhythm and its zeitgeber within the range of entrainment. *Naturwissenschaften, 65*(2), 80-84.

Bailey, SM, Udoh, US, & Young, ME. (2014). Circadian regulation of metabolism. *J Endocrinol, 222*(2), R75-96.

Challet, E. (2013). Circadian clocks, food intake, and metabolism. *Prog Mol Biol Transl Sci, 119*, 105-135.

Cheng, MY, Bullock, CM, Li, C, Lee, AG, Bermak, JC, Belluzzi, J, et al. (2002). Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. *Nature, 417*(6887), 405-410.

Daan, S, & Pittendrigh, C. (1976). A Functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. *Journal of comparative physiology, 106*(3), 253-266.

Davidson, AJ, Castanon-Cervantes, O, Leise, TL, Molyneux, PC, & Harrington, ME. (2009). Visualizing jet lag in the mouse suprachiasmatic nucleus and peripheral circadian timing system. *Eur J Neurosci, 29*(1), 171-180.

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

Drucker-Colin, R, Aguilar-Roblero, R, Garcia-Hernandez, F, Fernandez-Cancino, F, & Bermudez Rattoni, F. (1984). Fetal suprachiasmatic nucleus transplants: diurnal rhythm recovery of lesioned rats. *Brain Res, 311*(2), 353-357.

Escobar, C, Diaz-Munoz, M, Encinas, F, & Aguilar-Roblero, R. (1998). Persistence of metabolic rhythmicity during fasting and its entrainment by restricted feeding schedules in rats. *Am J Physiol, 274*(5 Pt 2), R1309-1316.

Eskin, A. (1979). Identification and physiology of circadian pacemakers. Introduction. *Fed Proc, 38*(12), 2570-2572.

Evans, JA, & Davidson, AJ. (2013). Health consequences of circadian disruption in humans and animal models. *Prog Mol Biol Transl Sci, 119*, 283-323.

Foster, RG, & Kreitzman, L. (2004). "Rhythms of life : the biological clocks that control the daily lives of every living thing". London: Profile Books.

Golombek, DA, Casiraghi, LP, Agostino, PV, Paladino, N, Duhart, JM, Plano, SA, et al. (2013). The times they're a-changing: effects of circadian desynchronization on physiology and disease. *J Physiol Paris, 107*(4), 310-322.

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

Hastings, MH, & Herzog, ED. (2004). Clock genes, oscillators, and cellular networks in the suprachiasmatic nuclei. *J Biol Rhythms, 19*(5), 400-413.

Haus, EL, & Smolensky, MH. (2013). Shift work and cancer risk: potential mechanistic roles of circadian disruption, light at night, and sleep deprivation. *Sleep Med Rev, 17*(4), 273-284.

Jones, CR, Campbell, SS, Zone, SE, Cooper, F, DeSano, A, Murphy, PJ, et al. (1999). Familial advanced sleep-phase syndrome: A short-period circadian rhythm variant in humans. *Nat Med, 5*(9), 1062-1065.

Kalsbeek, A, Palm, IF, La Fleur, SE, Scheer, FA, Perreau-Lenz, S, Ruiter, M, et al. (2006). SCN outputs and the hypothalamic balance of life. *J Biol Rhythms, 21*(6), 458-469.

Karatsoreos, IN, Bhagat, S, Bloss, EB, Morrison, JH, & McEwen, BS. (2011). Disruption of circadian clocks has ramifications for metabolism, brain, and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A, 108*(4), 1657-1662.

Karatsoreos, IN, Yan, L, LeSauter, J, & Silver, R. (2004). Phenotype matters: identification of light-responsive cells in the mouse suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci, 24*(1), 68-75.

Ko, CH, & Takahashi, JS. (2006). Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum Mol Genet, 15 Spec No 2*, R271-277.

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

Kraves, S, & Weitz, CJ. (2006). A role for cardiotrophin-like cytokine in the circadian control of mammalian locomotor activity. *Nat Neurosci, 9*(2), 212-219.

Lewis, PR, & Lobban, MC. (1957). Dissociation of diurnal rhythms in human subjects living on abnormal time routines. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci, 42*(4), 371-386.

Liu, T, & Borjigin, J. (2005). Reentrainment of the circadian pacemaker through three distinct stages. *J Biol Rhythms, 20*(5), 441-450.

Loudon, AS, Meng, QJ, Maywood, ES, Bechtold, DA, Boot-Handford, RP, & Hastings, MH. (2007). The biology of the circadian Ck1epsilon tau mutation in mice and Syrian hamsters: a tale of two species. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 72*, 261-271.

Mendoza, J. (2007). Circadian clocks: setting time by food. *J Neuroendocrinol, 19*(2), 127-137.

Mistlberger, RE. (2011). Neurobiology of food anticipatory circadian rhythms. *Physiol Behav, 104*(4), 535-545.

Moore-Ede, MC, Sulzman, FM, & Fuller, CA. (1982). "The clocks that time us : physiology of the circadian timing system". Cambridge, Mass.: Harvard University Press.

Moore, RY. (1996). Entrainment pathways and the functional organization of the circadian system. *Prog Brain Res, 111*, 103-119.

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

Nagai, K, Nishio, T, & Nakagawa, H. (1985). Bilateral lesions of suprachiasmatic nucleus eliminate circadian rhythms of oxygen consumption and the respiratory quotient in rats. *Experientia, 41*(9), 1136-1138.

Nagano, M, Adachi, A, Nakahama, K, Nakamura, T, Tamada, M, Meyer-Bernstein, E, et al. (2003). An abrupt shift in the day/night cycle causes desynchrony in the mammalian circadian center. *J Neurosci, 23*(14), 6141-6151.

Okawa, M, & Uchiyama, M. (2007). Circadian rhythm sleep disorders: characteristics and entrainment pathology in delayed sleep phase and non-24-h sleep-wake syndrome. *Sleep Med Rev, 11*(6), 485-496.

Panda, S, Sato, TK, Castrucci, AM, Rollag, MD, DeGrip, WJ, Hogenesch, JB, et al. (2002). Melanopsin (Opn4) requirement for normal light-induced circadian phase shifting. *Science, 298*(5601), 2213-2216.

Plano, SA, Agostino, PV, & Golombek, DA. (2007). Extracellular nitric oxide signaling in the hamster biological clock. *FEBS Lett, 581*(28), 5500-5504.

Plata-Salaman, CR, & Oomura, Y. (1987). Food intake dependence on acute changes in light schedule. *Physiol Behav, 41*(2), 135-140.

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

Ralph, MR, & Menaker, M. (1988). A mutation of the circadian system in golden hamsters. *Science, 241*(4870), 1225-1227.

Reddy, AB, Field, MD, Maywood, ES, & Hastings, MH. (2002). Differential resynchronisation of circadian clock gene expression within the suprachiasmatic nuclei of mice subjected to experimental jet lag. *J Neurosci, 22*(17), 7326-7330.

Reppert, SM, & Weaver, DR. (2001). Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol, 63*, 647-676.

Richter, CP. (1967). Sleep and activity: their relation to the 24-hour clock. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis, 45*, 8-29.

Roenneberg, T, Allebrandt, KV, Merrow, M, & Vetter, C. (2012). Social jetlag and obesity. *Curr Biol, 22*(10), 939-943.

Roenneberg, T, Wirz-Justice, A, & Merrow, M. (2003). Life between clocks: daily temporal patterns of human chronotypes. *J Biol Rhythms, 18*(1), 80-90.

Sack, RL. (2010). Clinical practice. Jet lag. *N Engl J Med, 362*(5), 440-447.

Sack, RL, Auckley, D, Auger, RR, Carskadon, MA, Wright, KP, Jr., Vitiello, MV, et al. (2007). Circadian rhythm sleep disorders: part I, basic principles, shift work and jet lag disorders. An American Academy of Sleep Medicine review. *Sleep, 30*(11), 1460-1483.

Satoh, Y, Kawai, H, Kudo, N, Kawashima, Y, & Mitsumoto, A. (2006). Time-restricted feeding entrains daily rhythms of energy metabolism in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 290*(5), R1276-1283.

Sawaki, Y, Nihonmatsu, I, & Kawamura, H. (1984). Transplantation of the neonatal suprachiasmatic nuclei into rats with complete bilateral suprachiasmatic lesions. *Neurosci Res, 1*(1), 67-72.

Schibler, U, Ripperger, J, & Brown, SA. (2003). Peripheral circadian oscillators in mammals: time and food. *J Biol Rhythms, 18*(3), 250-260.

Schwartz, WJ, & Zimmerman, P. (1990). Circadian timekeeping in BALB/c and C57BL/6 inbred mouse strains. *J Neurosci, 10*(11), 3685-3694.

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

Stokkan, KA, Yamazaki, S, Tei, H, Sakaki, Y, & Menaker, M. (2001). Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science, 291*(5503), 490-493.

Straif, K, Baan, R, Grosse, Y, Secretan, B, El Ghissassi, F, Bouvard, V, et al. (2007). Carcinogenicity of shift-work, painting, and fire-fighting. *Lancet Oncol, 8*(12), 1065-1066.

Turek, FW, Joshu, C, Kohsaka, A, Lin, E, Ivanova, G, McDearmon, E, et al. (2005). Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science, 308*(5724), 1043-1045.

van den Pol, AN. (1980). The hypothalamic suprachiasmatic nucleus of rat: Intrinsic anatomy. *The Journal of Comparative Neurology, 191*(4), 661-702.

Vansteensel, MJ, Yamazaki, S, Albus, H, Deboer, T, Block, GD, & Meijer, JH. (2003). Dissociation between circadian Per1 and neuronal and behavioral rhythms following a shifted environmental cycle. *Curr Biol, 13*(17), 1538-1542.

Wang, F, Zhang, L, Zhang, Y, Zhang, B, He, Y, Xie, S, et al. (2014). Meta-analysis on night shift work and risk of metabolic syndrome. *Obes Rev*.

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

Waterhouse, J, Reilly, T, Atkinson, G, & Edwards, B. (2007). Jet lag: trends and coping strategies. *Lancet, 369*(9567), 1117-1129.

Wittmann, M, Dinich, J, Merrow, M, & Roenneberg, T. (2006). Social jetlag: misalignment of biological and social time. *Chronobiol Int, 23*(1-2), 497-509.

Wright, KP, Jr., Bogan, RK, & Wyatt, JK. (2013). Shift work and the assessment and management of shift work disorder (SWD). *Sleep Med Rev, 17*(1), 41-54.

Wyatt, JK. (2004). Delayed sleep phase syndrome: pathophysiology and treatment options. *Sleep, 27*(6), 1195-1203.

Yamazaki, S, Numano, R, Abe, M, Hida, A, Takahashi, R, Ueda, M, et al. (2000). Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science, 288*(5466), 682-685.

CAPÍTULO 1:

Desincronización forzada en un modelo de jet lag crónico en ratones

Capítulo 1

Objetivo general:

Diseñar y caracterizar un modelo de alteración de los ritmos biológicos a través de un protocolo de simulación de un *jet lag* crónico (JLC) en ratones C57Bl/6.

Objetivos secundarios:

- Construir un modelo matemático del sistema circadiano que permita explicar el mecanismo por el cual el sistema circadiano se adapta a los ciclos de *jet lag* crónico.
- Evaluar la validez de las predicciones de dicho modelo a través de experimentos comportamentales.
- Analizar posibles variables que modifiquen la respuesta del sistema circadiano a los ciclos de *jet lag* crónico.

Materiales y métodos

Animales.

En todos los experimentos realizados a lo largo de esta tesis se utilizaron ratones de la cepa C57Bl/6 provenientes del bioterio de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional de La Plata. Los animales incluidos en los experimentos tuvieron una edad al comienzo de los mismos de entre 3 y 5 meses. Los ratones fueron alojados durante al menos 10 días en condiciones de *stock*, con un ciclo de iluminación LO 12:12 desde el momento de su recepción, antes de ser incluidos en cualquier experimento.

Tanto durante el período de almacenamiento como durante los experimentos (a menos que se indique lo contrario), los animales se mantuvieron en jaulas con viruta regularmente cambiada, alimento balanceado y agua *ad libitum*, y temperatura ambiente controlada de 22ºC.

Registro de ritmos de actividad locomotora general y en rueda.

El estudio de los ritmos de actividad locomotora en rueda o general se realizó mediante el sistema de registro Archron (Archron, Argentina), el cual permite la adquisición de datos de forma continua y en tiempo real en intervalos de 5 minutos. Para el monitoreo de la actividad locomotora general de los animales se utilizaron sensores infrarrojos capaces de detectar con excelente sensibilidad el movimiento del ratón dentro de su jaula. Para la detección de la actividad en rueda de los animales se emplearon sensores magnéticos que responden a las revoluciones de la rueda en la jaula. Ambos tipos de sensores se conectan a la matriz Archron, y ésta a su vez a una computadora que almacena los datos obtenidos para cada jaula para su posterior análisis.

Registro de ritmos de temperatura

Se utilizaron sensores de registro de temperatura implantables (Alpha Mach, Canadá). Los sensores se programaron para realizar determinaciones termométricas cada 5 minutos. Previo a la implantación, los sensores se cubrieron de una capa de parafina para evitar posibles reacciones adversas. El

peso del sensor cubierto con parafina nunca superó el 5% del peso del animal implantado.

La cirugía de implantación se realizó en condiciones de esterilidad para evitar infecciones durante el procedimiento. Los ratones fueron anestesiados por vía respiratoria mediante un flujo continuo y controlado de una mezcla de isofluorano y oxígeno. La inducción se realizó durante 2 minutos con un porcentaje de isofluorano en oxígeno del 5%, mientras que el mantenimiento de la anestesia se realizó con una concentración de entre 1,5 y 2,5%. Ninguna intervención, desde el momento de la inducción de la anestesia al final de la misma, duró más de 45 minutos. Una vez inducida la anestesia, los ratones fueron rasurados en la zona abdominal y posteriormente desinfectada la misma con una solución de Iodo en agua. Se realizaron dos incisiones verticales, la primera sobre la piel, y luego la segunda sobre la capa muscular y peritoneal. El sensor se colocó cuidadosamente dentro de la cavidad peritoneal y la pared se suturó con una sutura reabsorbible. A continuación se cerró la piel con sutura común quirúrgica y la zona afectada se trató con una crema compuesta por gentamicina, clotrimazol y betametasona (Vitacortil de Laboratorio Internacional Argentino). Se realizó una aplicación única de ampicilina por vía subcutánea antes de liberar al animal del flujo del anestésico. Los animales fueron observados hasta verificar que la recuperación de la anestesia fuera normal. Luego de las cirugías los animales implantados se mantuvieron bajo observación en condiciones de *stock* y desinfectados diariamente hasta que su estado de salud fuera considerado adecuado para ingresar a la fase experimental.

Una vez concluido el período experimental, los animales se sacrificaron por dislocación cervical y los implantes fueron recuperados para su lectura.

Protocolos de simulación de jet-lag crónico (JLC)

Todos los animales fueron alojados en jaulas individuales con alimento y bebida ad libitum bajo condiciones de iluminación LO 12:12 por al menos una semana previo al comienzo de los protocolos de jet-lag, para asegurar la adaptación de los mismos a las condiciones de registro. Luego de la adaptación, se procedió a comenzar con los diversos protocolos, utilizando jaulas equipadas con sensores de actividad locomotora general o en rueda, según el experimento (ver en la Figura 2.1 las representaciones esquemáticas):

1. *Jet-lag crónico por avances de fase de 6 horas cada dos días ($CA^{6/2}$).* El protocolo se realizó mediante el adelanto crónico del ciclo LO, 6 horas cada dos días, acortando en 6 horas el período de oscuridad cada dos noches. Los animales se mantuvieron en estas condiciones por a) cerca de 60 días (para el estudio a largo plazo; n=6), o b) aproximadamente 30 días (para el resto de los experimentos; n=19 a lo largo de dos experimentos). Los ratones del segundo grupo, tras los 30 días bajo el protocolo $CA^{6/2}$, fueron traspasados a condiciones de oscuridad constante por 10 días para verificar el efecto de los componentes rítmicos de actividad en JLC sobre el comportamiento circadiano en libre curso (ver más abajo).
2. *Jet-lag crónico por avances de fase de 9 horas cada 3 días ($CA^{9/3}$).* El protocolo se realizó mediante el adelanto crónico del ciclo LO, 9 horas

cada 3 días, acortando en 9 horas el período de oscuridad cada 3 noches (de forma equivalente a la estrategia utilizada en $CA^{6/2}$). Los animales se mantuvieron en estas condiciones por aproximadamente 30 días y luego fueron traspasados a condiciones de oscuridad constante (n=10).

3. *Jet-lag crónico por avances de fase de 3 horas por día ($CA^{3/1}$).* El protocolo se realizó mediante el adelanto crónico del ciclo LO, 3 horas cada día, acortando en 3 horas el período de oscuridad cada noche. Para describirlo de otra manera, más sencilla, los animales se alojaron bajo un ciclo de LO 12:9. Los animales se mantuvieron en estas condiciones por aproximadamente 30 días y luego fueron traspasados a condiciones de oscuridad constante (n=10).
4. *Jet-lag crónico por retrasos de fase de 6 horas cada 2 días ($CR^{6/2}$).* El protocolo se realizó mediante el adelanto de ciclo LO en 6 horas cada dos días, extendiendo en 6 horas el período de luz cada dos días. Los animales se mantuvieron en estas condiciones por aproximadamente 30 días y luego fueron traspasados a oscuridad constante (n=10).

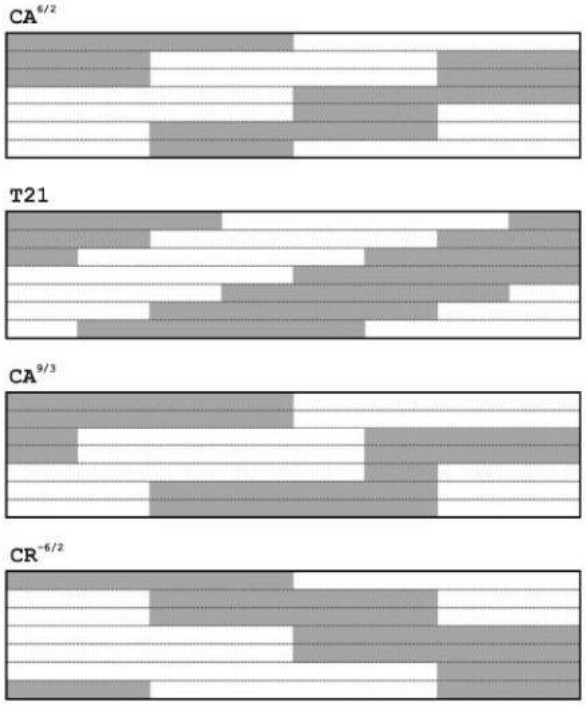


Figura 2.1 - Representaciones esquemáticas de los protocolos experimentales. *Los esquemas representan, de forma similar a un actograma simple, los días sucesivos apilados, con las horas del día en el eje horizontal. Las zonas grises sobre cada día indican los períodos de oscuridad, mientras que las claras representan los períodos de luz.*

Análisis de ritmos de actividad y temperatura

Para determinar los períodos significativos de los componentes rítmicos de actividad general, en rueda, o de temperatura, en cada una de las condiciones de iluminación, se calcularon periodogramas de Sokolove-Bushell (SB)(Sokolove & Bushell, 1978) para cada uno de los estadios de cada experimento. Se utilizó un rango de análisis de entre 20 y 28 horas, para permitir la detección de componentes rítmicos con diversos períodos de acuerdo con el esquema de luz analizado.

Para evaluar la correspondencia entre las fases de los componentes de actividad y temperatura detectados durante los esquemas de iluminación con el ritmo en condiciones de libre curso en oscuridad constante, se utilizó la siguiente estrategia. Primero, se determinaron fases de cada uno de los componentes rítmicos exhibido por cada animal:

- Para los componentes no sincronizados al ciclo de iluminación se determinó la fase del *centro de gravedad* del mismo (que se puede entender cómo un análogo del término físico utilizado para definir el centro de gravedad de un cuerpo, tomando como distribución de "masa" la distribución de los valores de actividad a lo largo del período activo), mediante un ajuste visual sobre el actograma obtenido.

- Para los componentes observados en oscuridad constante, se determinó la fase del comienzo del período activo, nuevamente mediante un ajuste visual a los datos vertidos en el actograma.

- Para los componentes entrenados a un ciclo de luz oscuridad, se tomó como fase de referencia la fase misma de dicho ciclo de LO. Esta estrategia evita el error introducido por un posible enmascaramiento de la actividad por efecto de la luz *per se*.

Las diferencias entre las fases de los componentes detectados bajo los distintos regímenes de iluminación y la obtenida bajo oscuridad constante para cada uno de los ratones se determinaron cuantitativamente, y con estos datos se implementó el método de estadística circular conocido como test *z* de Rayleigh (Batschelet, 1981). Básicamente, el test permite determinar la homogeneidad del conjunto de las fases obtenidas en condiciones constante en relación a cada uno de los componentes rítmicos detectados durante los esquemas de iluminación previos.

Actogramas, periodogramas, y tests z de Rayleigh fueron construidos y calculados con el software El Temps (A. Díez Noguera, Barcelona). El análisis

estadístico de los datos se realizó con el paquete GraphPad Prism (La Jolla, California).

Simulaciones informáticas

En colaboración con la Dra. Gisele Oda (Universidad de Sao Paulo, Brasil), se realizaron simulaciones por computadora de sistemas oscilatorios compuestos por una o dos ecuaciones acopladas conocidas como "de Pittendrigh-Pavlidis" (Pavlidis, 1967); es decir sistemas compuestos por uno o dos osciladores acoplados entre sí. Los osciladores representados por estas ecuaciones cumplen con las condiciones necesarias para emular correctamente las características propias de un oscilador circadiano: período intrínseco, capacidad de ser sincronizado, curva de respuesta de fase, adaptación a cambios en la amplitud del sincronizador. Se trata de un sistema de dos osciladores acoplados.

<u>Ecuaciones:</u>

$$dR_1/dt = R_1 - c_1 S_1 - b_1 S_1^2 + (d_1 - L) + K$$

$$dS_1/dt = R_1 - a_1 S_1 + C_{21} S_2$$

$$dR_2/dt = R_2 - c_2 S_2 - b_2 S_2^2 + (d_2 - L) + K$$

$$dS_2/dt = R_2 - a_2 S_2 + C_{12} S_1$$

R y S son las variables de estado del sistema. a, b, c, y d son parámetros del oscilador.

