



*Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires
Buenos Aires, Argentina*

*INTERACCIONES NEUROINMUNES
EN EL SISTEMA CIRCADIANO DE
MAMÍFEROS*

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas

Autor: Luciano Marpegán

Director de Tesis: Dr. Diego A. Golombek

Co-Directora: Dra. Mónica Costas

Consejero de Estudios: Dr. Enrique Rodriguez

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires
Buenos Aires, Argentina

INTERACCIONES NEUROINMUNES EN EL SISTEMA CIRCADIANO DE MAMÍFEROS

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas

Autor: Luciano Marpegán

Director de Tesis: Dr. Diego A. Golombek

Co-Directora: Dra. Mónica Costas

Consejero de Estudios: Dr. Enrique Rodriguez

Lugar de Trabajo: Laboratorio de Cronobiología, Departamento de
Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes. R:S: Peña 180
Bernal, Buenos Aires Argentina.

Ciudad de Buenos Aires, Año 2005

INTERACCIONES
NEUROINMUNES EN EL SISTEMA
CIRCADIANO DE MAMÍFEROS

Jurados

INTERACCIONES NEUROINMUNES EN EL SISTEMA CIRCADIANO DE MAMÍFEROS

Resumen

El sistema circadiano de mamíferos, controlado por los núcleos supraquiasmáticos hipotalámicos (NSQ), modula variables comportamentales, hormonales e inmunológicas. Estas pueden, a su vez, modular la actividad de los NSQ por medio de vías de retroalimentación. En el presente trabajo estudiamos el efecto de dosis subpirogénicas de lipopolisacárido (LPS) de *E.coli* y de citoquinas proinflamatorias sobre el sistema circadiano de ratones C57Bl/6J.

La administración de LPS (25µg/kg, i.p.) produjo retrasos de fase CT 15 y no tuvo efectos al administrarlo en otros horarios. Retrasos similares fueron obtenidos tras la administración endovenosa de LPS (25µg/kg) y con la administración intracerebroventricular (i.c.v.) de IL-1beta y TNFalfa. Si bien esto permite calificar al LPS y a las citoquinas como estímulos fóticos, no se observaron efectos aditivos cuando LPS y pulsos de luz fueron coadministrados, sugiriendo que existe alguna interacción entre las vías activadas por ambos estímulos.

A CT 15 el LPS produjo un aumento de la inmunoreactividad de c-Fos en la región dorsal de los NSQ y la inducción de *mPer* en los núcleos paraventriculares hipotalámicos (NPV) sugiriendo que estas zonas podrían ser las receptoras de la información proveniente del sistema inmune. La administración de sulfasalazina, un inhibidor del factor de transcripción NF-κB, disminuyó significativamente el cambio de fase inducido por LPS, indicando que esta vía de transducción de señales participa en la interacción entre el sistema inmune y el reloj biológico.

Analizamos el rol de los astrocitos como posibles mediadores de la interacción inmune-circadiana estudiando la expresión de GFAP en los NSQ y analizando la capacidad de estas células de responder a citoquinas y LPS por medio de la activación de NF-κB. El análisis de la inmunoreactividad de GFAP fue realizado a lo largo del día, mostrando una tendencia a presentar variaciones con valores máximos a ZT3 y mínimos a ZT21. La presencia de NF-κB en astrocitos fue demostrada por inmunomarcación en los NSQ y en cultivos primarios de glía de NSQ. *In vitro*, la actividad κB aumentó aproximadamente 3 veces en respuesta a LPS y TNFα, y 1.7 veces con IL-1α.

Los resultados presentados permiten establecer un modelo de interacción recíproca entre los sistemas inmune y circadiano en el que el sistema circadiano modula variables inmunológicas a lo largo del día y éstas, a su vez, son capaces de informar al oscilador central acerca de su situación. Es probable que las respuestas del oscilador central involucren la activación del factor de transcripción NF-κB y estén mediadas por los astrocitos de los NSQ. La interacción entre estos sistemas podría tener relevancia tanto en condiciones normales como en condiciones patológicas.

Palabras Clave: supraquiasmático, LPS, NF-κB, citoquinas, reloj biológico, hipotálamo.

NEUROIMMUNE INTERACTIONS IN THE MAMMALIAN CIRCADIAN SYSTEM.

Abstract

The mammalian circadian system is controlled by the hypothalamic suprachiasmatic nuclei (NSQ), modulating behavioural, hormonal and immunological variables. Many of these variables can also modulate NSQ activity through a feedback pathway. In the present work we studied the effect of subfebrile doses of *E.coli* derived lipopolysaccharide and proinflammatory cytokines on the C57Bl/6J mice circadian system.