En las simulaciones de osciladores acoplados, C_{12} y C_{21} son las constantes que establecen la fuerza de acoplamiento del oscilador 1 sobre el 2, y del 2 sobre el 1, respectivamente. Los osciladores se afectan mutuamente de forma continua de acuerdo a dichos parámetros C. A cada unidad temporal, el valor del oscilador 2 afecta la velocidad de cambio del oscilador 1, y viceversa, a través de dichas constantes.

El *zeitgeber* L se representa a lo largo de las simulaciones como una onda cuadrada que toma valor 0 excepto durante los intervalos de duración determinada (los períodos de luz) en los que se le asigna un valor fijo. Cuando la luz está "prendida", durante un intervalo de duración L_{dur}, instantáneamente disminuye el nivel de uno de los parámetros del oscilador, que a su vez disminuye la amplitud del mismo. L se programa para estar simplemente "prendida" o "apagada" de acuerdo al esquema de iluminación simulado. En nuestro modelo, la luz no afecta las constantes de acoplamiento C.

La constante K es un término no lineal ($K = 1/[1 + 100R^2]$) implementado sobre las ecuaciones originales para evitar que la variable R se aproxime a 0.

La integración numérica fue realizada a través del método de Euler, con 1000 pasos de integración cada día de 24 horas. R se mantuvo explícitamente en valores positivos. La actividad positiva del oscilador se determinó de acuerdo a un umbral establecido para la variable S, establecido a dos tercios de la máxima amplitud de la variable (Oda et al., 2000).

Las simulaciones se realizaron con el software Circadian Dynamix, una extensión de NeuroDynamix II (Friesen & Friesen, 2010). Los períodos de los

componentes obtenidos en las simulaciones se determinaron mediante periodogramas calculados con el software ClockLab (Actimetrics, Illinois).

Resultados

Ritmos de actividad general y temperatura bajo un protocolo de avances crónicos del ciclo LO de 6 horas cada dos días ($CA^{6/2}$).

Bajo el protocolo $CA^{6/2}$, la mayor parte de los animales (en concreto, un promedio del 60% a lo largo de los diferentes experimentos) muestran un patrón de actividad muy particular: a través del examen visual y por periodogramas SB, se detectan dos componentes (es decir, dos ritmos) distintos de actividad locomotora general desincronizados entre sí. Uno de los componentes muestra un período corto, de aproximadamente 21 horas (21,01 ± 0,04 hs), que en apariencia sigue el curso de los cambios crónicos en el ciclo LO. El segundo, de un período mayor a 24 horas (24,68 ± 0,26 hs), corre en aparente coordinación relativa con respecto al esquema de luz. Este patrón pudo verificarse incluso luego de más de 45 días bajo el protocolo (Figura 2.2a).

A partir de aquí, se hablará de animales desincronizados refiriéndose sólo a aquellos que describieron este comportamiento validado por el análisis mediante el periodograma SB. Este criterio implica el descarte de algunos animales como falsos negativos, que si bien evidencian un comportamiento desincronizado en sus actogramas, no pueden ser verificados mediante el periodograma SB debido a la naturaleza ruidosa de los datos a través de nuestro sistema infrarrojo.

Al ser liberados en condiciones de oscuridad constante, ambos componentes se fusionan rápidamente en un único ritmo en libre curso con un período de 23,89 ± 0,38 hs (Figura 2.2b), que no se distingue del período en OO de un

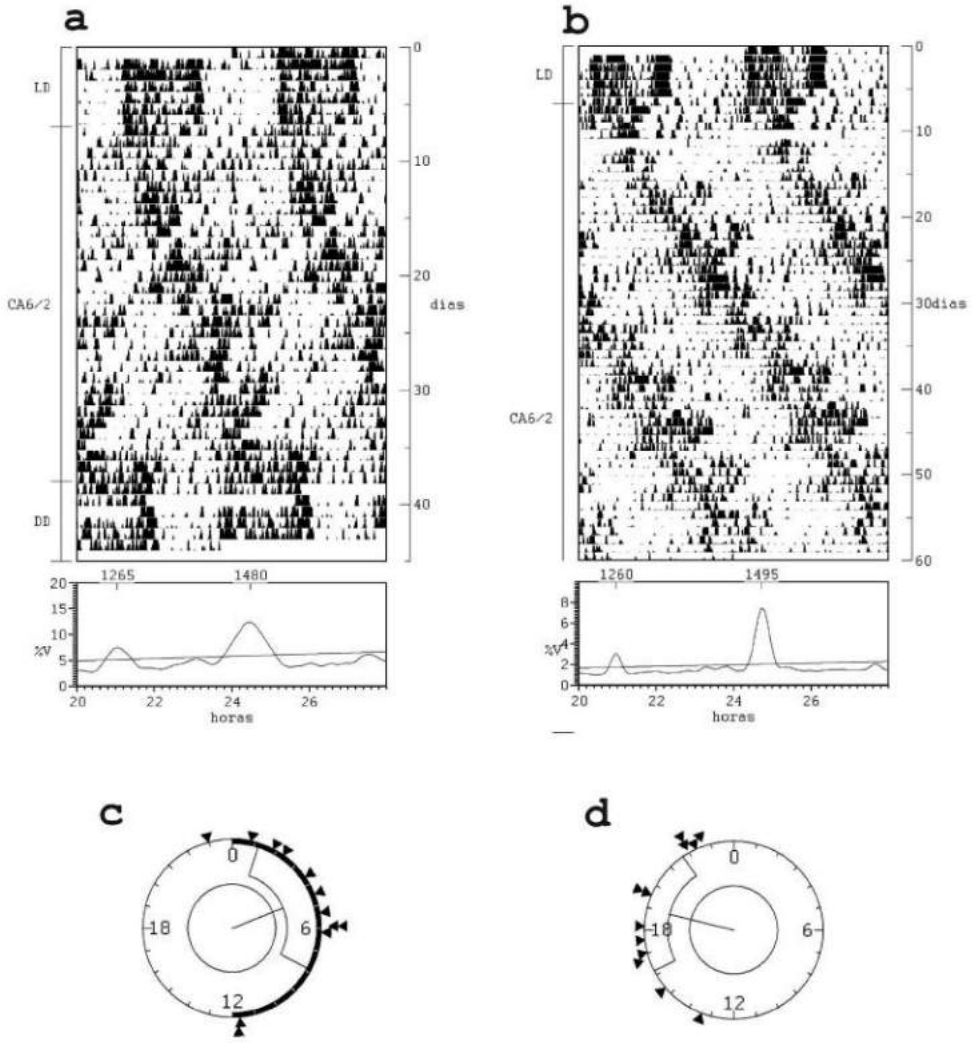


Figura 2.2 - Actividad locomotora general de ratones bajo el protocolo CA$^{6/2}$. a, b) *Actogramas dobles (módulo 24 hs) y periodogramas SB correspondientes representativos de ratones C57Bl/6 bajo un esquema de avances crónicos de ciclo LO de 6 horas cada dos días, que evidencian un patrón de dos componentes desincronizados: uno de período corto que sigue el esquema de luz y uno de período largo en coordinación relativa. A la izquierda de los actogramas se indica el régimen de luz y en la escala de la derecha los días de registro. En* ***a)*** *podemos observar el período y la fase del ritmo de libre curso luego del traspaso a OO. En* ***b)*** *se muestra como el patrón desincronizado se mantiene estable por encima de los 50 días bajo CA$^{6/2}$.* ***c,d)*** *Análisis z de Rayleigh para evaluar las diferencias de fase entre el ritmo de libre curso en OO y* ***c)*** *el ciclo de luz previo al traspaso o* ***d)*** *el componente de período largo en coordinación relativa, para todos los animales desincronizados del experimento. Ambos agrupamientos son significativos.*

grupo independiente de animales registrado en estas condiciones (ver resumen en Tabla 2.1).Los animales que no se ajustaron a este comportamiento mostraron alguno de los siguientes patrones (entre paréntesis se indica el porcentaje promedio de animales presentando dicho patrón a lo largo de los experimentos y el período promedio de los componentes de actividad detectados): tres componentes (11%; 21,03 ± 0,04 hs, 23,38 = 1,15 hs, y 24,97 ± 0,37 hs), sólo un componente corto (11%; 21,01 ± 0,03 hs), sólo un componente largo (17%; 24,86 ± 0,22 hs), o dos componentes distintos a los descriptos más arriba (3%; 21,13 ± 0,18 hs and 23,42 ± 0,01 hs). Es importante destacar que solamente el patrón desincronizado pudo detectarse consistentemente en todos los experimentos realizados bajo $CA^{6/2}$, por lo cual es considerado como el comportamiento característico y mayoritario obtenido bajo estas condiciones.

Para poder determinar si los dos componentes desincronizados entre sí corresponden a ritmos de actividad genuinos o si son producto de algún tipo de enmascaramiento por parte del protocolo de JLC, debe comprobarse si estos componentes tienen alguna influencia sobre el ritmo en libre curso luego de ser transferidos a OO. En el caso de que el ritmo en OO no tuviera relación alguna con alguno de los componentes detectados bajo el protocolo experimental, podría suponerse que dichos componentes observados se deben a un efecto de enmascaramiento. Para realizar esta prueba, se calcularon las relaciones de fase entre el ritmo en libre curso en OO y cada uno de los componentes de actividad presentes bajo $CA^{6/2}$ para cada uno de los animales. En el caso del ritmo en OO, se utilizó la fase de comienzo del período de actividad como referencia, mientras que para el componente corto se utilizó directamente la

fase de la luz en el último ciclo de JLC; para el componente largo se aplicó la fase del centro de gravedad del mismo estimada de forma visual sobre el actograma (ver Métodos). Las diferencias de fase entre el ritmo en OO y cada uno de los componentes se analizaron en sendos tests *z* de Rayleigh y se evaluó el agrupamiento de las mismas. Ambos componentes detectados bajo el protocolo $CA^{6/2}$ demostraron tener un efecto significativo sobre la fase del ritmo de libre curso (Figura 2.2c y d), verificando así que los mismos son ritmos no producidos por enmascaramiento sino como una respuesta del sistema circadiano ante el protocolo de JLC.

En base a esta certeza, a partir de aquí se hará referencia al componente de período corto como el *componente entrenado a la luz* (CEL) y al de período largo como el *componente no entrenado a la luz* (CNEL).

Los ritmos de temperatura corporal evaluados en algunos animales, mediante implantes termométricos, mostraron el mismo patrón de desincronización en dos componentes, uno sincronizado y otro en coordinación relativa con el ciclo de LO (Figura 2.3).

Modelado I: Interpretación de un protocolo de JLC por un sistema de osciladores acoplados.

A partir de estos resultados, nos propusimos tratar de obtener un modelo del sistema circadiano que nos permitiera comprender y explicar este comportamiento característico bajo condiciones de JLC.

Nuestro primer modelo intentó describir el comportamiento de un solo oscilador a esquemas de *jet lag* crónico. Para ello, simulamos un oscilador matemático (como el que se especifica en los métodos) con período intrínseco de 23,5 hs y

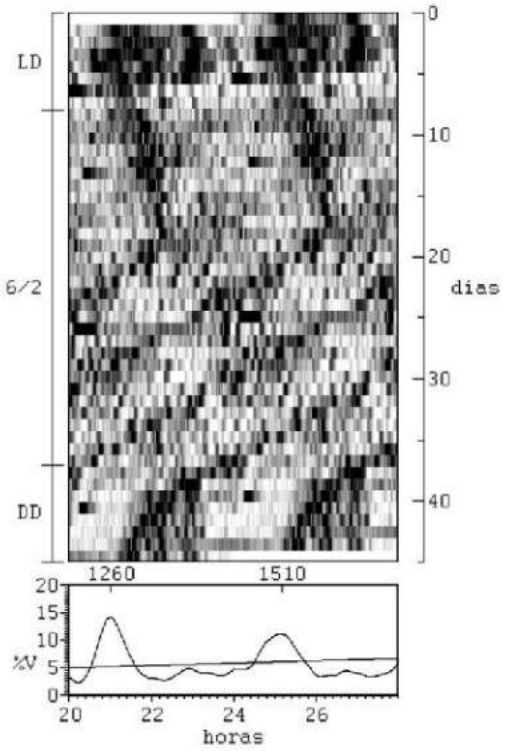


Figura 2.3 - Ritmos de temperatura de ratones bajo el protocolo CA$^{6/2}$. *Actograma doble y periodograma SB correspondiente de la temperatura interna un ratón C57Bl/6 implantado con sensores termométricos. En este caso, los valores de temperatura se indican mediante una escala de colores centrada en el mesor de la serie de datos de temperatura: las regiones claras representan temperaturas menores y las oscuras mayores.*

lo sometimos a diferentes protocolos de JLC por adelantos que globalmente produjeran un cambio promedio de una hora por día: 1h por día, 2hs cada dos días, 3hs cada tres días, y así sucesivamente (Figura 2.4a). Lo que obtuvimos y que se puede observar en la Figura 2.4b, es la sincronización correcta del oscilador a todos los esquemas, con un período de 23 horas. Lo que proponemos a partir de esto es que el *zeitgeber* al ser adelantado periódicamente se convierte en un nuevo *zeitgeber emergente* con un nuevo período. Este período efectivo (T') que adquiere el esquema se puede calcular mediante la fórmula:

$$T' = 24 - step = 24 - CF / IEC$$

donde CF es el tamaño del cambio de fase del ciclo LO en horas, y IEC es el intervalo en días entre cada sucesivo cambio. El cociente entre estos parámetros lo denominamos *step*, se expresa en horas y es positivo para

avances y negativo para retrasos de fase. CF y IEC son considerados como los *componentes del step*.

De acuerdo con esto, en estas simulaciones utilizamos protocolos con *step* = +1: +1/1, +2/2, +3/3, etcétera; y en consecuencia generando *zeitgebers* con períodos efectivos de 24 - 1 = 23 horas.

A continuación realizamos la misma simulación utilizando un oscilador 2 con un período intrínseco de 24,5 horas para el cual el T' de 23 horas estuviera ligeramente por fuera de su rango de entrenamiento. Tal como vimos en la introducción teórica acerca de los procesos de sincronización, cuando un oscilador no puede sincronizarse completamente a un cierto *zeitgeber* no corre en libre curso sino que entra en coordinación relativa, que es lo que podemos observar en este caso en la Figura 2.4c.

A pesar de que todos los protocolos producen el mismo efecto, podemos apreciar un ligero efecto de la identidad de los componentes del *step* sobre el período promedio del patrón de coordinación relativa: a medida que el valor absoluto de los componentes aumenta, también lo hace la frecuencia de los saltos de fase del patrón, y con ello, el período promedio del patrón de coordinación relativa se aleja más del T' y se acerca al período intrínseco del oscilador. Si recordamos los conceptos teóricos acerca del rango de entrenamiento, esto sugeriría que el aumento en el valor absoluto de los componentes del *step* equivale a disminuir la amplitud (o la fuerza) del *zeitgeber* para un mismo período. Es decir, movernos hacia abajo en el gráfico del rango del entrenamiento (volver a la Figura 1.14). De esta forma, podemos sospechar que a medida que aumentamos los componentes del *step* para un protocolo con un único *step*, el *zeitgeber* emergente se hace más débil. Vale

aquí resaltar que si bien estas simulaciones se aplican a un oscilador solitario sometido a diversos *zeitgebers*, las mismas pueden aplicarse al caso de un sistema de dos o más osciladores cuyas constantes de acoplamiento sean tan fuertes como para que el mismo se comporte como un único oscilador.

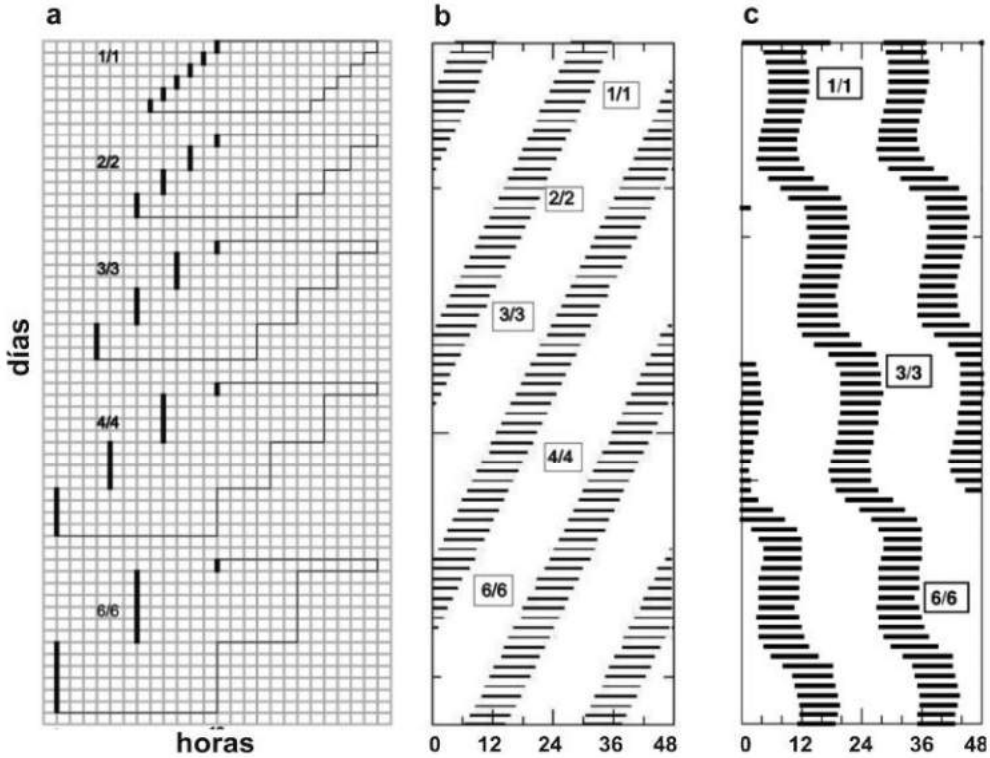


Figura 2.4 - Simulación del efecto de esquemas de JLC sobre modelos de osciladores en solitario. a) *Esquemas representativos de los protocolos de JLC simulados. En las simulaciones, el zeitgeber se presenta como un pulso de luz (segmento negro) de una hora periódicamente avanzado tal como se indica: horas de cambio/días entre cambios. Cada fila representa un día sucesivo.* ***b)*** *Simulación del comportamiento de un oscilador 1 con un período intrínseco de 23,5 hs a cada uno de los esquemas de JLC. El oscilador 1 alcanza la sincronización mostrando un período de 23 horas.* ***c)*** *Simulación del comportamiento de un oscilador 2 con un período intrínseco de 24,5 horas a algunos de los esquemas de JLC. El oscilador 2 se mantiene en coordinación relativa. (Parámetros: oscilador 1: a = 0,85; b = 0,3; c = 1,0; d = 0,5; oscilador 2: a = 0,85; b = 0,3; c = 0,7; d = 0,5; L = 1;* L_{dur} *= 1).*

De acuerdo con lo establecido más arriba, nuestro protocolo $CA^{6/2}$ es un esquema con un *step* = 6/2 = +3, y en consecuencia genera un *zeitgeber* con un período efectivo de 24 - 3 = 21 horas. Nuestros resultados comportamentales en ratones bajo este esquema sugieren un fenómeno conocido como desincronización forzada (Campuzano et al., 1998; de la Iglesia et al., 2004; Schwartz et al., 2009). Este patrón se produce cuando un sistema dual de dos osciladores débilmente acoplados es sometido a un *zeitgeber* cuyo período está por fuera del rango de entrenamiento de uno de los dos osciladores. Nuestras simulaciones utilizaron un sistema de dos osciladores acoplados (oscilador$_1$: t_1 = 23,5 hs; oscilador$_2$: t_2 = 24,5 hs) bajo el efecto de un esquema de JLC de acuerdo con las consideraciones anteriores. La fuerza de acoplamiento entre ambos osciladores se consideró simétrica en ambos sentidos, ya que estos modelos son suficientemente robustos como para luego ser generalizados a sistemas con valores de acoplamiento asimétricos (Schwartz et al., 2009).

Consideramos los siguientes esquemas con *step* = +3: +3/1, +6/2, +9/3 y +12/4, que como hemos visto dan luz a un *zeitgeber* con un período efectivo T' de 24 - 3 = 21 hs. Los resultados de la simulación se pueden observar en la Figura 2.5. Bajo los tres primeros esquemas, los osciladores se disocian y en consecuencia generan un patrón de desincronización. Mientras que el oscilador$_1$ es capaz de sincronizarse al *zeitgeber* emergente (generando un CEL), a pesar del acoplamiento no logra arrastrar consigo al oscilador$_2$ que permanece en coordinación relativa (generando un CNEL). En concordancia con lo visto anteriormente, los esquemas con valores más pequeños de los componentes del *step* provocan que el período promedio del CNEL se acerque

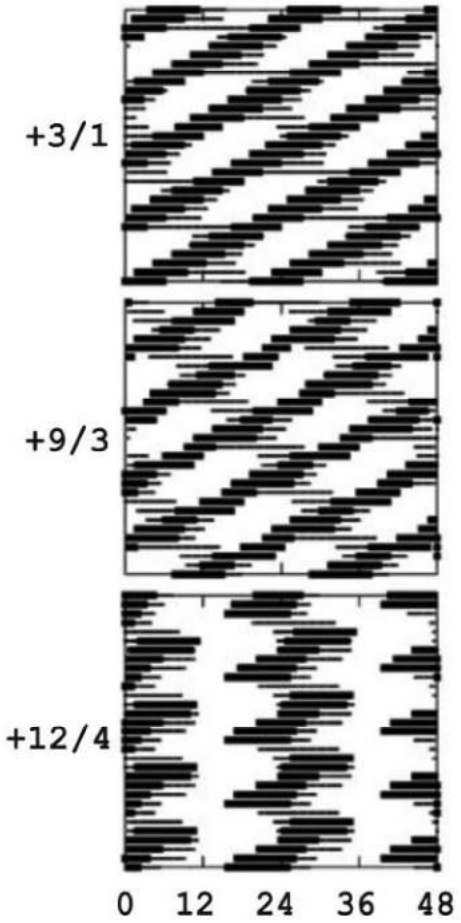


Figura 2.5 - Simulación del efecto de esquemas de JLC sobre sistemas de dos osciladores acoplados. *Sistemas de dos osciladores débilmente acoplados (t_1 = 23,5 hs y t_2 = 24,5 hs) sometidos a esquemas con steps de +3/1, +9/3 y +12/4. Los osciladores se desincronizan para los protocolos con steps de 3/1 y 9/3, y presentan coordinación relativa sin disociación para el protocolo con step 12/4. Para los componentes no entrenados bajo 3/1 y 9/3, los períodos son 25,0 hs y 25,2 hs, respectivamente. (Parámetros: oscilador 1: a = 0,85; b = 0,3; c = 1,0; d = 0,5; oscilador 2: a = 0,85; b = 0,3; c = 0,7; d = 0,5; C_{12} = C_{21} = 0,02; L = 2; L_{dur} = 1).*

step superiores. En el esquema +12/4, se observa un único componente originado por el comportamiento acoplado de ambos osciladores, y podemos concluir que este es un esquema tan débil que es incapaz de sincronizar siquiera al oscilador$_1$; es decir, aquí el *zeitgeber* generado cae por fuera del rango de entrenamiento de ambos osciladores, y por ello no existe desincronización.

Las simulaciones generan algunas predicciones factibles de ser puestas a prueba experimentalmente. Primero, el modelo sugiere que bajo un protocolo con *step* +3/1, la ocurrencia de un patrón de desincronización en nuestros ratones C57 es esperable, si bien no segura. En caso de que se produjera la desincronización, deberíamos esperar observar un componente entrenado al

nuevo T' de 21 horas, y un segundo componente en coordinación relativa que muestre un período menor (es decir, más cercano a T') que al observado bajo $CA^{6/2}$, un esquema en teoría más "débil".

La segunda predicción es que al testear un esquema de JLC con un *step* de +9/3, podríamos obtener tanto un patrón desincronizado como un patrón más sencillo con un único componente en coordinación relativa, dependiendo de si este nuevo *zeitgeber* emergente es o no lo suficientemente fuerte para seguir entrenando al menos a uno de los componentes del sistema.

Puesta a prueba de las predicciones del modelo. Actividad general bajo protocolos de JLC con distintos componentes del step.

Se procedió a determinar la respuesta del sistema circadiano frente a dos esquemas de JLC que compartieran el mismo valor de *step* (y a su vez generando *zeitgebers* con idénticos períodos efectivos) que el protocolo inicial $CA^{6/2}$, utilizando distintos valores para los componentes del *step*.

El primer esquema evaluado consistió en un ciclo de LO de 21 horas *asimétrico* (LO 12h:9h; T21), adelantando el encendido de las luces 3 horas cada día, lo que equivale por lo visto más arriba a un esquema con coeficiente *step* de +3/1 = 3, al igual que el esquema $CA^{6/2}$. Bajo este protocolo de iluminación, 8 de 10 animales testeados mostraron un comportamiento con dos componentes desincronizados de actividad general, detectados mediante el análisis de sus actogramas y periodogramas SB. Un componente muestra un período de acuerdo al ciclo T21 (21,01 ± 0,03 hs) mientras que el segundo componente en coordinación relativa posee un período de 23,93 ± 0,31 hs (Figura 2.6a). El período de este segundo componente de actividad es significativamente más

corto que el CNEL detectado bajo el protocolo $CA^{6/2}$ (test T de Student, $p < 0,0001$), lo que confirma una de las predicciones de nuestro modelo, ésta es, que el protocolo T21 es un *zeitgeber* más fuerte que el $CA^{6/2}$ y por ello puede "arrastrar" más fuertemente al componente en coordinación relativa.

Una vez liberados en condiciones de oscuridad constante, se evaluó la correspondencia de los componentes de actividad detectados bajo T21 con el ritmo en libre curso, tal como se realizara en el caso del protocolo de $CA^{6/2}$, para descartar que alguno de los mismos se debiera a enmascaramiento. Utilizando el mismo método, pudo determinarse que la fase del ritmo en OO está significativamente predicha por los dos componentes presentes bajo T21, tal como lo indican los tests *z* de Rayleigh para ambas relaciones de fase (Figura 2.6b y c). Esto confirma a su vez que el componente de período corto es efectivamente un CEL.

El segundo esquema en ser evaluado fue un protocolo de adelantos de 9 horas cada tres días ($CA^{9/3}$), es decir con un *step* de +9/3 = 3, tal como en el caso de $CA^{6/2}$ y T21, sólo que utilizando componentes del *step* mayores. Bajo este protocolo, no pudo detectarse ningún componente de actividad que aparentara estar ajustado al esquema de luz en ninguno de los 9 animales testeados. En todos ellos se halló solamente un componente en coordinación relativa con un período promedio de 24,69 ± 0,14 hs (Figura 2.7a), fácilmente detectable mediante la observación de los actogramas. Luego del traspaso a condiciones OO, la fase del ritmo en libre curso mostró correspondencia significativa con dicho componente de actividad, mientras que no pudimos detectar ninguna relación del mismo con la fase del esquema de luz previo mediante análisis por tests *z* de Rayleigh (figuras 2.7b y c).

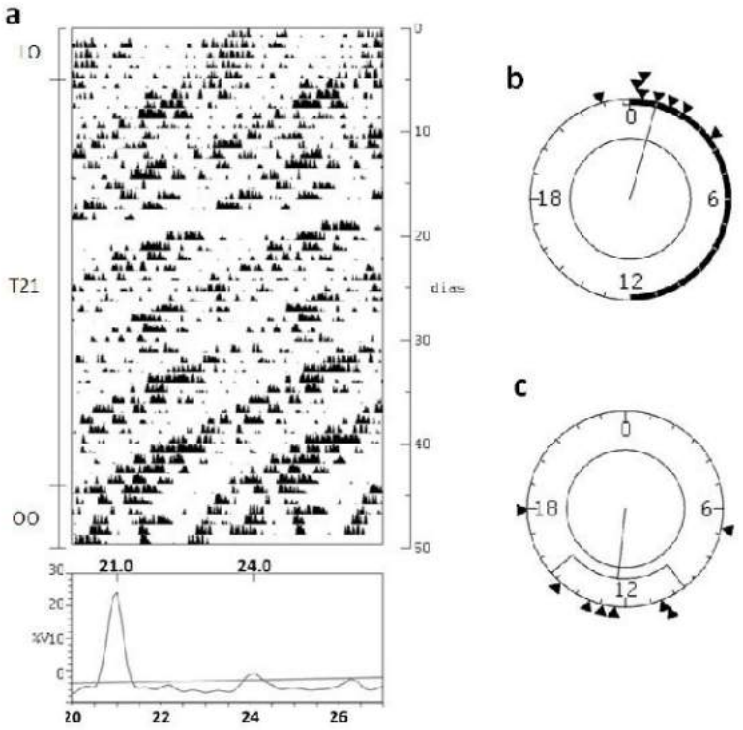


Figura 2.6 - Actividad locomotora general de ratones bajo el protocolo T21. ***a)*** *Actograma doble y periodograma correspondiente para un animal representativo bajo el protocolo T21, luego liberado en OO. Se evidencia un patrón de desincronización con un componente en fase con el ciclo de luz y otro en coordinación relativa.* ***b, c)*** *Análisis z de Rayleigh para evaluar las diferencias de fase entre el ritmo de libre curso en OO y* ***b)*** *el ciclo de luz o* ***c)*** *el componente de período largo, para todos los animales desincronizados del experimento. Ambos agrupamientos son significativos.*

Este resultado también podía preverse a partir de las simulaciones, ya que cabría pensar que el protocolo +9/3 es tan débil (es decir, tiene tan baja amplitud) como para perder la capacidad de sincronización del oscilador de período corto, por lo cual sólo podríamos observar un componente único en coordinación relativa con el *zeitgeber* emergente, fruto del acoplamiento entre ambos osciladores.

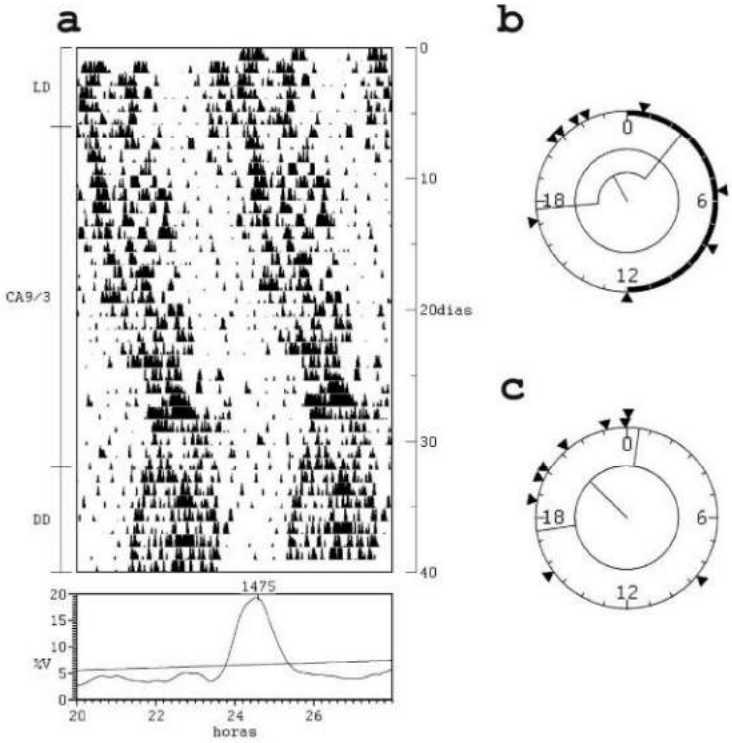


Figura 2.7 - Actividad locomotora general de ratones bajo el protocolo CA$^{9/3}$. a) *Actograma doble y periodograma correspondiente para un animal representativo bajo el protocolo CA$^{9/3}$, luego liberado en OO. Sólo puede detectarse un único componente en coordinación relativa.* ***b, c)*** *Análisis z de Rayleigh para evaluar las diferencias de fase entre el ritmo de libre curso en OO y* ***b)*** *el ciclo de luz previo al traspaso o* ***c)*** *el único componente en coordinación relativa, para todos los animales del experimento. La fase del ritmo de libre curso sólo se ajusta a la fase del ritmo en coordinación relativa.*

En la Tabla 2.1 se encuentra el resumen de los componentes detectados en ambos experimentos y los períodos correspondientes.

Modelado II: Simulación de un esquema de JLC por retrasos.

En numerosas especies se han descripto asimetrías en procesos de sincronización y resincronización en lo que se refiere a avances y retrasos, al igual que en ratones (Daan & Pittendrigh, 1976; Schwartz & Zimmerman, 1990). En general, como ya hemos visto, las CRF y rangos de entrenamiento

de roedores y otras especies son asimétricas y muestran mayor capacidad de retrasar el reloj que de adelantarlo.

A continuación decidimos evaluar las consecuencias de estas asimetrías en nuestro modelo de dos osciladores bajo JLC. Para ello sometimos a nuestro sistema de dos osciladores anteriormente utilizado a un esquema de JLC con un *step* de -6/2 = -3, simétrico en la zona de retrasos a nuestro protocolo de $CA^{6/2}$. El T' obtenido a partir de este *step* es de 24 + 3 = 27 horas. En la Figura 2.8 podemos comparar las dinámicas entre este esquema y uno con *step* +6/2. Como ya sabíamos, el protocolo con *step* +6/2 produce desincronización forzada de los osciladores, mientras que su contraparte en la región de retrasos produce una sincronización perfecta del sistema.

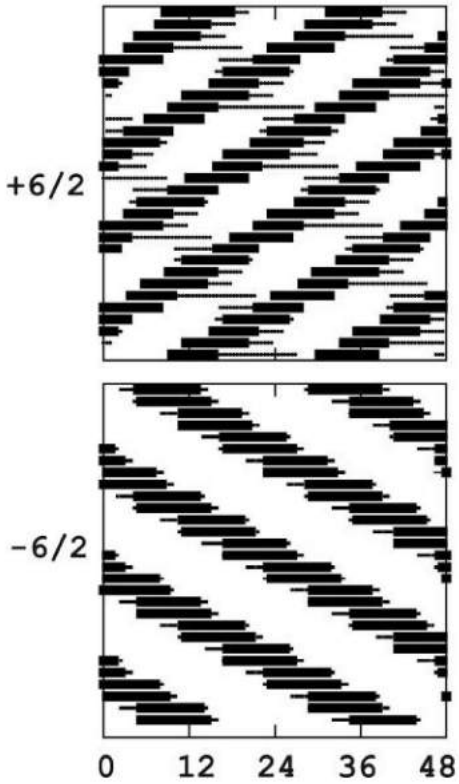


Figura 2.8 - Simulación de un esquema de JLC por retrasos. *Sistemas de dos osciladores débilmente acoplados (t_1 = 23,5 hs y t_2 = 24,5 hs) sometidos a esquemas con steps de +6/2 y -6/2. Bajo el protocolo por retrasos se observa una sincronización completa. (Parámetros: oscilador 1: a = 0,85; b = 0,3; c = 1,0; d = 0,5; oscilador 2: a = 0,85; b = 0,3; c = 0,7; d = 0,5; acoplamiento: C_{12} = C_{21} = 0,02; L = 2; L_{dur} = 1)*

A partir de esta simulación predijimos que bajo un protocolo experimental con *step* -6/2, los ratones C57 probablemente no mostrarán desincronización y sí un entrenamiento al mismo.

Comprobación de otras predicciones del modelo. Jet lag crónico por retrasos.

De acuerdo con nuestro modelo matemático y según evidencias previas respecto a la rango de sincronización y curvas de respuesta de fase de la especie, los ratones debieran ser más fácilmente sincronizados a un esquema de retrasos crónicos que a aquellos de avances como los aplicados anteriormente.

Para evaluar esta predicción, 10 ratones fueron estudiados bajo un protocolo de retrasos crónicos del ciclo LO de 6 horas cada dos días ($CR^{-6/2}$), un esquema simétrico y de signo contrario a $CA^{6/2}$, con un coeficiente *step* de -6/2 = -3. Este *step* daría lugar según nuestro modelo a un *zeitgeber* emergente de 24 + 3 = 27 horas.

Todos los animales bajo este protocolo evidenciaron en sus actogramas un componente de alrededor de 27 horas (26,92 ± 0,11 hs), y la mitad de ellos mostraron evidencias de eventos de coordinación relativa de muy baja frecuencia. Luego de ser liberados en oscuridad constante, sus ritmos de actividad en libre curso mostraron una correspondencia significativa con dicho componente, demostrando que se trataba de un ritmo sincronizado al protocolo $CR^{-6/2}$ y no un efecto de enmascaramiento (Figura 2.9).

Nuevamente pudimos ver confirmadas nuestras predicciones realizadas a partir de las simulaciones matemáticas de nuestro modelo.

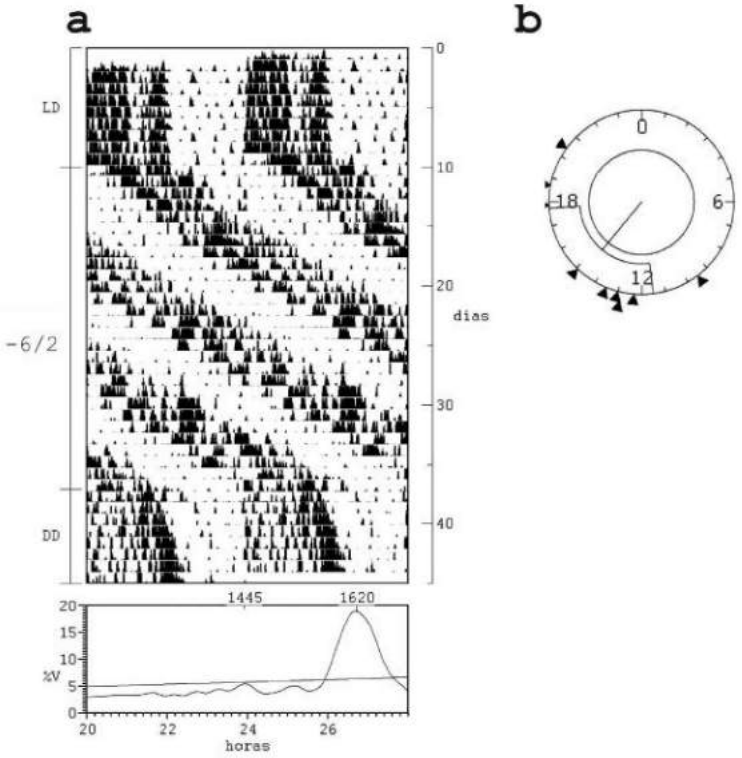


Figura 2.9 - Actividad locomotora general bajo el protocolo CR$^{-6/2}$. a) *Actograma doble y periodograma correspondiente para un animal representativo bajo el protocolo CR$^{-6/2}$, luego liberado en OO. A la izquierda del actograma se indica el régimen de luz y en la escala de la derecha los días de registro. Sólo puede detectarse un único componente que sigue el esquema de JLC.* ***b)*** *Análisis z de Rayleigh para evaluar las diferencias de fase entre el ritmo de libre curso en OO y el ciclo de luz previo al traspaso, para todos los animales del experimento. El agrupamiento es significativo.*

Efecto de la disponibilidad de rueda sobre la desincronización bajo $CA^{6/2}$.

Todos los experimentos descriptos hasta aquí consistieron en el análisis de ritmos de actividad locomotora general, la cual hemos demostrado que describe un patrón de desincronización forzada bajo el protocolo $CA^{6/2}$ en la mayoría de los animales.

Existen evidencias de que la disponibilidad de una rueda en la que los animales puedan correr activamente es un factor que afecta positivamente la capacidad de sincronización a esquemas de LO fuera del rango de entrenamiento cuando la misma está ausente (Chiesa et al., 2007). Para evaluar el efecto que la disponibilidad de rueda tiene sobre la desincronización detectada bajo las condiciones $CA^{6/2}$, se colocaron 10 ratones en jaulas equipadas con ruedas y se monitoreó la actividad resultante bajo dicho protocolo a lo largo de algunas semanas. En 7 de los animales se detectó un único componente de actividad siguiendo el esquema de luz, con un período de 20,98 ± 0,04 horas (Figura 2.10a). Si bien el análisis visual de los actogramas indica un efecto de enmascaramiento sobre el *onset* y *offset* de dicho ritmo, la fase del ritmo de actividad en rueda en condiciones OO (de un período de 23,51 ± 0,44 hs) muestra una alta correspondencia con la fase del ciclo de luz previo, lo que indica que el componente detectado bajo $CA^{6/2}$ es efectivamente un ritmo sincronizado al protocolo de JLC (Figura 2.10b). Este período en OO es significativamente menor al detectado para actividad general luego de $CA^{6/2}$ debido al efecto conocido de la rueda sobre este parámetro (Yamada et al., 1988).

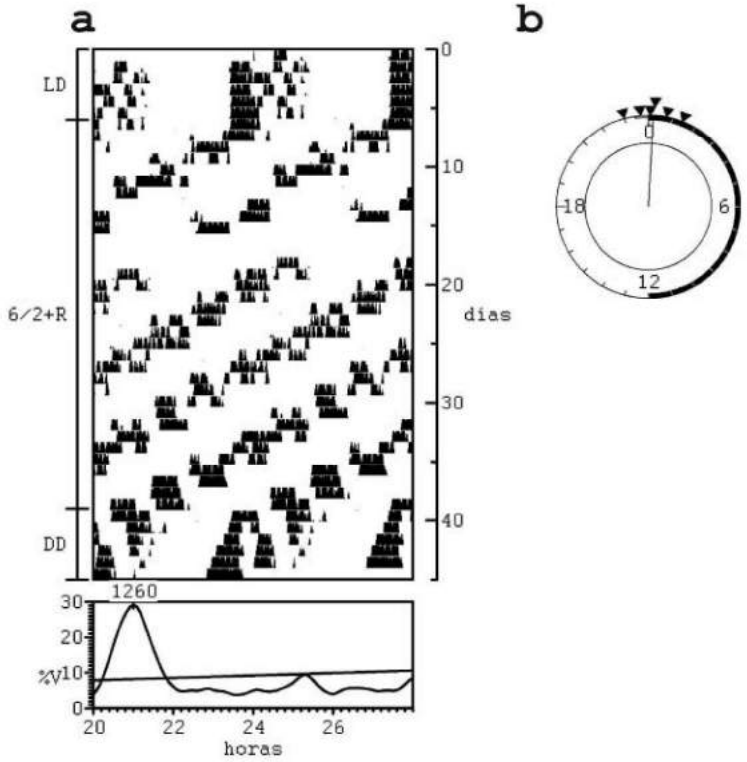


Figura 2.10 - Actividad locomotora en rueda bajo el protocolo CA$^{6/2}$. a) *Actograma doble y periodograma correspondiente para un animal representativo bajo el protocolo CA$^{6/2}$ con disponibilidad de una rueda de ejercicio, luego liberado en OO. A la izquierda del actograma se indica el régimen de luz y en la escala de la derecha los días de registro. Sólo puede detectarse un único componente que sigue el esquema de JLC.* ***b)*** *Análisis z de Rayleigh para evaluar las diferencias de fase entre el ritmo de libre curso en OO y el ciclo de luz previo al traspaso, para todos los animales del experimento. El agrupamiento es significativo.*

Tabla 2.1 – Resumen de los períodos de los ritmos detectados bajo todas las condiciones experimentales.

Condición	n	Período/s (hs ± SEM)
OO Control	9	23,90 ± 0,09[b]
$CA^{6/2}$	29[a]	21,01 ± 0,04 24,68 ± 0,26[c]
OO post $CA^{6/2}$	11[a]	23,89 ± 0,38[b, d]
T21	8[a]	21,01 ± 0,03 23,93 ± 0,31[c]
OO post T21	8[a]	23,68 ± 0,35[b]
$CA^{9/3}$	9	24,69 ± 0,14
OO post $CA^{9/3}$	9	23,94 ± 0,22[b]
$CR^{-6/2}$	10	26,92 ± 0,11
OO post $CR^{-6/2}$	10	23,85 ± 0,30[b]
$CA^{6/2}$ con rueda	7	20,98 ± 0,04
OO post $CA^{6/2}$ con rueda	7	23,51 ± 0,44[d]

[a] Sólo se muestran los datos obtenidos para los animales que presentaron los dos componentes descriptos de actividad general, en cada uno de los experimentos.

[b] Los períodos en OO no son significativamente distintos entre sí (ANOVA de una vía seguido de test de Tukey para comparar todos los grupos).

[c] Indica diferencia significativa según test T de Student (p 0,0001).

[d] Indica diferencia significativa según test T de Student (p < 0,05).