The intraperitoneal administration (i.p.) of LPS induced phase delays (-43 ± 10 min.) on the wheel running activity rhythm when administered at CT 15 in a $25 \mu\text{g}/\text{kg}$ dose, having no effects at other circadian times. Similar delays were obtained after intravenous administration (i.v.) of the same LPS dose or after the intracerebroventricular (i.c.v.) administration of IL-1 β and TNF α . Although this suggests that LPS and proinflammatory cytokines might be considered as photic stimuli, we observed no additive effects after light and LPS coadministration at CT15. This suggests that both pathways interact at some point.

LPS administration at CT15 induced an increase in c-Fos immunoreactivity in the dorsal NSQ and *mPer* transcription within the hypothalamic paraventricular nuclei (NPV) suggesting that these may be the receptive areas for the incoming immune signals. Administration of sulfasalazine, a potent NF- κ B inhibitor produced a significant decrease in the phase delays induced by LPS indicating that this transduction signaling pathway is involved in the circadian-immune interaction.

We also analyzed the role of astrocytes as possible mediators in the immune-circadian interaction studying the glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression within the NSQ and analyzing also the capacity of these cells to respond to cytokines and LPS through NF- κ B activation. GFAP immunoreactivity studies were performed through all the day in Light:Dark conditions showing a trend to higher levels at ZT3 and lower levels at ZT21. The presence of NF- κ B in astrocytes was demonstrated by colocalization experiments within the NSQ and in NSQ derived astrocyte primary cell-cultures. κ B activity *in vitro* augmented about 3 fold in response to LPS ($2 \mu\text{g}/\text{ml}$) and TNF α ($20 \text{ ng}/\text{ml}$) and, 1.7 fold with IL-1 α ($100 \text{ ng}/\text{ml}$).

These results allow us to propose an interaction model between the immune and circadian systems in which the circadian system modulates immune variables throughout the day and, in turn, these variables can modulate the circadian pacemaker's activity. NF- κ B transcription factor is probably involved in this interaction and NSQ astrocytes are likely to be the mediators. The interaction between these systems may be relevant in normal and pathological conditions.

Key words: suprachiasmatic, LPS, NF- κ B, cytokines, biological clock, hypothalamus.

Agradecimientos

De la redacción de este trabajo ésta es sin duda la parte más difícil y placentera. Difícil porque requiere de una capacidad de síntesis casi sobrehumana y placentera porque me obliga a repasar todos esos gestos grandes y pequeños con los que tanta gente me ayudó en estos tiempos. Y esto me lleva entonces a la gente, mi entorno, mi gente de todos los días y mi gente de cada tanto. A todos les doy las gracias por estar, por enseñarme, por compartir, porque este trabajo no es otra cosa que el producto de todo lo que recibí de toda esa gente.

Diego G., no hay palabras que alcancen para agradecerte lo suficiente todo lo que me diste, como director pero sobre todo como persona, como amigo. Mónica, otro tanto. Gracias a todo el Lab de Crono, presente y pasado, por aguantarme, divertirme ayudarme, enseñarme, Fito, Gabi, Ale, Pao, Chulian, Pato A, Santi, Hatrix, Pato O., Viru, Fer, Sergio. Juli, mi compañera de equipo, gracias por compartir esta locura de los astros y por estar siempre convencida que yo estaba equivocado, el tiempo (si existe) te dara la razón.

A Hacho y Vero por su generosidad y hospitalidad. A Ruth y todo su grupo, especialmente Inés y Caro. A Nacho y a todo todo el lab de Mónica por ayudarme con tantas cosas. A Ramiro, Emiliano, Tincho, Angel y Arturo, junto al resto del lab de Neurobiología de la Memoria. A Fernando Pittosi y su grupo, especialmente a Carina y a Mariela.

A mis grandes amigos de la vida, Diego L, Willy, Tris y Ali, Pablo y Tami.

A toda mi familia, a Eve, a Geno, Pablo, Nora, Anita y Lucas, Flor, Lionel y Fany, Nico

A mis viejos, Emilio y Marta, por apoyarme siempre y por ser mis guías, a Nati, mi amor, por aguantarme, esperarme y quererme.

A mis padres, mis guías.

A Elba, mi abuela.

A Nati, mi sol.