Discusión

Como ya hemos hablado resumidamente en la Introducción, existen diversas condiciones laborales o de usos sociales que están asociadas a un variado repertorio de problemas de salud, incluyendo tasas elevadas de cáncer, enfermedades cardíacas y metabólicas, entre otros inconvenientes (Golombek et al., 2013). Los modelos animales de perturbación o estrés del sistema circadiano pretenden servir como herramientas experimentales que se utilicen para dilucidar los mecanismos a través de los cuales estos problemas aparecen y cómo potencialmente podrían ser atacados para mejorar la calidad de vida de personas bajo condiciones adversas a su naturaleza rítmica biológica.

Los protocolos experimentales de *jet lag* crónico proveen una herramienta de utilidad para estudiar fenómenos asociados a la perturbación (en todo caso, un tipo específico de perturbación) del sistema circadiano. Al poder controlar el tamaño de los cambios de fase y sus signos (avances o retrasos) y la frecuencia con la que se producen los mismos, contamos con un mecanismo fácilmente controlable y repetible en el laboratorio. Sin embargo, hasta hace muy poco no existía un sustento teórico o experimental que permitiera interpretar el significado y los mecanismos que se ponen en juego ante dichos protocolos en el sistema circadiano, más allá de los numerosos efectos que se han reportado a nivel fisiológico. En esta primera parte de la tesis, nos propusimos entender de qué forma y dependiendo de qué características el sistema circadiano procesa un esquema de JLC, antes de enfocarnos en un problema específico relativo a los potenciales peligros a la salud que dichos protocolos presentan.

El diseño que hemos elegido, consistente en avances crónicos del ciclo de iluminación de 6 horas cada dos días, surgió de acuerdo a la consideración del gran número de protocolos distintos existentes en la bibliografía. Nuestros experimentos de registro continuo de la actividad locomotora general en ratones C57Bl/6 alojados individualmente bajo este protocolo a lo largo de varias semanas mostraron un patrón sumamente característico e interesante (Figura 2.2):

- Un primer componente muestra un período muy cercano a las 21 horas, y que sigue al esquema de $CA^{6/2}$, con una fase estable. El mismo predice significativamente la fase del ritmo de actividad en libre curso luego del traspaso a oscuridad constante, lo que descarta la posibilidad de que se trate de un producto de enmascaramiento.
- Un segundo componente en coordinación relativa con un período mayor a las 24 horas, y que también logra predecir la fase del ritmo de actividad en oscuridad constante.

Podemos concluir que ambos componentes son marcadores confiables de una desincronización forzada de los componentes del oscilador circadiano, tal como fuera descripto para un modelo del mismo fenómeno en ratas generado por la exposición a un ciclo corto (T22) de luz-oscuridad (Cambras et al., 2004). Pudimos observar también la desincronización al nivel de los ritmos de temperatura, lo que amplía nuestro modelo en términos de la desincronización interna del sistema circadiano en vistas de los experimentos posteriores relativos a las consecuencias de dicha perturbación del reloj biológico sobre la fisiología y la salud.

Estos resultados nos impulsaron a la implementación de un modelo matemático que pudiera ayudarnos a comprender cómo el sistema circadiano está procesando este protocolo en particular, y en general para el resto de los posibles esquemas de JLC. La primera conclusión importante de nuestras simulaciones es la proposición de que los esquemas de JLC producen la aparición de un *zeitgeber emergente* con un período efectivo determinado por las características de dicho esquema. Propusimos la fórmula T' = 24 – *step*, donde *step* es el cociente del valor del cambio de fase efectuado sobre el intervalo de días que transcurre entre los sucesivos cambios. Estos dos parámetros los denominamos *componentes del step*.

Nuestras simulaciones permitieron echar luz sobre varias preguntas relativas a la perturbación del sistema circadiano en respuesta al JLC. La causa principal de dicha perturbación proviene de una desincronización sostenida, en contraste con la desincronización transitoria característica durante un evento único de *jet lag*. Esta desincronización sostenida puede producirse entre el *zeitgeber* y el oscilador, o incluso entre los propios componentes del oscilador produciendo una desincronización interna. En un sistema oscilatorio cuyos componentes están fuertemente acoplados (es decir, que tienen un efecto de arrastre importante entre ellos), al ser expuesto a un *zeitgeber* (en nuestro caso particular, un *zeitgeber emergente* de un proceso de JLC) por fuera de su rango de entrenamiento, se produce desincronización entre oscilador y *zeitgeber,* lo cual induce un patrón de coordinación relativa, tal como se mostró en la Figura 2.4. Cuando los osciladores que componen el sistema están débilmente acoplados, puede producirse la sincronización de alguno de ellos

mientras que el otro permanece en coordinación relativa; es decir, se presenta una desincronización interna (Figura 2.5).

Es importante notar que el componente de coordinación relativa obtenido en cualquiera de los casos varía considerablemente de acuerdo con el valor absoluto de los componentes del *step*, más allá del valor global de éste. Es decir, que las características del nuevo *zeitgeber* que emerge de un determinado protocolo de JLC no dependen de la magnitud del cambio de fase o del intervalo entre cambios independientemente uno de otro, sino de sus efectos combinados. En resumen, observamos en las simulaciones que mientras más altos son los valores de los componentes del *step* (más allá del valor específico del *step*), más alejado del T' se encontrará el período del componente no entrenado en coordinación relativa.

La primera interpretación de esta modulación de los patrones de desincronización es que el aumento en los valores de los componentes del *step* equivale a la disminución de la amplitud del *zeitgeber* emergente de un esquema de JLC. Esto se corresponde con nuestras simulaciones sobre un sistema de dos osciladores en las que gradualmente el aumento de estos valores consigue perder la capacidad de entrenamiento de ambos osciladores, mientras que vimos que manteniendo bajos los componentes del *step* se conseguía la sincronización de al menos un oscilador (Figura 2.5).

Los fenómenos observados en las simulaciones encontraron correlato en nuestros experimentos en el laboratorio. Por un lado, tanto bajo el protocolo $CA^{6/2}$ como en el T21 (un protocolo con *step* +3 = 3/1) pudimos detectar un comportamiento desincronizado, y el CNEL mostró un período diferente en

cada uno de ellos, coherente con la predicción del modelo: más corto (y entonces, cercano a 21 horas) en el esquema 3/1 que en el esquema 6/2 (Figura 2.6). Por el otro lado, bajo el protocolo con *step* 9/3 (el más débil de acuerdo con nuestro modelo), no observamos desincronización sino un componente único en coordinación relativa (Figura 2.7). Esto podría indicar que el *zeitgeber* emergente de este protocolo no es suficientemente fuerte para mantener la sincronización del componente de período corto presente bajo $CA^{6/2}$ y T21.

Si bien seleccionamos sistemas de dos osciladores para nuestras simulaciones, hay que considerar que la modulación por frecuencia o amplitud de un único oscilador circadiano puede generar patrones de hasta tres componentes, como se ha demostrado mediante simulaciones relacionadas con el modelo de desincronización forzada en ratas bajo T22 (Granada et al., 2011). Sin embargo debemos notar que en nuestros datos no logramos detectar un tercer componente a través del análisis por periodogramas.

Abraham y colegas (Abraham et al., 2010) han sugerido que, ante valores de período y amplitud fijas del *zeitgeber*, el rango de entrenamiento de un sistema oscilatorio se amplía cuando la *tasa de relajación* del mismo aumenta. La tasa de relajación representa la velocidad del oscilador para recuperar su amplitud frente a una perturbación externa. Si comparamos dos esquemas de JLC, con el mismo *step* pero distintos componentes del mismo, mientras más bajos sean estos últimos, menos tiempo tiene el sistema para recuperar su amplitud luego de cada cambio de fase. Esto podría causar, a lo largo del esquema, un aumento en el rango de entrenamiento del oscilador.

Para analizar los límites de nuestra interpretación modelística de la respuesta de osciladores circadianos reales a los esquemas de JLC, debemos tomar en cuenta algunos puntos. Hemos considerado protocolos de JLC que inducen un estado permanente de perturbación del entrenamiento, y no una resincronización episódica como podría obtenerse si se permite al oscilador alcanzar la sincronización previamente a cada nuevo salto de fase. En este sentido, el modelo está limitado a esquemas en los que el intervalo entre cambios de fase es menor al tiempo necesario para que el oscilador consiga la resincronización a la nueva fase del *zeitgeber*. Nuestros experimentos con *steps* de 3/1, 6/2 y 9/3, que dan origen a *zeitgebers* emergentes de T' = 21 horas, han seguido las posibles predicciones del modelo.

Nuestros modelos indican que el rango de entrenamiento se encuentra significativamente sesgado hacia la zona de retrasos (por encima del período intrínseco del oscilador), tal como ya hemos comentado y como es esperable debido a la asimetría común que existe en la CRF entre avances y retrasos (en particular, en esta cepa de ratones son significativamente mayores los retrasos de fase que los avances inducidos por pulsos de luz). De acuerdo con esto y nuestras simulaciones, un esquema de JLC por retrasos debiera tener menor capacidad de perturbar al sistema circadiano que uno por avances. En nuestros experimentos con ratones C57Bl/6 sometidos a un protocolo de JLC con un *step* -6/2, equivalente, pero de signo contrario, al utilizado en el esquema $CA^{6/2}$. Bajo el protocolo $CR^{-6/2}$, todos los animales testeados mostraron un único componente con un pico en el periodograma alrededor de las 27 horas, correspondiendo con el T' = 24 + 3 = 27 horas del *zeitgeber* emergente del esquema. Este componente está sincronizado al ciclo de luz-oscuridad, lo cual

queda demostrado por la correspondencia significativa de fases entre éste y el ritmo en libre curso luego del traspaso a condiciones OO (Figura 2.9). De esta forma se confirman tanto las predicciones según el conocimiento previo de la especie como de las simulaciones.

La asimetría en la capacidad de perturbación del sistema circadiano (y lo que ello conlleve a nivel fisiológico global) entre protocolos de avances y de retrasos podría explicar los resultados obtenidos por Davidson y colaboradores (Davidson et al., 2006) quienes reportaron una disminución en la expectativa de vida en ratones adultos sometidos a un esquema de JLC con *step* +6/7 en comparación a los sometidos a un esquema -6/7. De todas maneras, debemos notar que ambos esquemas generan períodos efectivos más cercanos a las 24 horas que los empleados en nuestros experimentos (23,14 hs y 24,86 hs, respectivamente).

Bajo protocolos de JLC por avances, puede alcanzarse, como hemos visto y ha sido reportado, una desincronización forzada sostenida sobre un sistema dual de osciladores, que puede establecerse tanto a nivel celular como molecular. Esto fue demostrado por primera vez utilizando ciclos de LO bien por fuera del rango de entrenamiento (Weber, 1979), y más tarde se demostró que puede ocurrir entre los osciladores ventrolaterales y dorsomediales de los NSQ (de la Iglesia et al., 2004). Efectivamente, múltiples componentes de ritmos comportamentales pueden surgir a partir de cambios en el acoplamiento de las subregiones de los NSQ (Albus et al., 2005; Aton & Herzog, 2005; Nagano et al., 2003; Welsh et al., 2010). Estos efectos, se demostró, son mucho más pronunciados cuando se trata de avances en contraposición a retrasos, y se relaciona con velocidades de resincronización más lentas (Nakamura et al.,

2005). En el modelo de desincronización forzada en ratas bajo T22, la disociación de los ritmos de actividad locomotora en dos componentes refleja la actividad desincronizada de las mencionadas regiones ventrolaterales y dorsomediales de los NSQ (de la Iglesia et al., 2004). Resta determinar en nuestro modelo murino si los componentes de la desincronización forzada reflejan también la actividad diferencial de las subregiones de los NSQ.

Cuando los efectos del JLC se estudian al nivel molecular, con distintos *steps*, se observan variables arrítmicas. Filipski y colaboradores (Filipski et al., 2004) utilizaron un esquema con *step* +8/2, correspondiente a un *zeitgeber* emergente de 20 horas. Basadas en sus datos, simulaciones computacionales sugieren que estos patrones arrítmicos podrían ser caóticos o cuasiperiódicos (Leloup & Goldbeter, 2008). En sistemas de osciladores forzados, se han reportado transiciones entre dinámicas periódicas, caóticas o cuasiperiódicas cuando se manipulan los períodos y/o amplitudes de los ciclos sincronizadores (Ding, 1987; Glass & Mackey, 1988; Mackey & Glass, 1977). Nuestros datos de comportamiento y el modelo matemático que desarrollamos indican que el período y la amplitud están definidos por las características del esquema de JLC particular. En la Figura 2.11 se muestra un cuadro (semejante a una gráfica de rango de entrenamiento) con varios esquemas de JLC con diferentes combinaciones de componentes del *step*, indicando su período efectivo y la amplitud relativa del *zeitgeber* emergente. Este cuadro es útil para evaluar relativamente la capacidad de perturbación de un esquema particular de JLC, de acuerdo al período efectivo que genera, y al valor de los componentes del *step*, que como hemos visto tienen un efecto sobre la amplitud del *zeitgeber* emergente. De esta forma se pueden diseñar más adecuadamente nuevos

step								1/1				-1/1						
						2/1		2/2				-2/2		-2/1				
				3/1			3/2	3/3				-3/3	-3/2			-3/1		
		4/1				4/2		4/4				-4/4		-4/2				-4/1
					5/2			5/5				-5/5			-5/2			
				6/2		6/3		6/6				-6/6		-6/3		-6/2		
			7/2					7/7				-7/7					-7/2	
		8/2				8/4		8/8				-8/8		-8/4				-8/2
period (h)		20	20.5	21	21.5	22	22.5	23	23.5	24	24.5	25	25.5	26	26.5	27	27.5	28

Figura 2.11 - Comparación de distintos protocolos de JLC de acuerdo a los componentes del step. *En este esquema se indican el período efectivo y la amplitud relativa obtenida para el zeitgeber emergente de protocolos de JLC de acuerdo a los componentes del step seleccionados. En el eje inferior se indican los períodos, mientras que el eje vertical ordena la amplitud o "fuerza" relativa, con los zeitgeber más fuertes en la zona superior y los más débiles en la inferior. A medida que nos alejamos de la zona central de los períodos que se asemejan al intrínseco del sistema oscilatorio, la capacidad de sincronización disminuye y aumenta la probabilidad de aparición de eventos de coordinación relativa y/o de desincronización forzada.*

experimentos que involucren JLC conociendo previamente su potencial efecto sobre el sistema circadiano. Esto adquiere mayor relevancia ya que a pesar de los numerosos trabajos que se han publicado en los últimos años que evalúan los efectos sobre la fisiología de protocolos de JLC con diferentes combinaciones de *step*, no existe un criterio definido ni forma de evaluación de los efectos probables del mismo a partir del cual diseñar los protocolos.

Por último, hemos comprobado que además de las características estructurales del esquema de JLC que se practique, el efecto que el mismo puede tener sobre el sistema circadiano puede variar radicalmente de acuerdo a otras condiciones del entorno o intervenciones. En nuestro caso, la inclusión de una rueda de ejercicio en la jaula logró revertir completamente el fenotipo de desincronización, alcanzando todos los animales estudiados la completa

sincronización al protocolo $CA^{6/2}$. La capacidad que tiene la disponibilidad de rueda de ampliar el rango de entrenamiento de roedores por fuera de sus valores normales ya era conocida (Chiesa et al., 2007), por lo cual nuestro resultado no es sorprendente. Pero a su vez es importante por dos motivos. Los animales mostraron una sincronización perfecta al régimen $CA^{6/2}$, con un período de actividad en rueda de 21 horas y mostrando una correspondencia perfecta con la fase del ritmo de libre curso luego del paso a OO (Figura 2.10). Esto refuerza nuestra hipótesis central acerca de como los esquema de JLC son interpretados por el sistema circadiano como nuevos *zeitgebers* con propiedades definidas por los parámetros de diseño de dicho esquema. Por otro lado, nos brinda una herramienta para, más adelante, poder discriminar entre los efectos de la desincronización forzada producida por $CA^{6/2}$ sobre la salud, y los potenciales efectos del JLC *per se*, ya que ahora podemos prevenir la desincronización mediante la inclusión de la rueda. Como hemos mencionado durante la Introducción, existen en el sistema circadiano vías de retroalimentación que permiten que las variables rítmicas controladas por el reloj afecten de forma retrógrada el funcionamiento de éste. En este caso, el refuerzo de la actividad locomotora debido a la inclusión de la rueda genera una retroalimentación "positiva" sobre el reloj, en el sentido en que lo ayuda a sincronizarse correctamente a un *zeitgeber* al que de otra forma le sería imposible. La inclusión de una rueda de ejercicios en roedores trata de modelar el efecto del ejercicio o trabajo físico en seres humanos. Ya se ha propuesto que sería recomendable para trabajadores en turnos rotativos o en turnos nocturnos reforzar su adaptación a estos ambientes anormales mediante la

implementación de ejercicio en horarios determinados. Volveremos sobre este tema en el siguiente capítulo.

Para concluir, en este primer capítulo hemos presentado un modelo de JLC que posee características particulares que lo hacen sumamente interesante en dos sentidos. El primero tiene que ver con el significado que tiene la descripción de un modelo de desincronización circadiana en ratones. La desincronización forzada es un fenómeno de interés en cronobiología ya que es una herramienta útil para el estudio de los mecanismos básicos del funcionamiento del sistema circadiano. Si bien desde hace muchos años conocemos el fenómeno de desincronización forzada interna en humanos gracias a los experimentos pioneros de Aschoff y otros, los modelos en animales son pocos. Hasta el momento, en roedores, sólo se conocía un modelo en ratas que se obtiene mediante el uso de ciclos cortos de 22 horas de LO (Cambras et al., 2004; Campuzano et al., 1998). La disponibilidad de un modelo de este fenómeno en ratones posibilita una ampliación de nuestro conocimiento de los rudimentos de la función del reloj biológico y los mecanismos a través de los cuales es capaz de adaptarse a los cambios del ambiente. Segundo, es importante para el siguiente objetivo en esta tesis - el de estudiar los efectos del estrés del reloj biológico sobre la fisiología - ya que hemos desarrollado un modelo de estudio con un comportamiento representativo y repetible que puede ser caracterizado confiablemente. El hecho de que se trate de un modelo en ratones ofrece más ventajas que el existente en ratas, ya que permite ampliar el número de campos y técnicas

para los que se puede aplicar el mismo y en donde es más conveniente que otras especies.

Resumen final

1) Ratones C57Bl/6 sometidos a un protocolo de *jet lag* crónico de avances de 6 horas cada dos días ($CA^{6/2}$) muestran un patrón de actividad locomotora que posee dos componentes rítmicos desincronizados entre sí. Uno de ellos se ajusta al ciclo de luz-oscuridad mientras que el otro permanece en coordinación relativa. Este patrón se asemeja al fenómeno conocido como "desincronización forzada".
2) Simulaciones matemáticas de modelos de relojes circadianos y la evaluación experimental de las predicciones derivadas de las mismas sugieren que los protocolos de *jet lag* crónico generan "*zeitgebers* emergentes" con un período efectivo (T') determinado por la fórmula T' = 24 – *step* = 24 – CF/IEC.
3) El comportamiento de un sistema oscilatorio bajo tales protocolos depende tanto del T' como de la identidad de los componentes del *step*.
4) Un protocolo de *jet lag* crónico por retrasos de 6 horas cada 2 días ($CR^{-6/2}$), simétrica a $CA^{6/2}$ en la zona de retrasos, no produce desincronización de los ritmos de actividad locomotora general de ratones C57Bl/6, sino sincronización al esquema.
5) La disponibilidad de rueda consigue revertir el fenotipo de desincronización forzada y logra que los ratones sincronicen perfectamente al protocolo de $CA^{6/2}$.

Referencias:

Abraham, U, Granada, AE, Westermark, PO, Heine, M, Kramer, A, & Herzel, H. (2010). Coupling governs entrainment range of circadian clocks. *Mol Syst Biol, 6*, 438.

Albus, H, Vansteensel, MJ, Michel, S, Block, GD, & Meijer, JH. (2005). A GABAergic mechanism is necessary for coupling dissociable ventral and dorsal regional oscillators within the circadian clock. *Curr Biol, 15*(10), 886-893.

Aton, SJ, & Herzog, ED. (2005). Come together, right...now: synchronization of rhythms in a mammalian circadian clock. *Neuron, 48*(4), 531-534.

Batschelet, E. (1981). "Circular statistics in biology". London ; New York: Academic Press.

Cambras, T, Chiesa, J, Araujo, J, & Diez-Noguera, A. (2004). Effects of photoperiod on rat motor activity rhythm at the lower limit of entrainment. *J Biol Rhythms, 19*(3), 216-225.

Campuzano, A, Vilaplana, J, Cambras, T, & Diez-Noguera, A. (1998). Dissociation of the rat motor activity rhythm under T cycles shorter than 24 hours. *Physiol Behav, 63*(2), 171-176.

Chiesa, JJ, Diez-Noguera, A, & Cambras, T. (2007). Effects of transient and continuous wheel running activity on the upper and lower limits of entrainment to light-dark cycles in female hamsters. *Chronobiol Int, 24*(2), 215-234.

Daan, S, & Pittendrigh, C. (1976). A Functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. *Journal of comparative physiology, 106*(3), 253-266.

Davidson, AJ, Sellix, MT, Daniel, J, Yamazaki, S, Menaker, M, & Block, GD. (2006). Chronic jet-lag increases mortality in aged mice. *Curr Biol, 16*(21), R914-916.

de la Iglesia, HO, Cambras, T, Schwartz, WJ, & Diez-Noguera, A. (2004). Forced desynchronization of dual circadian oscillators within the rat suprachiasmatic nucleus. *Curr Biol, 14*(9), 796-800.

Ding, EJ. (1987). Analytic treatment of a driven oscillator with a limit cycle. *Phys Rev A, 35*(6), 2669-2683.

Filipski, E, Delaunay, F, King, VM, Wu, MW, Claustrat, B, Grechez-Cassiau, A, et al. (2004). Effects of chronic jet lag on tumor progression in mice. *Cancer Res, 64*(21), 7879-7885.

Friesen, WO, & Friesen, JA. (2010). "NeuroDynamix II : concepts of neurophysiology illustrated by computer simulations". Oxford ; New York: Oxford University Press.

Glass, L, & Mackey, MC. (1988). "From clocks to chaos : the rhythms of life". Princeton, N.J.: Princeton University Press.

Golombek, DA, Casiraghi, LP, Agostino, PV, Paladino, N, Duhart, JM, Plano, SA, et al. (2013). The times they're a-changing: effects of circadian desynchronization on physiology and disease. *J Physiol Paris, 107*(4), 310-322.

Granada, AE, Cambras, T, Diez-Noguera, A, & Herzel, H. (2011). Circadian desynchronization. *Interface Focus, 1*(1), 153-166.

Leloup, JC, & Goldbeter, A. (2008). Modeling the circadian clock: from molecular mechanism to physiological disorders. *Bioessays, 30*(6), 590-600.

Mackey, MC, & Glass, L. (1977). Oscillation and chaos in physiological control systems. *Science, 197*(4300), 287-289.

Nagano, M, Adachi, A, Nakahama, K, Nakamura, T, Tamada, M, Meyer-Bernstein, E, et al. (2003). An abrupt shift in the day/night cycle causes desynchrony in the mammalian circadian center. *J Neurosci, 23*(14), 6141-6151.

Nakamura, W, Yamazaki, S, Takasu, NN, Mishima, K, & Block, GD. (2005). Differential response of Period 1 expression within the suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci, 25*(23), 5481-5487.

Oda, GA, Menaker, M, & Friesen, WO. (2000). Modeling the dual pacemaker system of the tau mutant hamster. *J Biol Rhythms, 15*(3), 246-264.

Pavlidis, T. (1967). A mathematical model for the light affected system in the drosophila eclosion rhythm. *Bull Math Biophys, 29*(2), 291-310.

Schwartz, MD, Wotus, C, Liu, T, Friesen, WO, Borjigin, J, Oda, GA, et al. (2009). Dissociation of circadian and light inhibition of melatonin release through forced desynchronization in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A, 106*(41), 17540-17545.

Schwartz, WJ, & Zimmerman, P. (1990). Circadian timekeeping in BALB/c and C57BL/6 inbred mouse strains. *J Neurosci, 10*(11), 3685-3694.

Sokolove, PG, & Bushell, WN. (1978). The chi square periodogram: its utility for analysis of circadian rhythms. *J Theor Biol, 72*(1), 131-160.

Weber, AL. (1979). The free-run period is not the best Zeitgeber period for the house mouse. *Physiol Behav, 23*(6), 1165-1169.

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

Yamada, N, Shimoda, K, Ohi, K, Takahashi, S, & Takahashi, K. (1988). Free-access to a running wheel shortens the period of free-running rhythm in blinded rats. *Physiol Behav, 42*(1), 87-91.

CAPÍTULO 2:

Estudio de variables metabólicas en el modelo de desincronización por jet lag crónico

Capítulo 2

Objetivo general

Estudiar los efectos del protocolo de desincronización forzada (a través de jet lag crónico) sobre el metabolismo de ratones C57Bl/6.

Objetivos específicos

- Describir las alteraciones en la ganancia de peso producidas por el protocolo $CA^{6/2}$.
- Caracterizar diversas variables relacionadas al metabolismo a nivel celular, tisular y plasmático en condiciones de luz y oscuridad durante la desincronización.
- Analizar factores que modifiquen los efectos sobre la ganancia de peso de los protocolos de *jet lag* crónico.
- Determinar la efectividad de una potencial alternativa terapéutica para las alteraciones en la ganancia de peso a través de la alimentación en fases de oscuridad.

Materiales y métodos:

Evaluación del aumento de peso bajo condiciones de jet lag crónico.

Se procedió a determinar la progresión del peso corporal de ratones C57Bl/6 bajo diversas condiciones de JLC. En todos los casos, los animales se mantuvieron con alimento y bebida *ad libitum* en jaulas individuales. Al momento de comenzar cada experimento los animales tuvieron entre 3 y 5

meses de edad, utilizándose siempre animales de lotes iguales para los grupos experimentales y controles. Los animales fueron pesados dos veces por semana, primero a lo largo de un período de "línea de base" de alrededor de dos semanas, y luego durante el período experimental, por un mínimo de 4 semanas. El peso determinado para cada animal en el día del comienzo del protocolo de JLC (día 0) fue tomado como el valor de referencia al cual se relativizaron los datos subsiguientes. Junto con las determinaciones de peso corporal, se registraron dos veces a la semana la cantidad de alimento consumido en 24 horas. Cada condición evaluada fue comparada con un grupo en luz-oscuridad normal en paralelo con ratones del mismo lote y edad. Los comparaciones realizadas fueron (revisar los Materiales y Métodos del Capítulo 1 ante el olvido de las características de los esquemas de JLC):

- $CA^{6/2}$ versus LO normal;dos experimentos independientes (N = 19 y N = 12).

- $CR^{-6/2}$ versus LO normal (N = 10).

- $CA^{6/2}$ con disponibilidad de rueda versus LO normal con disponibilidad de rueda (N=10).

Efecto del contacto social sobre la variación de peso bajo condiciones de jet lag crónico.

Dos grupos de ratones C57Bl/6 de 3 meses de edad se dispusieron cada uno en tres jaulas de 3 o 4 animales, y se colocó uno de ellos bajo condiciones de $CA^{6/2}$ y el otro se conservó en condiciones de LO normal (N = 11 para cada grupo). Una vez por semana se efectuó la determinación del peso de cada uno

de los animales a lo largo de 4 semanas. El peso en el día 0 se utilizó para relativizar cada dato subsiguiente. Al estar los animales agrupados no fue posible determinar el consumo de alimento diario de cada uno de los animales.

Efecto de la restricción de la alimentación a las horas de oscuridad.

Se dispusieron cuatro grupos de animales de 3 meses de edad en jaulas individuales equipadas con sensores infrarrojos de actividad locomotora general. Luego de dos semanas de alojamiento en condiciones de línea de base, en LO normal y alimentación y bebida ad libitum, dos grupos se transfirieron a condiciones de $CA^{6/2}$ mientras que los dos restantes se mantuvieron en LO. A partir del día 0, a uno de los dos grupos en cada condición de iluminación se le restringió la disponibilidad de alimento a las primeras 6 horas del período de oscuridad (alimentación restringida, AR; N = 6 para cada uno de los cuatro grupos). Tanto durante las dos semanas previas como durante el período experimental, el peso y la cantidad de alimento consumido por día (para los grupos en AR, el consumido en el último período nocturno) se midieron dos veces por semana. Los pesos de cada animal fueron siempre relativizados a su peso en el día 0.

Determinación de variables metabólicas.

Se colocaron ratones C57Bl/6 en condiciones controles de LO (n=16) o $CA^{6/2}$ (n=16) durante 30 o 60 días. En el día final del experimento, los animales de cada grupo fueron pesados y luego sacrificados por decapitación. Las muestras

se tomaron en dos horarios distintos: la mitad de la fase de oscuridad (ZT18) y la mitad de la fase de luz (ZT6).

De todos ellos se obtuvieron muestras de sangre, tejido adiposo epididimal, tejido adiposo retroperitoneal e hígado. Tanto el hígado como el total de los tejidos adiposos mencionados fueron pesados y relativizados al peso corporal.

Determinación de triglicéridos (TG). Se utilizó un ensayo enzimático (Laboratorio Wiener), que utiliza cuatro reacciones acopladas, dando lugar a la formación de un cromógeno con absorbancia máxima a 505 nm. Esta absorbancia es directamente proporcional a la concentración de TG en la muestra.

Determinación de leptina. El dosaje de leptina en las muestras se realizó por un radioinmunoanálisis (RIA) específico desarrollado en la Unidad de Neuroendocrinología del Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE) de La Plata. El buffer utilizado consiste en EDTA 0,025 M, NaCl 0,9 % (p/v), Tritón (100x) 0,05 % (v/v) y Albúmina Sérica Bovina (BSA) 0,5 % (p/v), disuelto en buffer fosfato (PBS) 0,05 M, pH = 7,4. El anticuerpo utilizado en este ensayo fue desarrollado en el IMBICE y consiste en un anticuerpo policlonal obtenido en conejo. La reacción cruzada del mismo es de 100% con leptina de rata y ratón y menos de 1% con leptina humana.

La hormona con marca radiactiva, utilizada como trazador, se generó en el citado instituto. Para ello se utilizó el método de Cloramina T que permite la iodinación de residuos tirosina de la hormona peptídica. Esta reacción implica un primer paso de activación del 125INa (1 mCi, Amersham Biosciences) con 10 µg/10 µL de cloramina T durante 15 segundos, luego se contacta con 5 µg/5

µL de leptina (Pre Pro Tech, Inc.) por 30 segundos. La reacción se detiene con el agregado de 80 µg/10 µL de metabisulfito de Sodio. La separación de la hormona iodinada del ioduro radiactivo no incorporado se realiza en una columna de 75 cm de Sephacryl S-300, utilizando un buffer: 0,5% BSA; 0,025 M EDTA; 0,1% Azida sódica; 0,05 M PBS; 0,9 % NaCl.

Para el protocolo específico del RIA se realiza una primera mezcla de reacción con muestras o estándares (200 µL) y 50 µL de Anticuerpo primario (policlonal, desarrollado en conejo en el IMBICE, cruza menor al 1% con leptina humana) que se incuba a temperatura ambiente durante toda la noche. Posteriormente se agrega 50 µL del trazador (aproximadamente 30.000 cpm) y se deja otras 24 hs de incubación a temperatura ambiente. La separación de la fracción de hormona libre, de la unida al anticuerpo se realiza por precipitación de los complejos hormona-anticuerpo con una solución de anticuerpo secundario (antisuero anti gamma-globulina de conejo obtenido en oveja) 1/50, suero normal de caballo 1/10 en PBS y de PEG 6000 (10% en PBS). Se incuba 30 minutos a temperatura ambiente, se centrifuga 30 minutos a 3.500 rpm a 4°C y se aspiran los sobrenadantes. La radiactividad γ emitida por los precipitados se registra en un contador de centelleo. Las cpm de las muestras fueron convertidas en concentración utilizando una curva estándar y un programa adecuado. La curva estándar posee un rango de detección entre 0,2 y 25 ng/mL.

Histología de tejido adiposo retroperitoneal. Para los estudios histológicos se disecó el tejido adiposo retroperitoneal y se cortó en trozos de aproximadamente 1 cm x 1 cm, los cuales fueron fijados en formaldehído al

10% durante 36 horas. La fijación se detuvo lavando la muestra bajo chorro continuo de agua corriente durante 8 h. Se deshidrató en baños sucesivos de alcoholes crecientes: 70º un solo baño (24 h hasta 2 días), 96º dos baños de 2 hs cada uno, y 100º dos baños de 2 h cada uno. Se aclaró en xilol (Merk, Argentina), en dos baños de 3 h cada uno. La inclusión en Histoplast® (Biopack) se realizó en estufa, con 2 a 4 h por baño. Una vez completa la impregnación, se retiró la muestra, se volcó en un molde cuidando que el tejido quede en medio del bloque, y se procedió a su tallado. Finalmente se pegó en un taco de madera para su corte. Se obtuvieron láminas de 4-5 micras de espesor, que fueron recogidas con pincel, extendidas en agua tibia, levantadas con portaobjetos, y mantenidas por 12 horas a 60-70ºC en estufa hasta su total secado y adhesión. Finalmente, los cortes fueron examinados con lupa binocular para seleccionarlos antes de su tinción simple con eosina-hematioxilina.

Una vez teñidas y montadas, las muestras se dejaron secar en estufa, y luego se analizaron con un microscopio óptico. El análisis morfométrico-cuantitativo se realizó utilizando una cámara Sony RGB CCD en conjunto con el software Image Pro Plus 6.0 (a un aumento 400X). Para cada muestra se seleccionaron 7 secciones y 3 niveles (n=4-5 animales por grupo). Se analizaron 15 campos al azar para cada sección, y por grupo se examinaron 2.500 células. Se midió el diámetro y área de los adipocitos, mientras que el volumen fue calculado utilizando la aproximación del volumen de la esfera.

Análisis estadístico.

Las diferencias entre las curvas de crecimiento en cada experimento se analizaron mediante un análisis de la varianza de 2 vías con medidas repetidas (ANOVA-MR), utilizando el software Graph Pad Prism. Diferencias en puntos temporales específicos se determinaron mediante contrastes de Bonferroni *a posteriori*.

En el caso del experimento con protocolos de alimentación restringida, se realizaron cortes temporales luego analizados individualmente mediantes ANOVA de dos vías, con contrastes de Dunnett *a posteriori*.

Para la comparación de variables metabólicas se utilizaron ANOVA de dos vías para analizar tanto las diferencias entre fases de luz y oscuridad como aquellas entre los 30 y 60 días post tratamiento. Se utilizaron contrastes de Bonferroni para analizar diferencias intra-grupos en cada caso (fase de luz versus fase de oscuridad, o controles versus JLC a los 30 o 60 días).

En todos los gráficos de este capítulo, sean de columnas o puntos, se muestran los datos como promedio ± error estándar de la media.

Resultados

Ganancia de peso bajo el protocolo de desincronización forzada CA$^{6/2}$.

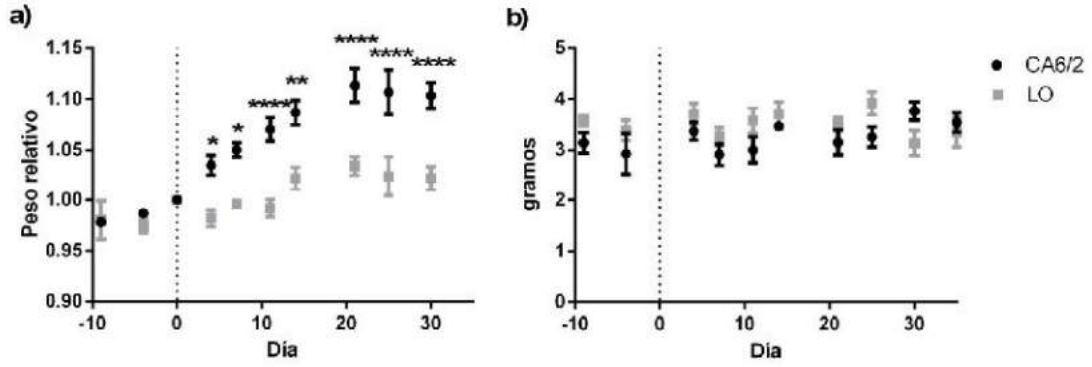


Figura 3.1 - Curvas de peso de ratones C57Bl/6 bajo el protocolo CA$^{6/2}$. a) *Pesos relativos al día 0 (el comienzo del protocolo de JLC) de ratones bajo condiciones de LO normal o CA$^{6/2}$, a lo largo de 30 días post inicio del JLC. El análisis de ANOVA-MR (a partir del día 4) indica efectos significativos del jet-lag, y los asteriscos indican diferencias significativas según contrastes de Bonferroni a posteriori para puntos temporales individuales. Resultados ANOVA-MR: interacción ns.; tiempo p<0,0001; jet-lag p<0,001.* ***b)*** *Cantidad de alimento consumido diariamente a lo largo del experimento. No se detectan diferencias entre los grupos. N = 6 para ambos grupos.*

Observamos en dos experimentos independientes un efecto significativo del protocolo CA$^{6/2}$ sobre la tasa de aumento de peso en comparación con animales controles. Se evidenció un rápido aumento en el peso corporal, con diferencias significativas tan pronto como luego de sólo cuatro días bajo el protocolo de desincronización (Figuras 3.1a y 3.2a; ANOVA de dos vías con medidas repetidas, p<0,001 y p<0,05 para las condiciones del iluminación, respectivamente). El aumento progresivo puede observarse más allá de los 80 días luego del inicio del JLC (Figura 3.2a). Este aumento de peso no puede asociarse a un mayor consumo diario de alimento, ya que ambos grupos

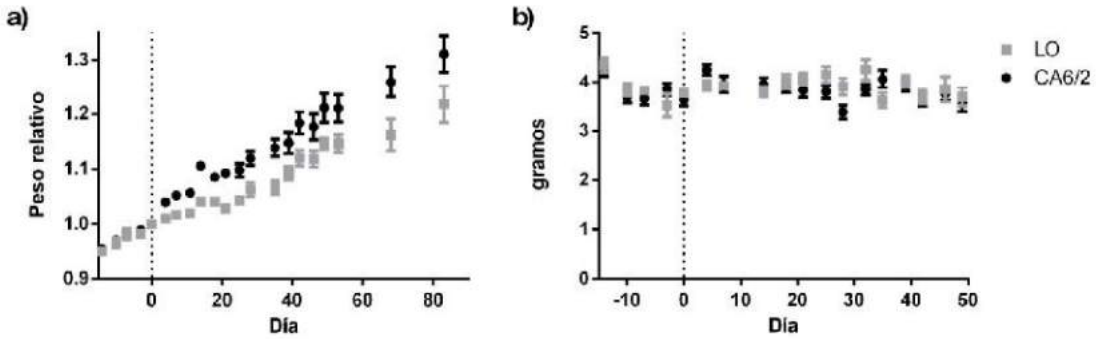


Figura 3.2 - Curvas de peso de ratones C57Bl/6 bajo el protocolo CA$^{6/2}$ a largo término. a) *Pesos relativos de ratones bajo condiciones de LO normal o CA$^{6/2}$, a lo largo de más de dos meses. El análisis de ANOVA-MR (a partir del día 4) indica efectos significativos del protocolo de jet-lag. Resultados ANOVA-MR: interacción ns.; tiempo p<0,0001; jet-lag p<0,05.* ***b)*** *Cantidad de alimento consumido diariamente a lo largo de los primeros 50 días del experimento. No se detectan diferencias entre los grupos. N: CA$^{6/2}$ = 14, LO = 5.*

consumieron cantidades equivalentes de alimento a lo largo de ambos experimentos (Figura 3.1b y 3.2b, para los experimentos en 3.1a y 3.2a, respectivamente), aproximadamente entre el 10% y el 15% de su peso corporal diariamente.

Efecto de la disponibilidad de rueda en el aumento de peso bajo JLC

Para este experimento se compararon las curvas de ganancia de peso de ratones C57Bl/6 bajo el protocolo CA$^{6/2}$ con disponibilidad de una rueda de ejercicio con las registradas por ratones bajo condiciones de LO control también con una rueda disponible. Recordemos que, como vimos en el capítulo 1, la presencia de una rueda en las jaulas de ratones bajo el protocolo CA$^{6/2}$ previene la desincronización forzada (Figura 2.8).

La inclusión de la rueda en la jaula provocó la desaparición de las diferencias en la velocidad de aumento de peso entre animales en condiciones controles y animales en JLC, a lo largo de los 30 días de registro (Figura 3.3a). La cantidad de alimento consumido por día fue equivalente entre ambos grupos (Figura 3.3b).

Ganancia de peso bajo el protocolo de retrasos crónicos $CR^{-6/2}$.

En el Capítulo anterior describimos como los ratones C57Bl/6 son capaces de sincronizarse correctamente a un protocolo de retrasos del ciclo LO de 6 horas cada dos días (Figura 2.9). Cuando se compararon las curvas de ganancia de peso de animales bajo el protocolo $CR^{-6/2}$ y animales bajo condiciones controles de LO, no se apreciaron diferencias en las tasas de ganancia de peso corporal (Figura 3.4a), ni sobre la cantidad de alimento consumido diariamente (Figura 3.4b) a lo largo de 30 días de registro.

Efecto del contacto social sobre la ganancia de peso bajo $CA^{6/2}$.

Cuando los animales se alojaron en jaulas en grupos de 3 o 4 animales, la ganancia de peso anormalmente rápida descrita en ratones bajo el protocolo $CA^{6/2}$ desapareció completamente al ser comparada con ratones bajo LO normal en las mismas condiciones de alojamiento (Figura 3.5). El alojamiento en grupos no nos permitió medir el consumo individual de alimento por día.

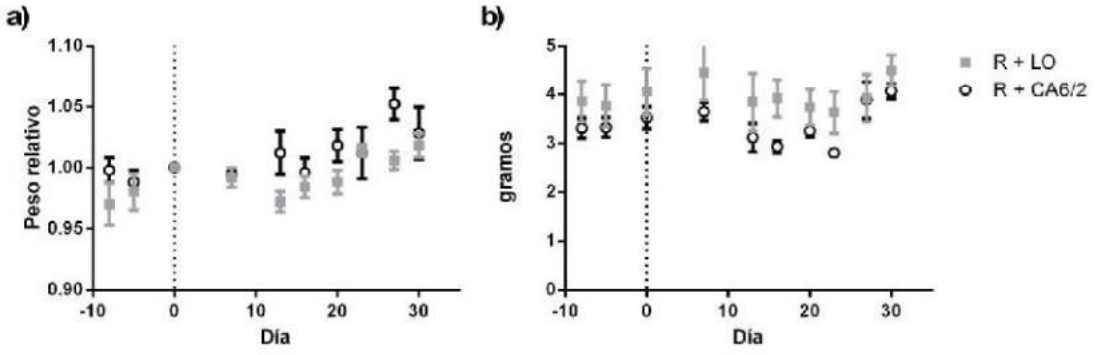


Figura 3.3 - Curvas de peso de ratones bajo CA$^{6/2}$ con disponibilidad de rueda. a) *Pesos relativos de ratones bajo condiciones de LO normal o CA$^{6/2}$, en ambos casos con acceso a una rueda (R + LO y R + CA$^{6/2}$, respectivamente). El análisis de ANOVA-MR (a partir del día 7) no indica efectos significativos del régimen de iluminación. Resultados ANOVA-MR: interacción ns.; tiempo p<0,0001; ns.* ***b)*** *Cantidad de alimento consumido diariamente a lo largo del experimento. No se detectan diferencias entre los grupos. N = 5 para ambos grupos.*

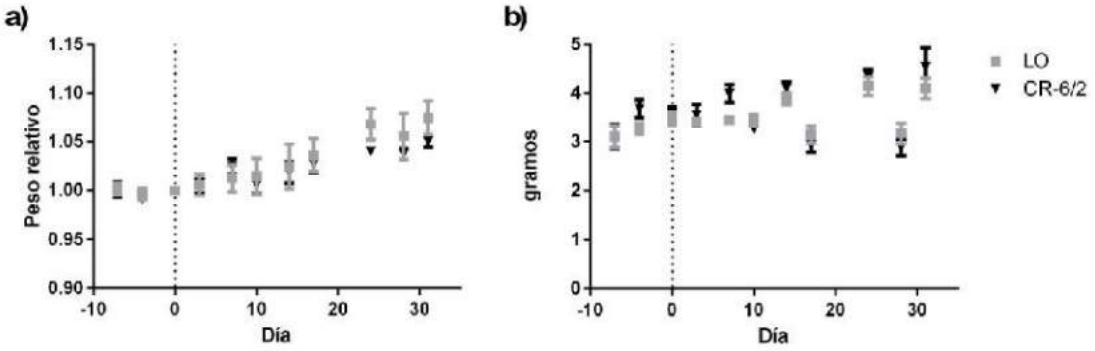


Figura 3.4 - Curvas de peso de ratones bajo el protocolo de retrasos CR$^{-6/2}$. ***a)*** *Pesos relativos de ratones bajo condiciones de LO normal o CR$^{-6/2}$. El análisis de ANOVA-MR (a partir del día 4) no indica efectos significativos del régimen de iluminación entre los grupos. Resultados ANOVA-MR: interacción ns.; tiempo p<0,0001; jet-lag ns.* ***b)*** *Cantidad de alimento consumido diariamente a lo largo del experimento. No se detectan diferencias entre los grupos. N = 5 para ambos grupos.*

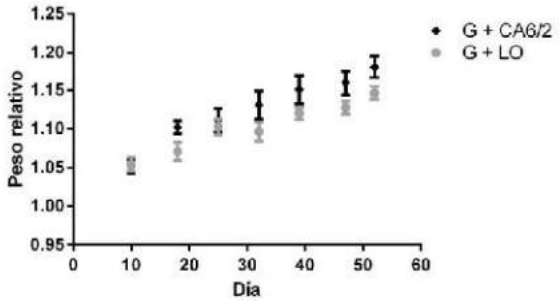


Figura 3.5 - Curvas de peso en animales alojados en grupos bajo el protocolo CA$^{6/2}$. *Pesos relativos de ratones bajo condiciones de LO normal o CA$^{6/2}$, en ambos casos alojados en grupos de 3 o 4 animales por jaula (G + LO y G + CA$^{6/2}$, respectivamente). El análisis de ANOVA-RM no indica efectos significativos del régimen de iluminación entre los grupos. Resultados ANOVA-MR: interacción p<0,05; tiempo p<0,0001; jet-lag ns. N = 11 para ambos grupos.*

Descripción de variables metabólicas bajo CA$^{6/2}$.