A Zina y Nurit, mi todo

INDICE

1. Resumen.	
2. Introducción:	001
2.1. Nosotros en et tiempo	002
2.2. El sistema circadiano	007
2.2.1. Un poco más de historia.	007
2.2.2. El Sistema Circadiano.....	013
2.2.3. Relojes endógenos.....	017
2.2.4. El reloj molecular.....	022
2.2.5. Sincronización fótica y no fótica.....	029
2.2.6. Vías de entrada y salida de los núcleos supraquiasmáticos.....	034
2.3. Ritmos en el sistema inmune	039
2.4. Sistema neuroinmune046
2.4.1. Otro poco más de historia.....	046
2.4.2. Citoquinas.....	051
2.4.3. Comunicación entre sistema nervioso central y sistema inmune.....	055
2.4.4. Citoquinas en el sistema nervioso central.....	057
2.5. Respuesta al LPS.059
2.6. Astrocitos y el sistema circadiano	062
2.7 El factor de transcripción NF-κB	071
3. Objetivos e hipótesis	082
4. Materiales y métodos	086
4.1. Animales.....	087
4.2. Registro de actividad locomotora en rueda.....	087
4.3. Registro por telemetría de actividad general y temperatura corporal.....	088
4.4. Cirugías y perfusiones.....	089
4.5. Tratamientos en animales.....	090
4.6. Extracción de suero, tejidos y mRNA total.....	093
4.7. Tinciones inmunohistoquímicas.....	093
4.8. Tinción de Hanker-Yates para analizar la integridad de la barrera hematoencefálica.....	094
4.9. Hibridación <i>in situ</i>	095
4.10. Northern blot de Il-1 β	096
4.11. Ensayo biológico para TNF α	097
4.12. Cultivos de astrocitos	098
4.13. Drogas.....	101
4.14. Estadística.....	101
5. Resultados.	102

5.1 Caracterización del sistema circadiano en ratones C57Bl/6.....	103
5.2. LPS:.....	107
5.2.1. PRC:.....	107
5.2.2. Curva de dosis:.....	109
5.2.3. Efectos del LPS sobre la temperatura corporal:.....	110
5.2.4. Efectos del LPS sobre la barrera hemato-encefálica:.....	113
5.2.5. Administración endovenosa de LPS:.....	114
5.2.6. Co-administración con pulsos de luz:.....	115
5.2.7. Activación de c-Fos en NSQ y PVN en respuesta al LPS:.....	117
5.2.8. Expresión de genes relojeros en respuesta al LPS sistémico.....	120
5.3. Evidencias de la participación de NF-κB:.....	124
5.3.1. Inhibición del cambio de fase con Sulfasalazina.....	124
5.3.2. Presencia de NF-κB en los NSQ de ratón.....	125
5.4. Rol de las citoquinas:.....	126
5.4.1. <i>Inducción de TNFα en respuesta a LPS i.p.</i>	126
5.4.2. <i>LPS induce la expresión de IL-1β en el bazo.</i>	128
5.4.3. <i>Administración ip. de IL-1β.</i>	129
5.4.4. Administración icv de IL-1β y TNFα.....	130
5.5. Astrocitos como posibles mediadores de las interacciones neuroinmunes.....	132
5.5.1. GFAP en los NSQ.....	132
5.5.2. Colocalización de GFAP y NF-κB en NSQ.....	134
5.5.3. Colocalización de GFAP y NF-κB in vitro.....	135
5.5.4. Activación de NF-κB en los astrocitos en respuesta a citoquinas y LPS.....	135
5.6. Shock séptico:.....	137.
6. Discusión.....	141
7. Conclusiones	167
8. Bibliografía	170
Apéndices.....	209
A.1. Apéndice 1: Consideraciones prácticas para el análisis de ritmos Circadianos.....	210
A.2. Apéndice 2: Publicaciones vinculadas a este trabajo de tesis doctoral...	218
Abreviaturas.....	231

Introducción

2.1. Nosotros en el Tiempo.

El tiempo es cosa seria. El tiempo es oro. El tiempo es vida. El tiempo es muerte. El tiempo todo lo cura. El tiempo pasa. El tiempo te come. El tiempo lo dirá. Estamos matando el tiempo. Somos esclavos del tiempo.

No cabe duda de que el tiempo significa algo para todos nosotros... aunque en realidad tengamos poca idea acerca de qué es realmente el tiempo. Sentimos su paso y lo medimos pero definitivamente estamos perdidos en cuanto esa pregunta aparece. ¿Qué es el tiempo? Probablemente existan tantas concepciones del tiempo como culturas o religiones. Inevitablemente está relacionado a nuestra historia como seres individuales y como sociedades. Somos conscientes de nuestra historia - nuestro pasado - y sabemos que al presente le sobreviene un futuro. Somos conscientes de nuestra propia existencia en un presente del cual, engañados por nuestros propios sentidos, probablemente percibimos sólo el pasado inmediato.

Hablar de tiempo es hablar de eso que nos rodea pero que no podemos definir con claridad, es hablar de algo de lo que es más cómodo no hablar. Lo único que nos permite el tiempo es, de una forma indirecta y arbitraria, medirlo. Lo medimos con variable exactitud por medio de los cambios. Donde hay cambios, hay tiempo transcurrido que puede ser medido. ¿Y si no hubiera cambios, se detendría el tiempo? Quién sabe.

Newton escribió *“el tiempo absoluto, verdadero y matemático, por sí mismo y por su propia naturaleza, fluye uniformemente, sin relación con nada externo”*.

Por su parte, Einstein afirmó que *“la gente como nosotros, que cree en la física, sabe que la distinción entre pasado, presente y futuro es solamente una ilusión persistente y molesta”*.

Boltzmann, para demostrar que la segunda ley de la termodinámica es aplicable a modelos dinámicos, necesitaba probar de alguna forma que el tiempo en la física newtoniana es irreversible. Dicen que obsesionado por esto y hostigado por sus adversarios decidió acabar con *su* tiempo de forma irreversible.

Y ya que estamos husmeando en el terreno de la termodinámica, aquí el tiempo podría darse como el aumento en la entropía universal. El obligado aumento de la entropía (2ª ley) lleva a pensar en un universo que se va desgastando (o desordenando) o envejeciendo irreversiblemente y esto le da - queramos o no - una direccionalidad o un sentido al tiempo. Pero en este campo, hasta el día de hoy, nadie pudo demostrar realmente la irreversibilidad del tiempo y mucho menos definir claramente qué es. Es más: pareciera que hasta el momento la mejor solución al problema es aceptar la existencia de muchas formas de tiempo o de diferentes temporalidades organizadas jerárquicamente. Así existiría una temporalidad diferente para cada nivel de organización, desde las ondas electromagnéticas hasta el universo entero (Fraser 1987)

Afortunadamente esta tesis no pretende (ni podría) ir tan lejos en su análisis del tiempo: simplemente pretende inmiscuirse en una minúscula conversación entre la fisiología animal y su entorno temporal. Teniendo en cuenta la importancia de este entorno temporal para el ser humano - tanto en su fisiología como en sus pautas culturales -, resulta curioso que este tipo de “conversaciones” hayan sido olvidadas en el ambiente científico hasta hace poco más de 50 años (con excepción de algunos pocos visionarios). Hasta fines del siglo XIX el estudio del tiempo era un área reservada casi exclusivamente para los filósofos, luego fue abordada por los físicos y los químicos a principios del siglo XX y recién a mediados del siglo pasado la cronobiología fue reconocida como una disciplina seria dentro de la biología. En un

principio, dentro de esta disciplina, todo se trató de encontrar variables que tuvieran ritmos circadianos, hasta que en la década de 1970 el estudio de los mecanismos implicados en la generación de dicha ritmicidad cobró importancia. Así y todo, la mayor parte de los cronobiólogos mantuvieron la mirada puesta en el contexto temporal externo, hasta que se hizo evidente que los organismos vivos presentan una gran diversidad de variables que oscilan en forma endógena y que es necesaria cierta coherencia temporal entre ellas para mantener la vida. Así surge el concepto de sincronización temporal interna, que resulta fundamental para los seres vivos y que tiene que ver en parte con este trabajo.

Refiriéndose a “*las multitudes de relojes endógenos*” de un organismo, Fraser propuso que “*la sincronización instante a instante que asegura la necesaria viabilidad colectiva es el presente orgánico de todos los seres vivos. El mantenimiento de su integridad es una condición necesaria y suficiente para la vida. Cuando no se mantiene adecuadamente sobreviene la enfermedad, la ausencia total de coordinación lleva a la muerte*” (Fraser 1987).

La idea general implícita en este trabajo es que existe un reloj endógeno que controla o sincroniza de alguna forma esa multiplicidad de variables rítmicas y que para poder hacerlo eficientemente requiere de una retroalimentación desde los sistemas que controla. En particular, nos interesa el control que ejerce el reloj biológico sobre el sistema inmunológico y, más aún, la retroalimentación que este último ejerce sobre el reloj. Esto quiere decir que este trabajo tiene un poco de tiempos y relojes, otro poco de variables inmunes y todo mezclado por ese gran organizador, el sistema nervioso central.

Pero antes de entrar en detalles “crononeuroinmunológicos” y, dado que las reflexiones acerca de su naturaleza acompañaron al ser humano desde sus orígenes,

intentaremos honrar al tiempo (sea lo que sea), relatando algunas pequeñas historias de esa grata compañía.

El cambio es un punto clave en la percepción del tiempo. Para que el hombre pudiera medir el paso del tiempo fue necesaria la existencia de cambios regulares y, hasta cierto punto, predecibles. En la actualidad nos parece absolutamente predecible la llegada de un nuevo día; sin embargo, en la mayoría de las civilizaciones antiguas la llegada de un nuevo día dependía exclusivamente de la voluntad de los dioses y era por lo tanto predecible sólo hasta cierto punto. Pero afortunadamente los dioses fueron benevolentes y nos concedieron los días, uno tras otro por unos cuantos miles de años. De cualquier manera, también existen en la Tierra muchos cambios regulares fácilmente perceptibles (y algunos no tan conspicuos). El movimiento rotatorio del planeta nos da ciclos alternados de luz y oscuridad que son extremadamente regulares y, como la velocidad relativa del sol es también constante, podemos dividir al día en segmentos definidos por la posición del sol.