Para una descripción más profunda del efecto sobre el metabolismo provocado por nuestro modelo de desincronización, y su evolución temporal, tomamos muestras de distintos tejidos luego de 30 y 60 bajo el protocolo CA$^{6/2}$.

Triglicéridos en sangre. Verificamos un aumento de los niveles de triglicéridos circulantes en los animales bajo JLC tanto a los 30 como a los 60 días luego del inicio del protocolo (p<0,01 y p<0,05, respectivamente, según contrastes de Bonferroni a posteriori). Además comprobamos que los animales bajo CA$^{6/2}$ no muestran una variación significativa en dichos niveles entre la fase de luz y la de oscuridad, tal como se observa en los animales controles (p<0,05, según contraste de Bonferroni a posteriori; Figuras 3.6.a y b).

Leptinas en sangre. No observamos diferencias en los niveles de leptina circulante entre animales controles o bajo JLC. Tampoco detectamos

variaciones significativas entre las fases de luz y oscuridad en ninguno de los dos grupos (Figuras 3.6.c y d).

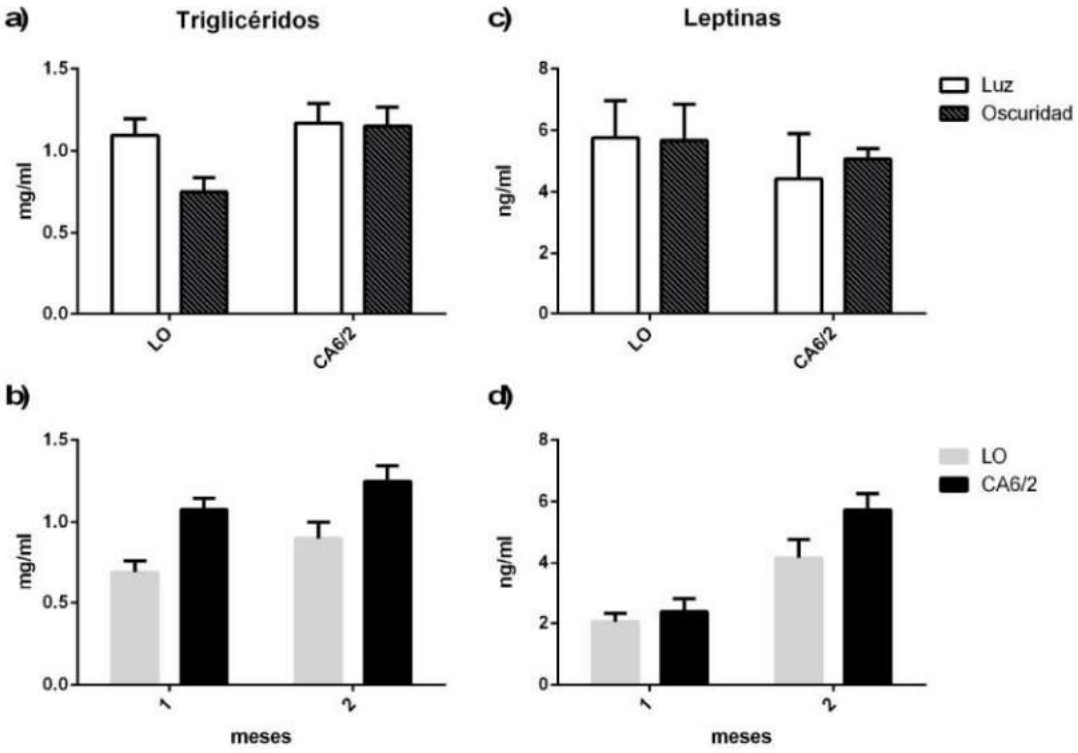
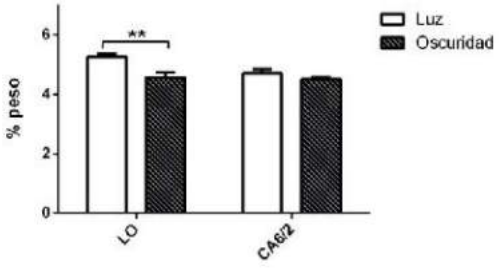


Figura 3.6 – Niveles de triglicéridos (a, b) y leptina circulantes (c, d) en ratones bajo LO o el protocolo CA$^{6/2}$. *Los paneles superiores muestran la variación luz-oscuridad de los niveles en ambos grupos al día 60 luego del inicio del protocolo. Los paneles inferiores muestran el promedio de los niveles en cada grupo luego de uno o dos meses del inicio del JLC. El análisis indica un efecto del jet-lag sobre los niveles de triglicéridos en sangre, en los que además de un aumento consistente se puede percibir la pérdida de la variación diaria observada en animales controles. Todos los análisis se realizaron por ANOVA de dos vías seguidos de contrastes de contrastes de Bonferroni intra-niveles (luz vs oscuridad en* ***a*** *y* ***c****, LO vs CA$^{6/2}$ en* ***b*** *y* ***d****); los asteriscos indican diferencias significativas en dichos contrastes. Resultados de los ANOVA:* ***a)*** *interacción ns.; jet-lag p<0,05; fase de luz ns.;* ***b)*** *interacción ns.; tiempo de exposición p<0,05; jet-lag p<0,0005;* ***c)*** *interacción ns.; jet-lag ns.; fase de luz ns.;* ***d)*** *interacción ns.; tiempo de exposición p<0,0001; jet-lag ns.. N:* ***a,c)*** *10 por grupo (5 por fase);* ***b,d)*** *8-11 en cada barra.*

Figura 3.7 – Variación diaria del peso hepático. *El protocolo CA$^{6/2}$ tiene efecto sobre la variación diaria observada en animales controles (según contrastes de Bonferroni a posteriori). El peso del hígado se muestra como porcentaje del peso corporal. Resultados ANOVA: interacción ns.; jet-lag p<0,01; fase de luz p<0,05).*



Peso hepático. Pudimos determinar un efecto del protocolo CA$^{6/2}$ sobre el ritmo diario del peso del hígado. En los ratones controles bajo LO se observa una variación significativa con mayor peso hepático durante la fase de luz (según contraste de Bonferroni a posteriori, p<0,01), mientras que este ritmo se ve abolido bajo JLC (Figura 3.7). No observamos diferencias en el peso promedio del hígado entre los grupos en ninguno de los puntos temporales post inicio del tratamiento.

Masa de tejido adiposo. Encontramos un efecto significativo del protocolo CA$^{6/2}$ sobre la cantidad de tejido adiposo retroperitoneal y epididimal, que aumentó significativmente luego de 60 días bajo el esquema de JLC (p<0,01 y p<0,001, respectivamente, según contrastes de Bonferroni a posteriori). El efecto no es detectable en los primeros 30 días post inicio del protocolo (Figura 3.8).

Tamaño de adipocitos retroperitoneales. A partir de preparados histológicos, evaluamos el área de los adipocitos retroperitoneales. El protocolo de JLC tuvo un efecto sobre el tamaño celular evidente sólo luego de 60 días post inicio

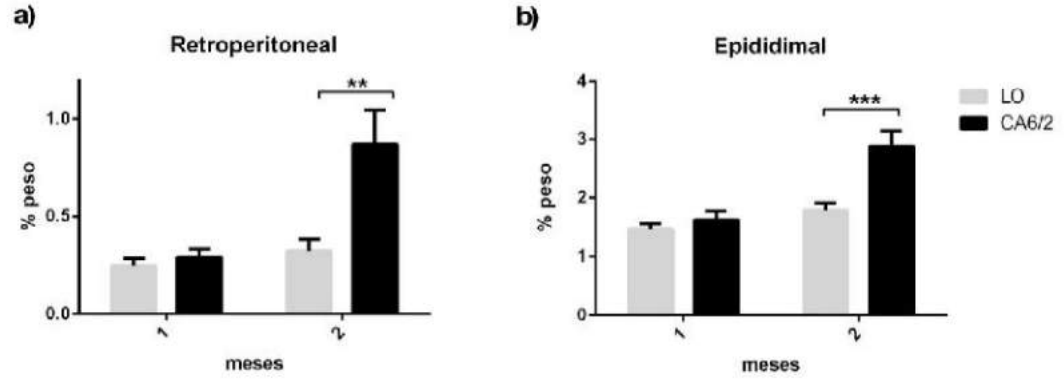


Figura 3.8 – Masa de los tejidos adiposos retroperitoneales y epididimales. *Se presentan las masas como porcentajes del peso corporal. El protocolo $CA^{6/2}$ provoca un aumento significativo de las masas de ambos tejidos luego de 60 días, mientras que no se observa un efecto en el primer mes de tratamiento. Los asteriscos indican diferencias significativas según contrastes de Bonferroni a posteriori. Resultados ANOVA:* ***a)*** *interacción p<0,05; tiempo de exposición p<0,01; jet-lag p<0,01;* ***b)*** *interacción p<0,05; tiempo de exposición p<0,001; jet-lag p<0,01. N=8-11 en cada barra.*

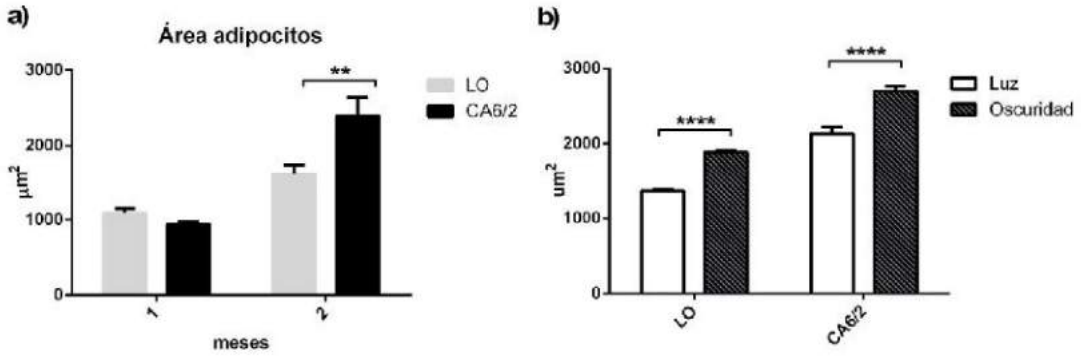


Figura 3.9 - Tamaño de adipocitos retroperitoneales. *El protocolo $CA^{6/2}$ provoca un aumento significativo en el área de células adiposas luego de 60 días.* ***a)*** *Área de adipocitos luego de 1 o 2 meses de JLC.* ***b)*** *Variación diaria a los 2 meses de iniciado el protocolo. Todos los análisis se realizaron por ANOVA de dos vías seguidos de contrastes de contrastes de Bonferroni intra-niveles (LO vs $CA^{6/2}$ en* ***a*** *y luz vs oscuridad en* ***b****); los asteriscos indican diferencias significativas en dichos contrastes. Resultados de los ANOVA:* ***a)*** *interacción p<0,01; tiempo de exposición p<0,0001; jet-lag p<0,05; b) interacción ns.; jet-lag p<0,0001; fase de luz p<0,0001. N=4-5 en todas las barras.*

($p<0,01$, según contrastes de Bonferroni a posteriori). Tanto en ratones controles como bajo $CA^{6/2}$ se observaron variaciones significativas entre fases de luz y oscuridad ($p<0,0001$ para ambos grupos, según contrastes de Bonferroni a posteriori; Figura 3.9).

Restricción de la disponibilidad de alimento a las horas de oscuridad.

Detengámonos un momento para comentar brevemente las razones que nos llevaron a realizar el siguiente experimento. En la Discusión de este capítulo trataremos el tema en detalle, pero algunas palabras previas nos ayudarán a comprenderlo más fácilmente.

Como hemos comentado en la Introducción, los animales observan un ritmo de ingesta de alimento y bebida que está a su vez organizado con el conjunto de los ritmos metabólicos, de forma de optimizar el aprovechamiento de las fuentes de energía. A su vez, mencionamos que la disponibilidad de alimento representa un importante *zeitgeber per se*. Se ha observado que la ingesta de alimento fuera de la fase normal determinada circadianamente tiene efectos marcados sobre el metabolismo y la fisiología en general, incluyendo no sorprendentemente el aumento anormal de peso.

Por todo esto, y algunas otras razones que analizaremos más adelante, planteamos la posibilidad de que forzar la ingesta de alimento a la fase de oscuridad del esquema $CA^{6/2}$ (la fase en la que se espera que los animales estén activos, si pudieran sincronizar al esquema) pudiera prevenir en parte las alteraciones sobre el metabolismo de dicho protocolo.

Ahora sí, veamos los resultados. La restricción de la disponibilidad de alimento a las primeras seis horas de cada período de oscuridad abolió el aumento anormal de peso observado previamente en animales bajo $CA^{6/2}$. Este efecto benigno se observó durante 30 días del protocolo combinado. En la Figura 3.10 se muestran los resultados del experimento a través de cortes temporales a los 11, 21 y 30 días.

A lo largo del mes, se observa el aumento progresivo del peso de los animales alimentados *ad libitum* bajo $CA^{6/2}$ en relación a los controles bajo LO normal, tal como habíamos verificado anteriormente. Observamos que algunos animales alimentados en las horas de oscuridad, tanto los controles como aquellos bajo JLC, sufren una pérdida inicial de peso que podría asociarse a un estrés agudo por el cambio de régimen, ya que no se observa un menor consumo de alimento. A lo largo del período experimental se pudo observar cómo ambos grupos alimentados en la oscuridad mostraron un peso corporal no distinto al del grupo control alimentado *ad libitum* en condiciones de LO normales. Para el fin del experimento en el día 30, los animales alimentados durante la fase oscura en ambas condiciones de iluminación mostraron niveles de aumento de peso indistinguibles de los controles (Figura 3.10). Al eliminarse la restricción de alimento, los animales bajo $CA^{6/2}$ rápidamente comenzaron a aumentar de peso como describimos en los experimentos originales.

El protocolo de restricción del alimento a las horas de la noche no tuvo efectos sobre la desincronización de los ritmos de actividad locomotora general bajo $CA^{6/2}$. Como puede verse en la Figura 3.11, los animales siguen mostrando el mismo patrón de desincronización descrito en el Capítulo I, con un componente

de período corto sincronizado al ciclo de JLC, y un componente de período largo en coordinación relativa.

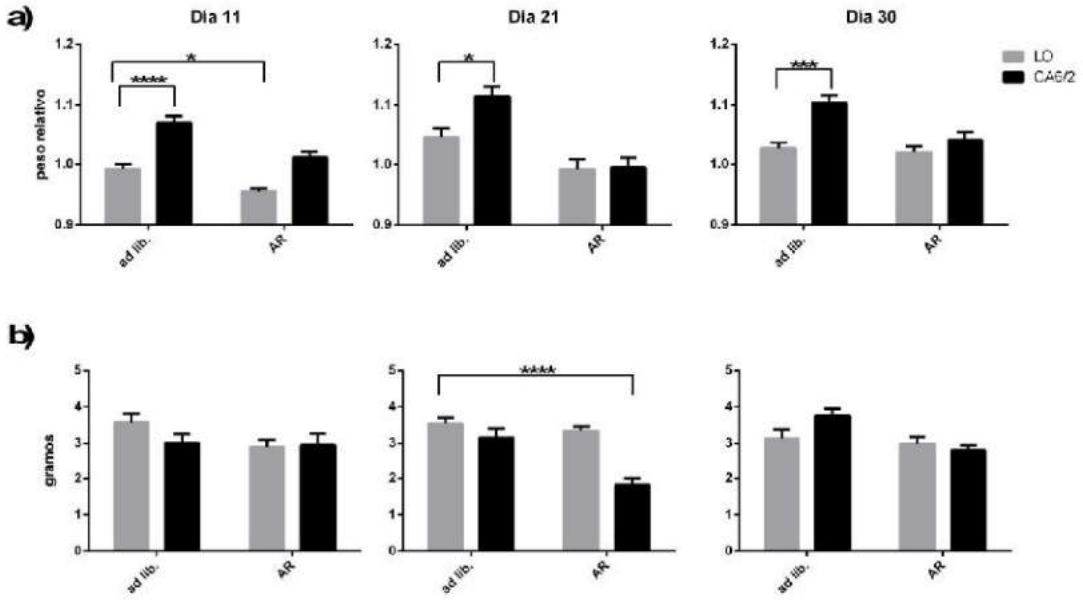


Figura 3.10 - Efecto de la restricción del alimento a las horas de oscuridad durante el protocolo de CA$^{6/2}$. a) *Pesos relativos y* ***b)*** *consumo de alimento de ratones bajo las cuatro combinaciones de condiciones de alimentación e iluminación, en los días 11, 21 y 30 luego del inicio de los protocolos. Cada corte temporal fue analizado por ANOVA de dos vías y contrastes de Dunnett para comparar cada grupo al "control", es decir el alimentado ad libitum bajo LO (diferencias significativas indicadas con asteriscos). Resultados de ANOVA:* ***a)*** *Día 11: interacción ns.; alimentación p<0,0001; jet-lag p<0,0001; Día 21: interacción ns.; alimentación p<0,0001; jet-lag p<0,05; Día 30: interacción p<0,05; alimentación p<0,01; jet-lag p<0,001.;* ***b)*** *Día 11: interacción ns.; alimentación ns.; jet-lag ns.; Día 21: interacción p<0,01; alimentación p<0,001; jet-lag p<0,0001; Día 30: interacción p<0,05; alimentación p<0,01; jet-lag ns.*

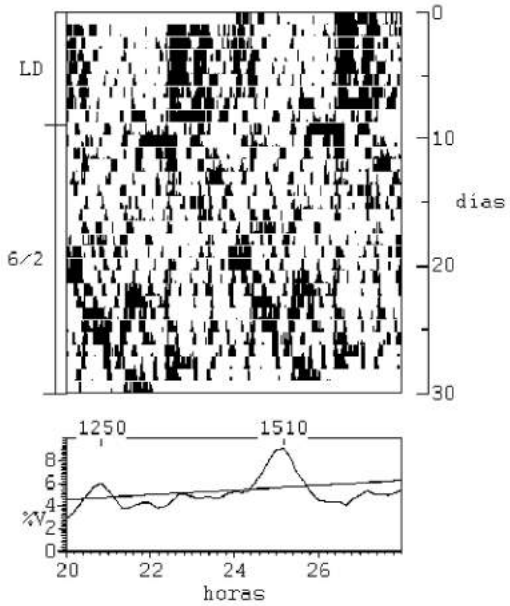


Figura 3.11 - Restricción del alimento a la fase de oscuridad bajo CA$^{6/2}$. *Actograma doble de actividad locomotora general y periodograma SB de un ratón C57Bl/6 representativo bajo CA$^{6/2}$ con alimentación restringida a las horas de oscuridad. El protocolo de alimentación no inhibe la desincronización forzada de los ritmos de actividad locomotora.*

Discusión:

Entre los problemas más reportados en la bibliografía que sufren trabajadores en turnos y nocturnos están los relacionados al metabolismo, principalmente la obesidad, entre otros que contribuyen a lo que conocemos como síndrome metabólico. Tales patologías no son sólo importantes por sí mismas, sino también por el alcance que puede alcanzar a su vez la desregulación del metabolismo sobre otros sistemas y posibles enfermedades, incluyendo el cáncer (Sahar & Sassone-Corsi, 2009).

La regulación de la función metabólica por parte del sistema circadiano es un campo muy bien estudiado dentro del campo de los ritmos biológicos. Como ya hemos mencionado en la Introducción, todos los animales poseen ritmos consistentes en lo que se refiere a la ingesta de alimento y bebida y, a su vez, en la eficiencia de las funciones metabólicas para la optimización del uso de los recursos energéticos. Tan importante en términos circadianos es la cuestión de la disponibilidad y el aprovechamiento el alimento, que incluso éste puede servir como un fuerte estímulo sincronizador cuando se lo presenta restringidamente.

En este capítulo hemos caracterizado alteraciones metabólicas presentes en nuestro modelo de desincronización forzada del sistema circadiano por *jet lag* experimental crónico en ratones. La observación principal que hicimos fue que muy prontamente luego del comienzo del protocolo $CA^{6/2}$ los animales comienzan a aumentar de peso a mayor velocidad que animales en condiciones controles. El aumento de peso anormal observado continúa más

allá de los 80 días luego del inicio del protocolo (Figura 3.1), y no tiene relación con la cantidad de alimento consumido.