Esto llevó al hombre a construir los primeros relojes, los relojes de sol, hace más de 4000 años (aunque nadie tiene muy claro para qué los querían). Existieron también relojes asombrosos para medir tiempos más largos como los solsticios, de los cuales el monumento megalítico de Stonehenge es el más famoso. Pero volvamos a los relojes.

Los relojes se fueron haciendo cada vez más y más complejos y precisos. Pudieron compensar las desviaciones introducidas por la latitud y finalmente se hicieron relojes que no dependían del sol para dar la hora, con lo que podía medirse el tiempo también durante la noche y en días nublados. Esto llevó a la larga a que la sociedad asumiera sin ningún tipo de duda que el tiempo real es aquél marcado por los relojes – lo cual es algo muy discutible. Esta idea llegó a un extremo cuando a

fines del siglo XIX se dividió por convención al planeta en 24 husos horarios y se determinó que Greenwich sea el huso 0. Es curioso que en las antípodas de Greenwich esta convención generó una línea imaginaria en la cual hay una diferencia de “un día” entre lo que está al este y al oeste de ella. Así dos personas podrían estar una a cada lado de la línea, mirándose la una a la otra y tener un día de diferencia entre sí. Bastaría que uno cruzara la línea para viajar en el tiempo (si los relojes fueran realmente el tiempo).

Pero fuera de la obsesión humana por la relojería, es indudable que “sentimos” el paso del tiempo. Aún antes de la aparición del reloj los hombres sabían que los animales que cazaban estaban en distintos lugares y más o menos activos o alerta a distintas horas del día y sin duda los cazaban en el momento conveniente. Lo mismo valía pero a la inversa para los predadores peligrosos para los humanos. Cabe preguntarse además si el hombre en aquellas épocas sabía en qué momento del día tenía que realizar diversas tareas (caza, recolección, etc.) para obtener un rendimiento máximo o si simplemente se guiaba por los estímulos externos como la presencia o ausencia de luz, presencia o ausencia de presas y predadores, etc.

Sin duda alguna nuestros antepasados percibieron que existían variaciones regulares en su propia fisiología hace ya mucho tiempo. Andróstenes, uno de los cronistas de las expediciones de Alejandro Magno, relató que las hojas y los pétalos de la planta del tamarindo se movían a lo largo del día “como saludando al sol”. También entre los griegos, el poeta Hesíodo escribió, *“las enfermedades caen sobre los hombres, algunas de día y otras por la noche”* y esto fue aproximadamente 2500 años antes que el médico alemán Christoph Hufeland escribiera *“el período de 24 horas que se imparte a todos los habitantes de la Tierra por la rotación uniforme de la Tierra es especialmente distintivo para la economía física del hombre”*.

Los hindúes sitúan el *chacram* superior en una región tal que bien podría tratarse de la pineal y aseguran que presenta su mayor actividad durante la noche. Todos estos notables observadores dieron cuenta de un sinnúmero de ritmos en los seres vivos. Estos ritmos biológicos incluían ciclos diarios, anuales, mensuales y a veces ritmos mucho más largos o cortos (ver tabla 2.1). Entre estas observaciones de ritmos biológicos cabe destacar la de Sanctorius quien, obsesionado por saber si existían variaciones en su peso antes y después de comer, se dedicó a comer subido a una balanza durante 30 años llegando a la conclusión de que su peso variaba de acuerdo con un ciclo de aproximadamente treinta días. También hay que destacar el reloj floral de Linneo que permitía, de acuerdo con la apertura de diversas flores salvajes, conocer la hora con bastante precisión. Hoy en día clasificamos a estos ritmos de acuerdo con el hecho de si su frecuencia está por debajo o por arriba de las 24 horas. Así los ritmos biológicos pueden dividirse en ultradianos, con períodos menores a un día (frecuencias altas), circadianos con períodos cercanos a 24 horas e infradianos con período mayores a un día (frecuencias bajas). En particular, los ritmos que nos interesan en lo que respecta a este trabajo son aquellos ritmos que presentan un período de aproximadamente 24 horas.

Tabla 2.1. Clasificación de los ritmos biológicos en función de sus períodos.

Tipo de ritmo biológico	Períodos		variables
Ultradianos	Menores a 24 hs.	0,1 segundos 6 segundos 90 minutos	EEG Ritmo respiratorio Alternancia de estados de sueño
Circadianos	24 horas		Ciclo sueño/vigilia Ritmo de temperatura
Infradianos	Mayores a 24 hs	3 días 28 días 365 días	Ciclos tercianos de Malaria Ciclo menstrual Hibernación

2.2. El sistema circadiano.

2.2.1. *Un poco más de historia.*

Como dijimos antes, los ciclos diarios fueron descritos como ritmos biológicos hace ya mucho tiempo. De hecho, son en general los ritmos más conspicuos. Esto se debe probablemente a la gran presión evolutiva que ejerció la presencia de una alternancia entre luz y oscuridad que, con algunas pequeñas variaciones, siempre fue cercana a 24 horas. No cabe ninguna duda de que este ciclo luz:oscuridad organizó a los seres vivos obligándolos a ajustarse a él.

Sin embargo en este punto cabe hacerse una pregunta: ¿los seres vivos simplemente responden a la presencia o ausencia de luz o son capaces de predecir esos cambios? Y esto nos lleva a una segunda pregunta... que es por qué habríamos de hacer la primera pregunta. La respuesta a la segunda es simplemente “por curiosidad” o puede ser que alguna mente brillante haya pensado que si los seres vivos son capaces de predecir los cambios regulares entonces podrían obtener un máximo provecho de su ambiente. Sea como fuera, el astrónomo francés J. J. de Mairan se hizo esta misma pregunta en 1729 mientras miraba a una planta que tenía en su observatorio que extendía sus hojas de día y las retraía de noche.

El experimento que siguió fue sencillo y la respuesta, sorprendente. Colocó a la mimosa, que así se llama la planta (*Mimosa pudica*), en un placard sin luz y observó el movimiento de las hojas. Curiosamente la planta seguía extendiendo sus hojas durante el día y retrayéndolas durante la noche - aunque en realidad estaba siempre a oscuras (figura 2.1). Esto lo llevó a concluir que de alguna forma la planta medía el tiempo sin la necesidad de la clave temporal externa aportada por la presencia o la ausencia de luz. En otras palabras, la planta tenía un reloj interno que le decía si debería ser de día (día subjetivo) o de noche (noche subjetiva).

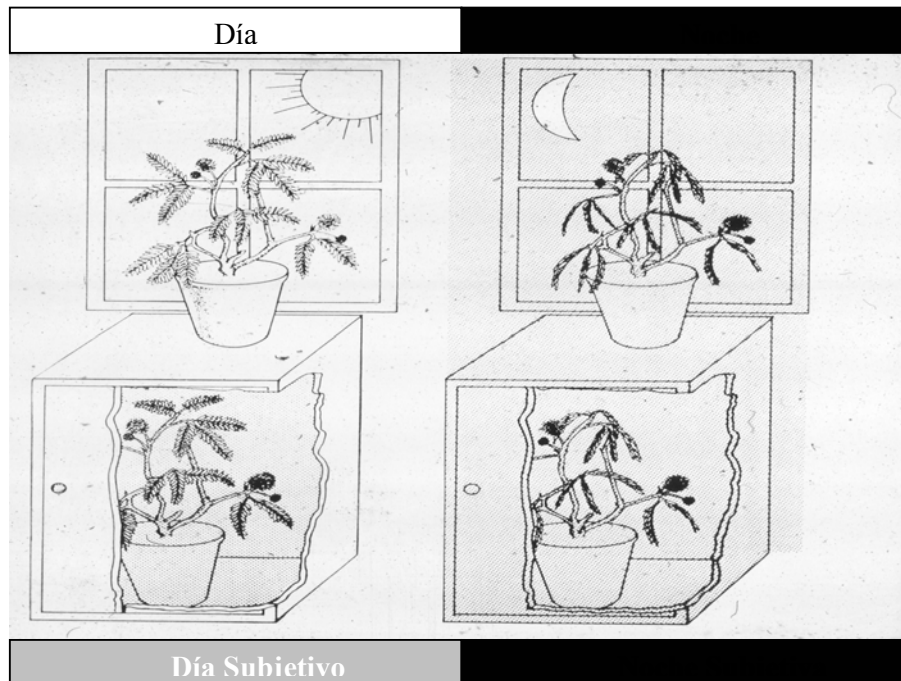


Figura 2.1. El astrónomo Jack d'Ortus de Mairan hizo el primer experimento realmente circadiano.

En su observatorio de Mairan observó que una mimosa (*Mimosa pudica*) extendía sus hojas durante el día y las retraía durante la noche. Para ver si este ritmo era de origen endógeno, aisló a la planta del ciclo externo de iluminación y la dejó en oscuridad constante. Notablemente los ritmos en la posición de las hojas se mantuvo demostrando por primera vez la existencia de un reloj endógeno.