El nuestro no es el primer modelo de perturbación de los ritmos biológicos con marcadas alteraciones sobre el metabolismo. Se han descripto alteraciones metabólicas en otros modelos de estrés del sistema circadiano, tanto por la manipulación de las condiciones de iluminación como en cepas mutantes de genes reloj. Los ratones mutantes de *clock* presentan ritmos de alimentación alterados, obesidad y varios signos de síndrome metabólico (Turek et al., 2005). Por otro lado, cuando se somete a ratones a un ciclo de LO de 20 horas de período se observa un aumento de peso acelerado y alteraciones a nivel hormonal (Karatsoreos et al., 2011).

Es interesante que el cambio en la tasa de aumento de peso se produzca de forma tan temprana luego del inicio del JLC. Normalmente, se creería que una alteración de la función metabólica deriva en un aumento de peso a través de la acumulación progresiva de anormalidades en distintos niveles. De hecho, hemos estudiado algunas variables metabólicas que pudieran explicar el cuadro observado, y detectamos que las mismas muestran alteraciones que se acentúan justamente durante el segundo mes del protocolo. Sin embargo, el aumento de peso es muy temprano, con diferencias observables en la primera semana luego del inicio del JLC. Entonces, debemos pensar en otra causa adicional que nos permita explicar esta observación

Como hemos mencionado, la ingesta de alimento muestra un ritmo muy consistente, reduciéndose principalmente a la fase de actividad del animal, la noche en el caso de los ratones. En coincidencia, durante la fase oscura las

diversas funciones metabólicas se encuentran organizadas de maximizar la eficiencia en el aprovechamiento de las fuentes de energía. Se ha comprobado que la alimentación restringida a ciertos momentos del ciclo LO tiene efectos diversos sobre el sistema circadiano y la fisiología en general; en especial la alimentación durante la fase de reposo afecta particularmente la función circadiana (Damiola et al., 2000; Salgado-Delgado et al., 2013). En algunos experimentos en los que se ha restringido la disponibilidad de alimento a las horas de descanso (en contraste con las horas de actividad) de los animales se ha observado un aumento anormal de peso y cambios en el balance energético tanto con alimentación normal (Bray et al., 2013) o alta en grasa (Arble et al., 2009); existen no obstante algunos investigadores que no han encontrado el mismo efecto (Shamsi et al., 2014). Bray y colaboradores fueron capaces de detectar un aumento de peso significativamente alto a los 9 días de comenzado el protocolo de restricción del alimento a la fase diurna.

Una hipótesis que podemos elaborar a partir de estos hallazgos para explicar el aumento rápido inicial de peso en los animales desincronizados tiene que ver con una posible desincronización entre (e *intra*) el conjunto de los ritmos en la función metabólica con el ritmo de ingesta de alimento y actividad. Una vez comenzado el desequilibrio en la ganancia de peso sumada la desregulación interna del metabolismo se alcanza el cuadro observado en el segundo mes luego del comienzo del protocolo de JLC. Si bien necesitaríamos experimentos más específicos para comprobar la validez de esta teoría (los cuales discutiremos más abajo), tenemos algunos indicios que nos llevan a considerarla por lo menos factible. La desincronización interna del sistema circadiano, que hemos podido observar al nivel de la actividad locomotora y la

temperatura corporal, puede estar alterando la puesta en fase de otros ritmos biológicos, incluyendo aquellos en la función metabólica. Hemos comprobado la pérdida de los ritmos diarios de algunas variables como el nivel de triglicéridos y del peso hepático bajo JLC, lo que reforzaría la noción de que la desincronización también alcanza el metabolismo. La correlación entre la desincronización forzada en el modelo y el aumento de peso se vio reforzada por la ausencia de alteraciones en los ratones cuando los mismos se colocaron bajo condiciones de JLC que no producen desincronización, como el protocolo de retrasos $CR^{-6/2}$ o la inclusión de una rueda durante el esquema $CA^{6/2}$. Volveremos sobre estos experimentos en breve.

Entonces, ¿es posible que el aumento inicial observado se deba una desincronización entre los episodios de ingesta y las fases de mayor eficiencia metabólica? ¿Podrían los animales en JLC estar comiendo "de día (metabólico)", o simplemente comiendo a cualquier hora? Un indicio en esta dirección podría estar dado justamente por la alteración del ritmo normal de la masa hepática. Está descripto que en roedores nocturnos el hígado muestra normalmente un ritmo de peso con valores altos durante el día y, a su vez, también lo comprobamos en nuestros ratones en condiciones normales de luz y oscuridad (Figura 3.7). Se sabe que si se modifica la fase en la que se produce la ingesta (limitando la disponibilidad del alimento a determinados momentos del día), la fase del ritmo del peso hepático se modifica mostrando los valores más altos alrededor de 12 horas luego del comienzo del período de alimentación (Sitren & Stevenson, 1978; Stokkan et al., 2001). En los animales bajo $CA^{6/2}$ no hay variación del peso hepático entre las fases de luz y oscuridad, lo cual, si bien no habla de la ausencia de un patrón de ingesta,

podría indicar al menos la ausencia de un patrón coincidente con las fases de luz del esquema de JLC.

Por todo esto decidimos evaluar la evolución de los ratones bajo $CA^{6/2}$ cuando sólo pudieran acceder al alimento durante la fase de oscuridad. De esta forma lograríamos forzar (o al menos eso esperaríamos) un patrón rítmico de ingesta que, idealmente, pudiera mejorar el cuadro metabólico observado en los animales bajo el protocolo de desincronización. Esta estrategia no es nada nueva, ya que se ha verificado su utilidad en otros modelos animales de desincronización interna, como por ejemplo en el modelo de trabajo diurno forzado en ratas (Salgado-Delgado et al., 2010). El experimento se diseñó teniendo en cuenta dos posibilidades: que la disponibilidad del alimento 1) funcionara como un refuerzo de la señal fótica (previniendo en consecuencia la desincronización) y/o 2) que coincidiera con el momento de mayor eficiencia metabólica, ya sea porque ésta se encuentre en fase con el período de oscuridad o porque la misma ingesta la sincronice a dicho período. La primera hipótesis no era prometedora ya que es sabido que si bien la disponibilidad de alimento es un *zeitgeber* en sí mismo, no tiene capacidad de sincronizar los ritmos de actividad dirigidos por los NSQ (Hara et al., 2001). La segunda hipótesis es más interesante justamente porque la capacidad sincronizadora del alimento está relacionada más específicamente con el conjunto de relojes periféricos asociados al aprovechamiento de las fuentes energéticas (Schibler et al., 2003). Podríamos esperar que la alimentación temporizada indujera la sincronización de al menos algunos ritmos suficientes para normalizar la función metabólica y prevenir el aumento desmedido de peso observado bajo el protocolo $CA^{6/2}$.

La restricción del alimento a las primeras 6 horas de la fase de oscuridad logró rescatar el aumento elevado de peso en los animales bajo JLC a lo largo de 30 días de tratamiento (Figura 3.6), sin modificar los niveles de ingesta. La restricción no logró prevenir la desincronización forzada de los ritmos de actividad locomotora (Figura 3.11), por lo que el efecto de la temporización del alimento debe suscribirse estrictamente a variables metabólicas. Nos queda entonces definitivamente considerar la segunda de las posibilidades citadas, es decir, que el conjunto de ritmos que regulan la eficiencia metabólica se encuentre en fase con las horas de oscuridad durante la desincronización (lo cual en principio sería poco probable), o que esta puesta en fase sea consecuencia de la restricción de la ingesta a dichas horas (más factible). De cualquier forma, estos resultados apoyarían la hipótesis de que, al menos en principio y parcialmente, el aumento rápido inicial de peso luego del inicio del protocolo de JLC se debería a una desincronización entre el ritmo de consumo de alimento (o la ausencia del mismo) y los ritmos de la función metabólica.

Para verificar esta hipótesis se deberían resolver dos cuestiones. La primera sería describir cómo es el comportamiento de consumo de alimento bajo el protocolo $CA^{6/2}$, para luego relacionarlo a la función metabólica. La descripción de un ritmo de ingesta, o el descubrimiento de la ausencia de éste, significaría además una profundización en la caracterización específica del modelo de desincronización. La segunda sería el estudio específico de los ritmos de diversas variables metabólicas durante el protocolo de JLC.

Uno de los objetivos más importantes del estudio de modelos de alteración de los ritmos circadianos (como paradigma de la investigación de los cuadros de

salud asociados al trabajo en turnos rotativos y nocturno en humanos) es el diseño de herramientas para aliviar dichos inconvenientes. Hemos estudiado la evolución del peso corporal bajo otros protocolos de JLC, y los resultados podrían servir como elementos en este sentido.

Como vimos en el Capítulo I, la inclusión de una rueda en la jaula previene la desincronización forzada en el esquema de $CA^{6/2}$ y permite la sincronización de los animales. A su vez, en este capítulo comprobamos que la ausencia de desincronización debida a la inclusión de la rueda se ve acompañada de la normalización del aumento de peso en comparación con los controles también en presencia de la rueda (Figura 3.3), sin modificar los niveles de ingesta. Tampoco observamos un aumento anormal de peso cuando sometimos a los animales al protocolo de JLC por retrasos $CR^{-6/2}$, al cual como ya hemos visto los ratones pueden sincronizarse perfectamente (Figura 3.4).

En un tercer experimento, observamos que la ganancia anormal de peso asociada al protocolo de $CA^{6/2}$ desaparece cuando los animales se alojan en grupos (Figura 3.5). La interacción social es un excelente ejemplo de estímulo no fótico bien caracterizado, así como un elemento importante dentro de las vías de retroalimentación del sistema circadiano (Mistlberger & Skene, 2004). La interacción grupal es capaz de modular los ritmos biológicos en hámsteres (Mrosovsky, 1988), degúes (Goel & Lee, 1995), ardillas (Rajaratnam & Redman, 1999), ratas (Cambras et al., 2011), ratones (Crowley & Bovet, 1980; Viswanathan, 1999) y otras especies. Existe la posibilidad de que exista un efecto de refuerzo de la sincronización a través de la retroalimentación debida al contacto social en nuestro experimento que permita una adaptación exitosa

al ciclo LO. De acuerdo a la correlación entre desincronización forzada y aumento desmedido de peso, la desaparición de la primera podría estar acompañada de la normalización de lo segundo. Un experimento en marcha en nuestro laboratorio es verificar si la desincronización forzada bajo JLC se mantiene cuando los ratones son alojados en grupos, mediante el registro de temperatura corporal.

En resumen, surgen cuatro factores para ser analizados cuidadosamente en la evaluación de estrategias terapéuticas para mejorar la salud y la calidad de vida de trabajadores en turnos rotativos: estímulos que refuercen la sincronización (actividad física y contacto social), temporización adecuada de los eventos de ingesta, y optimización de los esquemas de trabajo rotativos (retrasos o avances). Este último factor ha sido y sigue siendo uno de los más estudiados en poblaciones de trabajadores en turnos. La mayor parte de la evidencia apunta a una mejor capacidad de adaptación y menor cantidad de efectos adversos en los esquemas de retrasos, pero probablemente lo más indicado sería avanzar en el diseño de estrategias personalizadas (Czeisler et al., 1982).

Nuestros resultados son consistentes con los trabajos de otros investigadores en modelos relacionados. Salgado-Delgado y colaboradores desarrollaron un modelo de trabajo diurno en ratas, emulando el trabajo nocturno en humanos, en el que en pocas palabras, fuerzan a los animales a estar activos durante las horas de descanso. Bajo este protocolo, han demostrado que se produce una desincronización interna, incluyendo un aumento de peso anormal y la

alteración del patrón de ingesta de alimento (Salgado-Delgado et al., 2008; Salgado-Delgado et al., 2013). Sin embargo, como hemos mencionado más arriba, han logrado prevenir el efecto del trabajo forzado sobre el aumento de masa corporal cuando se permite a las ratas alimentarse solamente durante la fase oscura (Salgado-Delgado et al., 2010).

Resumen final:

- El protocolo $CA^{6/2}$, que demostrara producir la desincronización forzada del ritmo de actividad locomotora general en ratones, produce rápidamente un aumento significativo en la tasa de ganancia de peso corporal, que no se ve justificado por un aumento en el consumo diario de alimento.

- El aumento de peso producto del JLC se ve acompañado por alteraciones metabólicas a nivel plasmático en los niveles de triglicéridos, a nivel tisular en el área de las células del tejido adiposo y a nivel orgánico en las cantidades de tejido adiposo retroperitoneal y epididimal y en los ritmos del peso del hígado. La mayoría de estas alteraciones se hacen más patentes durante el segundo mes posterior al inicio del protocolo $CA^{6/2}$.

- La inclusión de una rueda en la jaula durante el protocolo de $CA^{6/2}$, que hemos visto previene la desincronización de los ritmos de actividad, es capaz de abolir el aumento anormal de peso corporal observado bajo dicho esquema de JLC.

- El alojamiento de animales en grupos también inhibe el efecto de $CA^{6/2}$ sobre el aumento de peso de los animales.

- Bajo el protocolo de retrasos crónicos $CR^{-6/2}$, al cual los animales son capaces de sincronizar sin inconvenientes, no se observa alteración de la tasa de ganancia de peso corporal.

- Restringir la disponibilidad de alimento a las horas de oscuridad bajo el protocolo de $CA^{6/2}$ devuelve a los animales el fenotipo normal de ganancia de peso a lo largo de 30 días de tratamiento.

- Se plantea la hipótesis de que el aumento de peso observado bajo $CA^{6/2}$ se produce en base a la desincronización interna de variables metabólicas y del ritmo de consumo de alimento.

Referencias

Arble, DM, Bass, J, Laposky, AD, Vitaterna, MH, & Turek, FW. (2009). Circadian timing of food intake contributes to weight gain. *Obesity (Silver Spring), 17*(11), 2100-2102.

Bray, MS, Ratcliffe, WF, Grenett, MH, Brewer, RA, Gamble, KL, & Young, ME. (2013). Quantitative analysis of light-phase restricted feeding reveals metabolic dyssynchrony in mice. *Int J Obes (Lond), 37*(6), 843-852.

Cambras, T, Castejon, L, & Diez-Noguera, A. (2011). Social interaction and sex differences influence rat temperature circadian rhythm under LD cycles and constant light. *Physiol Behav, 103*(3-4), 365-371.

Crowley, M, & Bovet, J. (1980). Social synchronization of circadian rhythms in deer mice (Peromyscus maniculatus). *Behavioral Ecology and Sociobiology, 7*(2), 99-105.

Czeisler, CA, Moore-Ede, MC, & Coleman, RH. (1982). Rotating shift work schedules that disrupt sleep are improved by applying circadian principles. *Science, 217*(4558), 460-463.

Damiola, F, Le Minh, N, Preitner, N, Kornmann, B, Fleury-Olela, F, & Schibler, U. (2000). Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev, 14*(23), 2950-2961.

Goel, N, & Lee, TM. (1995). Sex differences and effects of social cues on daily rhythms following phase advances in Octodon degus. *Physiol Behav, 58*(2), 205-213.

Hara, R, Wan, K, Wakamatsu, H, Aida, R, Moriya, T, Akiyama, M, et al. (2001). Restricted feeding entrains liver clock without participation of the suprachiasmatic nucleus. *Genes Cells, 6*(3), 269-278.

Karatsoreos, IN, Bhagat, S, Bloss, EB, Morrison, JH, & McEwen, BS. (2011). Disruption of circadian clocks has ramifications for metabolism, brain, and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A, 108*(4), 1657-1662.

Mistlberger, RE, & Skene, DJ. (2004). Social influences on mammalian circadian rhythms: animal and human studies. *Biol Rev Camb Philos Soc, 79*(3), 533-556.

Mrosovsky, N. (1988). Phase response curves for social entrainment. *J Comp Physiol A, 162*(1), 35-46.

Rajaratnam, SM, & Redman, JR. (1999). Social contact synchronizes free-running activity rhythms of diurnal palm squirrels. *Physiol Behav, 66*(1), 21-26.

Sahar, S, & Sassone-Corsi, P. (2009). Metabolism and cancer: the circadian clock connection. *Nat Rev Cancer, 9*(12), 886-896.

Salgado-Delgado, R, Angeles-Castellanos, M, Buijs, MR, & Escobar, C. (2008). Internal desynchronization in a model of night-work by forced activity in rats. *Neuroscience, 154*(3), 922-931.

Salgado-Delgado, R, Angeles-Castellanos, M, Saderi, N, Buijs, RM, & Escobar, C. (2010). Food intake during the normal activity phase prevents obesity and circadian desynchrony in a rat model of night work. *Endocrinology, 151*(3), 1019-1029.

Salgado-Delgado, RC, Saderi, N, Basualdo Mdel, C, Guerrero-Vargas, NN, Escobar, C, & Buijs, RM. (2013). Shift work or food intake during the rest phase promotes metabolic disruption and desynchrony of liver genes in male rats. *PLoS One, 8*(4), e60052.

Schibler, U, Ripperger, J, & Brown, SA. (2003). Peripheral circadian oscillators in mammals: time and food. *J Biol Rhythms, 18*(3), 250-260.

Shamsi, NA, Salkeld, MD, Rattanatray, L, Voultsios, A, Varcoe, TJ, Boden, MJ, et al. (2014). Metabolic consequences of timed feeding in mice. *Physiol Behav, 128*, 188-201.

Sitren, HS, & Stevenson, NR. (1978). The effects of meal-feeding at different times of the day on daily changes in serum insulin, gastrin and liver enzymes in the rat. *J Nutr, 108*(9), 1393-1401.

Stokkan, KA, Yamazaki, S, Tei, H, Sakaki, Y, & Menaker, M. (2001). Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science, 291*(5503), 490-493.

Turek, FW, Joshu, C, Kohsaka, A, Lin, E, Ivanova, G, McDearmon, E, et al. (2005). Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science, 308*(5724), 1043-1045.

Viswanathan, N. (1999). Maternal entrainment in the circadian activity rhythm of laboratory mouse (C57BL/6J). *Physiol Behav, 68*(1-2), 157-162.

CONCLUSIONES FINALES

<u>Última página:</u> perspectivas a futuro y conclusiones finales

El trabajo de esta tesis se dividió en dos grandes capítulos. En el primero desarrollamos y caracterizamos un modelo experimental en ratones de utilidad en el estudio no sólo de los mecanismos de adaptación del sistema circadiano de mamíferos a condiciones de estrés. En el segundo capítulo describimos una serie de disturbios metabólicos en el modelo de desincronización desarrollado que inaugura el estudio de los problemas de salud relacionados con dichas condiciones. Recapitulemos entonces ahora resumidamente los resultados principales de la tesis, y planteemos luego las preguntas que de ellos derivan de los mismos y que aún resta resolver.

Nuestro objetivo general fue aumentar el conocimiento y generar herramientas para el estudio de los perjuicios para la salud de las condiciones extremas de iluminación a las que se ven sometidos trabajadores de distintos campos. En particular, nos interesaba analizar el caso de los trabajadores en turnos rotativos, quienes sabemos sufren de numerosos problemas de salud de diversos tipos. Para ello, nos propusimos trabajar en roedores de acuerdo con uno de los paradigmas experimentales actualmente en uso, como son los ciclos de *jet lag* experimental crónico (JLC).

A través de la exposición a un protocolo de adelantos crónicos del ciclo de luz-oscuridad, consistente en avances de 6 horas cada dos días, logramos inducir en ratones C57Bl/6 un comportamiento característico conocido en cronobiología como “desincronización forzada”. Este patrón pudimos detectarlo a nivel de los ritmos de actividad locomotora general y de la temperatura interna. Simultáneamente, desarrollamos un modelo matemático que nos

permitió explicar por qué y de qué forma protocolos de JLC podían, o no, inducir la desincronización del sistema circadiano, y acompañamos ese desarrollo con experimentos en el laboratorio que permitieron comprobar las predicciones del modelo. Propusimos que los protocolos de JLC funcionan como *zeitgebers* cuyas características y efectos dependen de las características de los mismos. Esto nos permitió describir protocolos y variables experimentales que son capaces de modificar la respuesta del sistema circadiano al proceso de JLC, incluyendo la dirección del esquema de jet lag, sus parámetros de diseño (frecuencia y amplitud de los cambios), y la inclusión de una rueda como refuerzo de la sincronización.

De esta forma el primer capítulo de esta tesis se presenta como la descripción de una herramienta original y una teoría que la sustenta igualmente novedosa en uno de los campos básicos de la cronobiología, como es el estudio de los mecanismos de sincronización fótica del sistema circadiano central.

Una cuestión interesante a resolver es a qué nivel dentro del sistema circadiano surge la desincronización forzada en este modelo experimental. En el modelo clásico de desincronización forzada en ratas por exposición a ciclos de luz-oscuridad de 22 horas, se ha comprobado mediante la técnica de hibridación *in situ* que la desincronización se produce al nivel de las dos regiones de los NSQ. En dicho modelo se verifica que la expresión de genes reloj se encuentra desincronizada entre las regiones ventrolateral y dorsomedial de los NSQ, y que cada una de ellas controla uno de los componentes rítmicos de actividad locomotora. Si bien se plantea la hipótesis de que este mismo mecanismo pueda estar involucrado en nuestro modelo, resta ponerla a prueba mediante la aplicación de técnicas más avanzadas.

En base a nuestros resultados, y al modelo matemático construido, también podría darse lugar a hipótesis acerca de posibles tratamientos farmacológicos que podrían modificar el cuadro de desincronización observado, en busca de una adaptación al esquema de iluminación. Tanto en nuestro laboratorio como en muchos otros en el campo cronobiológico se han descripto agentes farmacológicos que tienen efecto tanto sobre la cascada de señalización fótica en las neuronas de los NSQ como en el acoplamiento entre las regiones de éste que logra acelerar la resincronización o aumentar la respuesta ante pulsos de luz del reloj. Debieran realizarse pruebas administrando algunas de estas drogas a animales bajo nuestro protocolo de desincronización para verificar si pueden aliviarse los efectos del mismo.

Luego de establecer y caracterizar el modelo experimental nos abocamos a estudiar una de las posibles alteraciones fisiológicas que podrían surgir bajo el cuadro de desincronización forzada. Tanto en humanos como en animales de laboratorio se han observado con frecuencia alteraciones metabólicas variadas en diversos modelos de perturbación de la función circadiana. Siendo el síndrome metabólico una enfermedad tan prevalente y en crecimiento a nivel mundial, y en particular en poblaciones de trabajadores en turnos rotativos y nocturnos, consideramos importante estudiar los potenciales problemas metabólicos presentes en nuestro novedoso modelo experimental.