De Mairan publicó sus conclusiones y la idea no cayó muy bien en general, a pesar de su cordial invitación a la comunidad científica toda a repetir y ampliar sus experimentos. Que los seres vivos tengan relojes endógenos que determinan su propio tiempo es un concepto que no gusta mucho aun hoy en día (quizás porque nos hace pensar que el tiempo de afuera no es tan real y absoluto como nos gustaría que fuera). Una de las principales críticas a de Mairan fue que no tuvo en cuenta en sus experimentos las variaciones de otros factores externos como la temperatura ambiental. Pero esto es fácil de comprobar y en 1759 De Monceau demostró que en condiciones de luz y temperatura constantes los ritmos siguen presentes. De todas formas, esta discusión acerca de una posible clave temporal externa no controlada llegó hasta mediados del siglo pasado, época en la que se realizaron experimentos en

el espacio y en los polos con el objeto de minimizar el efecto de factores como el campo magnético y la rotación del planeta. Esta crítica fue desterrada definitivamente con la demostración de la base genética de los ritmos endógenos.

El siguiente aporte fundamental fue realizado por De Candolle, quien en 1832 observó que los ritmos en condiciones constantes (ritmos en libre curso) tienen períodos diferentes a 24 horas. Esto resultó clave para definir a los ritmos circadianos (del latín *circa* = cercano, *diem* = día), que son aquellos ritmos que se mantienen en condiciones de libre curso y son por lo tanto generados por un reloj endógeno cuyo período es cercano a 24 horas. Y así como existen ritmos infra y ultradianos existen ritmos circanuales, circamensuales, circamareales (12 horas aproximadamente), etc.

Quizá uno de los motivos fundamentales del rechazo a la posibilidad de la existencia de un oscilador endógeno capaz de modular variables fisiológicas sin la necesidad de claves externas tenga que ver con que en la misma época en la cual se empezaron a encontrar ritmos endógenos para muchas variables, como el ritmo de temperatura corporal en humanos descrito por William Ogle, las bases de la fisiología sentadas por Claude Bernard llevaban al concepto de homeostasis, introducido más tarde por Walter Cannon. El principio de homeostasis, de acuerdo al cual las variables fisiológicas tienden a mantenerse constantes, se oponía claramente a la existencia de variaciones endógenas del medio interno. Una forma de congeniar estas diferencias fue modificar el concepto de homeostasis y separarlo en dos. Por un lado reconocemos actualmente una homeostasis *reactiva* que es la respuesta del organismo frente a estímulos externos y que tiende a recuperar los valores “normales” de las variables involucradas y, por otro lado, está la homeostasis *predictiva*, que representa la modificación de las variables previendo cambios ambientales regulares. Dicho de otra manera, un pequeño animal diurno es visto fácilmente por sus predadores durante

el día, por lo que debe estar totalmente despierto una vez que amanece y, dado que el despertar es en general un proceso complejo y que puede llevar cierto tiempo, es mejor que este animal comience a despertar *antes* de la llegada de la luz. Un reloj endógeno ciertamente lo ayudaría.

La ventaja adaptativa que aporta el tener un sistema circadiano no está totalmente demostrada todavía, pero existen algunos trabajos que sugieren que realmente conviene tener un reloj adentro. Kondo y Johnson mostraron que si se ponen a competir bacterias con diferentes períodos endógenos, “ganan” aquellas que tengan un período de oscilación más cercano al del medio ambiente (Kondo *et al.* 1994; Kondo y Ishiura 2000). Por otro lado, Patricia De Coursey demostró que, una vez liberadas, ardillas con el reloj endógeno lesionado son más depredadas y se reproducen menos que las ardillas normales (DeCoursey *et al.* 1997; DeCoursey y Krulas 1998; DeCoursey *et al.* 2000). Se ha intentado también explicar la posible ventaja evolutiva que aporta el sistema circadiano en términos simples. Si un roedor nocturno sale de su madriguera muy temprano cuando todavía hay luz es probable que sea saboreado por algún predador diurno. Entonces sería bueno poseer un reloj interno que diga cuándo hay luz fuera de la madriguera (sin tener que exponerse a la luz) y que ese reloj pueda ponerse en hora si el animal salió a la luz a una hora no conveniente. Efectivamente, el sistema circadiano cumple con estas características, es bastante preciso y puede ser puesto en hora y ajustarse incluso a las variaciones estacionales del fotoperíodo.