En nuestros experimentos pudimos comprobar que bajo el protocolo de desincronización forzada rápidamente los animales sufren un aumento anormal de peso que se mantiene a lo largo de aproximadamente tres meses, por lo menos. Además describimos variables metabólicas específicas que se encuentran alteradas durante la desincronización forzada, y mostramos que

estas alteraciones muestran un curso temporal y que se acentúan a partir de los 30 días del comienzo del protocolo. Verificamos también que el aumento alterado de peso no se produce bajo los protocolos de JLC en los que no se observa desincronización (por ejemplo, en los esquemas de retrasos, o con la inclusión de una rueda). En estas condiciones, los animales mostraron curvas de peso normales, sugiriendo que existe una asociación entre la desincronización del sistema circadiano y el aumento alterado de peso. Tampoco observamos un alteración de la ganancia de peso cuando alojamos a los animales en grupos bajo condiciones de desincronización, lo que podría indicar un efecto de la interacción social sobre la respuesta al protocolo de JLC.

Estudios anteriores de otros grupos en modelos distintos de estrés circadiano sugerían una relación entre la alteración de los patrones de ingesta y síntomas metabólicos. Por esto decidimos evaluar el efecto que podría tener sobre nuestro modelo la aplicación de un protocolo de alimentación restringida a las horas de oscuridad. El aumento de peso observado en los animales bajo condiciones de desincronización pudo ser prevenido mediante este esquema de alimentación nocturna. Este experimento nos permite hipotetizar que bajo el protocolo de avances crónicos existe además una desincronización a su vez entre los ritmos de ingesta y los ritmos de variables metabólicas que garantizan el óptimo aprovechamiento del alimento.

Así, el modelo de desincronización forzada que desarrollamos se convierte además en uno de interés en el estudio específico de los efectos de la alteración de los ritmos biológicos sobre el metabolismo y los mecanismos a través de los cuales éstos se operan. La importancia trascendental de este tipo de herramientas se basa en la alta prevalencia que poseen estas patologías en

personas en condiciones de trabajo en turnos no convencionales. Adicionalmente, planteamos algunas consideraciones acerca de potenciales estrategias que pueden aliviar los efectos adversos del protocolo de jet lag, que incluyen la cuestión del diseño de los esquemas, de la función del ejercicio e incluso del contacto social, y de la temporización adecuada de los episodios de ingesta.

Resulta de interés entonces, además de profundizar la caracterización de las alteraciones que se presentan bajo el protocolo de avances, enfocarse las causas subyacentes de estas alteraciones observadas. En pocas palabras, de buscar el nexo entre la desincronización forzada que se detecta en los ritmos de actividad con lo que sucede a nivel metabólico. ¿Es efectivamente una desincronización entre el ritmo de ingesta (o el no-ritmo de ingesta) y los ritmos de eficiencia metabólica, que provoca que se consuma alimento en horarios no convenientes? ¿O hay una desorganización de las funciones metabólicas que redundan en un aumento de peso y variables alteradas? Encontrar algunos indicios que nos acerquen a la respuesta a estas preguntas podría ayudarnos no sólo a comprender más sobre el modelo de desincronización a otros niveles, sino también diseñar estrategias más apropiadas para contrarrestar los efectos adversos de este tipo de situaciones tanto en el laboratorio como en ambientes de trabajo.

Bien sabemos que el sistema circadiano se relaciona de forma bidireccional con todos los sistemas orgánicos, por lo que es lógico pensar que la perturbación crónica de su función es potencialmente deletérea para la fisiología del organismo. Esta predicción se ve rápidamente confirmada revisando la bibliografía que describe la miríada de problemas de salud sufridos

por trabajadores en turnos o nocturnos en distintas áreas laborales, o en los pobrecillos animales de laboratorio bajo diversas condiciones experimentales que ya revisamos en la Introducción. Es por esto que a futuro se plantea como objetivo importante estudiar los efectos de la desincronización forzada sobre otras áreas de la fisiología y la salud, incluyendo posibles alteraciones en la respuesta inmunológica, en la salud mental, en la cognición y en el comportamiento. Hemos comenzado a recorrer este camino con algunos experimentos concernientes al desarrollo de cáncer, que pueden apreciarse en el Anexo de esta tesis.

Y eso es todo, entonces. Soy consciente de las falencias de los experimentos y de las limitaciones del trabajo que durante tanto tiempo realicé junto con Diego, Juan y el resto del laboratorio y que he tratado de describir de la forma más clara y concisa posible en estas hojas. Estos defectos no deben achacarse a nadie más que a mí, no los rechazo más de lo que los abrazo; en todo caso son más propios que los aciertos, que son siempre compartidos. También sé que el trabajo del becario suele significar lo que una gota en un mar, pero estaré feliz de esa gota mía. E incluso si la gota no llega al mar, me sentiré realizado si alguien más en el camino recoge este humilde esfuerzo y le sirve para seguir haciendo una mejor ciencia y haciéndose un mejor científico y ser humano.

¡Gracias por llegar a la última hoja!

Leandro

Diciembre 2014

ANEXO

<u>Anexo:</u> Ensayo de crecimiento de dos modelos tumorales bajo CA$^{6/2}$

Introducción:

Uno de los problemas de salud más preocupantes asociados a los esquemas de turnos rotativos y nocturnos son las elevadas tasas de distintos tipos de cáncer observadas en trabajadores bajo tales regímenes.

Si bien es conocido que el ciclo celular en los distintos tejidos corrientemente muestra ritmicidad circadiana y diaria, la relación entre el reloj y los ritmos circadianos y el desarrollo de cáncer (en el principio, una alteración de la replicación celular normal) posee numerosas vías de interacción a diversos niveles. El estudio en modelos animales ha permitido una caracterización más completa de dichas interacciones, y a su vez se presentan como herramientas útiles para el diseño de estrategias para eventualmente prevenir la aparición del cáncer.

El punto de contacto más elemental entre el sistema circadiano y el desarrollo tumoral se halla en las mismas bases moleculares del reloj circadiano y el ciclo celular. Se han descrito numerosas vías compartidas o controladas por el reloj molecular en las distintas fases y elementos de la replicación celular, y nuevas interacciones se reportan con frecuencia (Borgs et al., 2009; Kelleher et al., 2014). El trabajo con distintos mutantes de los genes centrales del reloj ha mostrado que la perturbación al nivel fundamental de la maquinaria circadiana está correlacionada con el aumento de generación espontánea e inducida de tumores, hiperplasias malignas, y otros signos de progresión a cuadros de cáncer (Fu et al.,

2002; Lee et al., 2010; Wood et al., 2008). Por otro lado la perturbación externa del sistema circadiano mediante la manipulación de las condiciones de iluminación también ha probado afectar el desarrollo y crecimiento de tumores (Blask et al., 2009; Filipski et al., 2004; Filipski et al., 2009; Logan et al., 2012; Wu et al., 2012). Resultados equivalentes se han encontrado luego de lesiones de los núcleos supraquiasmáticos (Filipski et al., 2003).

Objetivo:

Determinar si la desincronización forzada inducida por el protocolo de JLC de avances de 6 horas cada dos días se asocia con cambios en la tumorigénesis luego de una inoculación con una línea tumoral.

Materiales y métodos:

Líneas tumorales. Se utilizaron dos modelos de líneas tumorales: B16 (melanoma murino) y 3LL (carcinoma pulmonar), ambas provistas por el Laboratorio de Oncología Molecular de la Universidad Nacional de Quilmes. Los células se crecieron y mantuvieron en frascos de cultivo plásticos con medio de cultivo DMEM suplementado con glutamina, suero fetal bovino al 10% y antibiótico/antimicótico (gentamicina), en una estufa a 37ºC y con una concentración de CO_2 de 5%, de acuerdo a los protocolos tradicionales de cultivo celular.

El día de la inoculación, las células se despegaron de la matriz de cultivo mediante tratamiento con tripsina y lavadas con buffer fosfato, para luego ser contadas. Las inoculaciones se programaron de forma de encontrar las células en crecimiento activo (es decir, sin haber llegado a la confluencia) en el día de la inyección. Una vez contadas las células viables, se resuspendieron en DMEM libre de suero. Se permitió reposar a las células a 37ºC por una hora antes de proceder a las inyecciones.

Inoculación. La resuspensión se realizó de forma tal que la cantidad de células a inyectarse por animal estuvieran contenidas en 200 microlitros. Se utilizaron jeringas descartables 27G para inocular las células tumorales de forma subcutánea en el flanco derecho de los ratones. Para la línea B16, se inyectaron alrededor de 200.000 células por animal, mientras que en el caso de la línea 3LL se inocularon unas 500.000 células.

Seguimiento del crecimiento tumoral. A partir del momento de la inoculación, los animales fueron revisados 3 veces por semana para determinar la aparición y crecimiento de tumores, y registrar la *evolución* del peso corporal. Se determinó el período de latencia como la cantidad de días transcurridos entre la inoculación y la detección del tumor. Una vez que los tumores adquirieron un tamaño factible de ser medido mediante instrumental, se midieron las dimensiones del tumor con un calibre y con éstas se calculó el volumen del tumor de forma aproximada suponiéndolo elipsoide (en casos excepcionales se hicieron correcciones específicas). Los animales fueron sacrificados al superar los tumores el volumen límite de 2000 mm^3.

Análisis estadístico. Las curvas de crecimiento tumoral y de aumento de peso se evaluaron mediante un ANOVA de dos vías con medidas repetidas (ANOVA-MR), analizando el período comprendido entre el momento de la inoculación y el día en el que se realiza el primer sacrificio, para evitar el problema introducido por la pérdida de datos ante cada sacrificio. La latencia y sobrevida se analizaron mediante tests de supervivencia de Kaplan-Meier. Todos los análisis se realizaron con el software Graph Pad Prism 6.0.

Resultados:

Desarrollo tumoral luego de inoculación con la línea 3LL

No pudimos detectar diferencias en el crecimiento o sobrevida de ratones inoculados con esta línea en relación a la exposición o no al protocolo $CA^{6/2}$, tal como se aprecia en la parte izquierda de la Figura A1.1. Este experimento se vio sin embargo afectado por la muerte de varios animales en ambos grupos por complicaciones asociadas al modelo tumoral previas a la determinación del punto final.

Desarrollo tumoral luego de inoculación con la línea B16

En este modelo sí observamos un efecto claro del jet-lag crónico sobre el crecimiento tumoral. Los animales sometidos al protocolo $CA^{6/2}$ observaron un

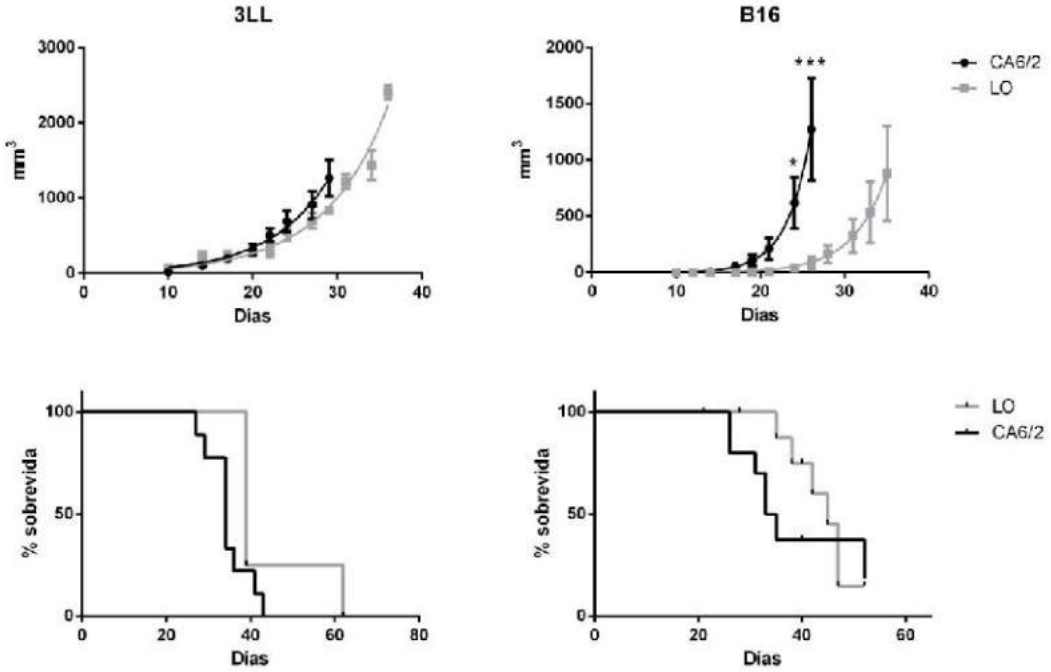


Figura A1.1 – Efecto del régimen de luz sobre el desarrollo tumoral. Fila superior: *tamaño promedio de los tumores desarrollados luego de la inoculación de una línea celular de cáncer de pulmón (3LL) y de otra melanoma (B16), en animales bajo condiciones controles de LO o* $CA^{6/2}$*. Las curvas se muestran hasta el día en que se sacrifica el primer animal de cada grupo. Los asteriscos indican diferencias significativas de acuerdo a contrastes de Bonferroni a posteriori de un ANOVA-MR.* ***Fila inferior:*** *curvas de supervivencia (de acuerdo al criterio establecido en los Métodos) para ambos modelos en las distintas condiciones de iluminación. No se observan diferencias en ninguno de los modelos de acuerdo con un análisis de Kaplan-Meier de las curvas. N: 10 por grupo para 3LL, 11 por grupo para B16.*

crecimiento significativamente acelerado de los tumores producidos por la línea B16, tal como puede observarse en la parte superior derecha de la Figura A1.1 (ANOVA de dos vías con medidas repetidas seguido de contrastes para los cortes

temporales). No obstante, no pudimos detectar diferencias en cuanto a la sobrevida de los animales.

Discusión:

El conjunto de la bibliografía antes citada relativa al rol de las perturbaciones circadianas sobre el desarrollo de cáncer tanto en seres humanos como en modelos animales de laboratorio nos permitía prever que en nuestro modelo de desincronización forzada podríamos detectar efectos similares. Sin embargo, nuestros resultados hasta ahora no han sido muy alentadores, si bien hemos obtenido algunos datos interesantes.

En la evaluación del modelo de melanoma murino B16, observamos que el crecimiento de los tumores en los ratones bajo jet-lag crónico se mostró acelerado con respecto al grupo control. Este efecto no se vio replicado cuando se analizó de acuerdo con la sobrevida los animales, definida por el punto final establecido según el tamaño del tumor, aunque esto podría deberse al bajo *n* con que se realizó este experimento.

En el experimento utilizando el modelo de carcinoma pulmonar 3LL no encontramos diferencias en las curvas de crecimiento entre animales en condiciones control o de JLC.

Nuestra hipótesis de trabajo para estos experimentos es que la desincronización circadiana afecta la función fisiológica (inmune, metabólica, entre otras) y en

consecuencia alterar las defensas del organismo frente al desarrollo tumoral (Sahar & Sassone-Corsi, 2009). Hemos visto que el JLC sólo ha tenido efecto sobre el desarrollo del modelo de melanoma B16, y no sobre el carcinoma 3LL. Esta diferencia podría ser explicada por el hecho de que, en general, los carcinomas son tumores con menor respuesta a la modulación y respuesta inmune que los melanomas (y en particular, la cepa 3LL es bastante virulenta). Lo que esto significa es que los tumores derivados de la línea 3LL probablemente se desarrollen con una dinámica que poco depende de las potenciales alteraciones fisiológicas que estén afectando a los animales bajo el protocolo $CA^{6/2}$, mientras que en el caso del modelo B16 puede existir una aceleración del crecimiento tumoral debido justamente a la perturbación de las funciones orgánicas normales.

Hay otra cuestión importante a discutir en relación a estos resultados, que se desprende de hallazgos de la tesis que surgieron posteriormente a que comenzamos a trabajar en esta dirección en el proyecto. Como discutimos en el Capítulo 2, existen algunas razones para proponer que el alojamiento de los animales en grupos modifica el efecto sobre el reloj del protocolo $CA^{6/2}$. En dicho capítulo mostramos que los efectos del jet-lag crónico sobre el metabolismo eran abolidos en los animales alojados en grupos, y discutimos una probable explicación de esta diferencia. Los experimentos que se presentan en este Anexo fueron realizados con animales en jaulas de 4 o 5 animales, por lo que no podemos descartar que los resultados obtenidos hubieran sido más contundentes de haber tenido a los ratones en jaulas individuales. En este momento estamos realizando nuevamente este experimento con la línea B16 en condiciones de

alojamiento individual. A su vez estamos estudiando más profundamente el desarrollo del modelo bajo JLC al nivel de expresión génica en los NSQ, en el mismo tumor, en sangre y algunos relojes periféricos.

Referencias:

Blask, DE, Dauchy, RT, Brainard, GC, & Hanifin, JP. (2009). Circadian stage-dependent inhibition of human breast cancer metabolism and growth by the nocturnal melatonin signal: consequences of its disruption by light at night in rats and women. *Integr Cancer Ther, 8*(4), 347-353.

Borgs, L, Beukelaers, P, Vandenbosch, R, Belachew, S, Nguyen, L, & Malgrange, B. (2009). Cell "circadian" cycle: new role for mammalian core clock genes. *Cell Cycle, 8*(6), 832-837.

Filipski, E, Delaunay, F, King, VM, Wu, MW, Claustrat, B, Grechez-Cassiau, A, et al. (2004). Effects of chronic jet lag on tumor progression in mice. *Cancer Res, 64*(21), 7879-7885.

Filipski, E, King, VM, Li, X, Granda, TG, Mormont, MC, Claustrat, B, et al. (2003). Disruption of circadian coordination accelerates malignant growth in mice. *Pathol Biol (Paris), 51*(4), 216-219.

Filipski, E, Subramanian, P, Carriere, J, Guettier, C, Barbason, H, & Levi, F. (2009). Circadian disruption accelerates liver carcinogenesis in mice. *Mutat Res, 680*(1-2), 95-105.

Fu, L, Pelicano, H, Liu, J, Huang, P, & Lee, C. (2002). The circadian gene Period2 plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo. *Cell, 111*(1), 41-50.

Kelleher, FC, Rao, A, & Maguire, A. (2014). Circadian molecular clocks and cancer. *Cancer Lett, 342*(1), 9-18.

Lee, S, Donehower, LA, Herron, AJ, Moore, DD, & Fu, L. (2010). Disrupting circadian homeostasis of sympathetic signaling promotes tumor development in mice. *PLoS One, 5*(6), e10995.

Logan, RW, Zhang, C, Murugan, S, O'Connell, S, Levitt, D, Rosenwasser, AM, et al. (2012). Chronic shift-lag alters the circadian clock of NK cells and promotes lung cancer growth in rats. *J Immunol, 188*(6), 2583-2591.

Sahar, S, & Sassone-Corsi, P. (2009). Metabolism and cancer: the circadian clock connection. *Nat Rev Cancer, 9*(12), 886-896.

Wood, PA, Yang, X, Taber, A, Oh, EY, Ansell, C, Ayers, SE, et al. (2008). Period 2 mutation accelerates ApcMin/+ tumorigenesis. *Mol Cancer Res, 6*(11), 1786-1793.

Wu, M, Zeng, J, Chen, Y, Zeng, Z, Zhang, J, Cai, Y, et al. (2012). Experimental chronic jet lag promotes growth and lung metastasis of Lewis lung carcinoma in C57BL/6 mice. *Oncol Rep, 27*(5), 1417-1428.

AGRADECIMIENTOS

Muchas gracias de nada

Esta tesis no hubiera nunca visto la luz si no hubiera sido por la dirección, la ayuda, el apoyo, el aliento y el empuje incondicional de Diego. Compartir con él durante tantos años mi lugar de trabajo así como una bella amistad me ha hecho no sólo mejor científico sino, lo que es más importante y agradecible, una mejor persona en innumerables aspectos de la profesión y de la vida. A Diego van, entonces, los primeros y principales agradecimientos en esta última cruzada.

Ningún trabajo de investigación puede llegar a buen puerto si no se cuenta con amigos de guardapolvo capaces de estar ahí en todas y cada una de las batallas. Para agradecerles a Santi y Juan por los años de amistad e invaluable ayuda adentro y afuera del laboratorio, entre olor a bioterio, trinquetes y cervezas, no me alcanzan las líneas pero tampoco creo que las necesiten para saber cuánto los aprecio y necesito. Tampoco hay forma de agradecer en su correcta dimensión al impresionante equipo de especímenes científicos que han sabido poblar el labo en todos estos años y que han sido indispensables colegas, compañeros y amigos a lo largo de todo el camino y de los cuales aprendí tanto. Gracias a los miles de días compartidos en el laboratorio lograron atravesar sus fronteras para convertirse en amigos que han sabido y saben compartir conmigo todos sus conocimientos científicos, artísticos y culinarios (además de numerosos brebajes alcohólicos): Jose, Charly, el Flaco, Andrew, Lucho, Ivi, Anas, Juli, Male, Sole, Pato, Lau, Lu, Nati, Agus, Euge, Fer2, Jony, Viru, Sergio, Mica, Fer, PatoO, Fito, Pao, Hatri.

A Mary Harrington y a Penny Molyneaux (y sus respectivas familias) por haberme dejado compartir con ellas cuatro meses increíblemente hermosos en *Noho*, construyendo una amistad que atravesó la nieve y dura hasta hoy.

A Anita Alzamendi y a Andrés Giovambattista del IMBICE por los experimentos metabolosos que hicimos juntos. A Gisele Oda en Brasil por darle vida a nuestro peliagudo modelo matemático.

A todos los Oncos en general por la ayuda con incontables problemas, y muy en particular a Lau por tantísimo tanto, y también a Fer y Vale con quienes batallamos en la carrera desde hace tanto tiempo.

A Hacho por estar siempre que necesitamos un buen consejo (o buena suerte).

Tampoco hubiera conseguido llegar hasta aquí si no hubiera sido por el apoyo inconmensurable de la gente que me quiere, y para ellos van más agradecimientos eternos:

A mis padres por haberme dado absolutamente todo lo que soy y pueda conseguir. Por estar siempre al pie del cañón sin necesariamente tener idea de las locuras que anduviera haciendo. Sin ellos no habría tesis, ni nada. A mis hermanos, primos y tíos por quererme y alegrarme siempre.

A Marian, gracias a quien soy una mejor persona y sin cuya banca infinita no hubiera llegado hasta acá.

A mis amigos de siempre que nunca se asustaron de mis actividades y están en todas y cada una.

Y a la que me alegra todas las mañanas, las tardes y las noches, y me empuja a seguir subiendo la cuesta de la carrera científica y de la vida día a día.

A todos ellos, gracias, de corazón por aguantar hasta el final de este desafío.

lea