Otra explicación posible a la utilidad de un sistema circadiano es la sincronización interna, que se refiere a que los procesos fisiológicos deben ocurrir en un determinado marco temporal como para no interferir entre sí y mantener un rendimiento elevado. Pero esto puede ser considerado nada más que una especulación. Algo que sí nos lleva

a pensar que el sistema circadiano es realmente importante a nivel evolutivo es que se encuentra en todos los niveles de la escala evolutiva, desde cianobacterias hasta mamíferos (figura 2.2). No se salva nadie, ni hongos ni plantas; incluso surge algo muy interesante: a pesar de las grandes distancias a nivel evolutivo, los mecanismos involucrados en el funcionamiento de los relojes endógenos son extremadamente parecidos en animales tan diversos como moscas y mamíferos.

Veamos entonces de que se trata el sistema circadiano de mamíferos.

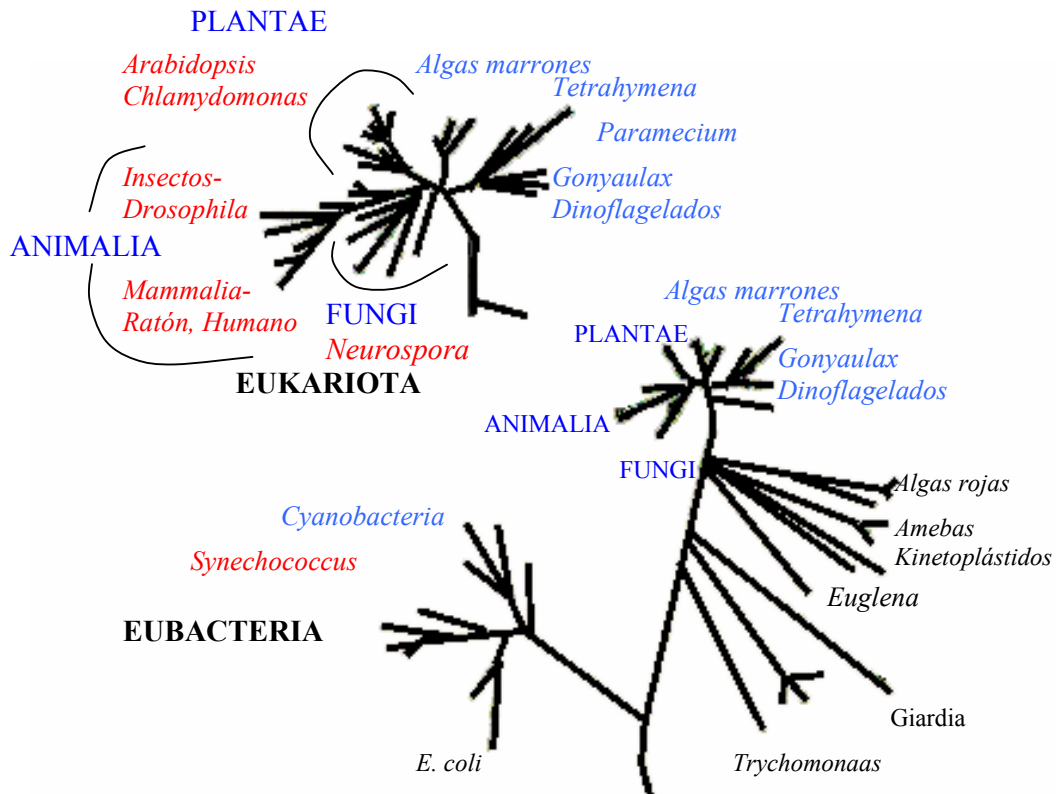


Figura 2.2. El sistema circadiano se encuentra en todos los niveles de la escala evolutiva.

Se han descrito ritmos circadianos en una gran variedad de seres vivos (marcados en azul), desde cianobacterias hasta mamíferos. Los representantes más estudiados de los diversos grupos evolutivos se encuentran resaltados en rojo. Llama la atención la presencia de ritmos circadianos en seres vivos cuyo ciclo de vida es menor a 24 horas (cianobacterias) y la similitud de la organización de los sistemas circadianos entre seres cuya historia evolutiva se separó hace varios millones de años.

2.2.2. El Sistema Circadiano en mamíferos.

Por lo visto anteriormente queda claro que los seres vivos tienen un reloj endógeno que es capaz de aportar claves temporales endógenas y modular numerosas variables fisiológicas y comportamentales. Los ritmos diarios observables en los seres vivos son por lo tanto el resultado de la interacción entre el medio ambiente y las variables rítmicas, entre éstas y el reloj endógeno y entre éste último y el medio ambiente. En condiciones de libre curso (cuando las variables externas se mantienen constantes), el componente ambiental es eliminado y el ritmo de salida queda determinado exclusivamente por la interacción entre la variable en estudio y el reloj.

Esta serie de consideraciones nos llevan a plantear un sistema de varios componentes conocido como el sistema circadiano. Para describirlo comenzaremos con el componente central, el reloj, o marcapasos principal. Este reloj es, hasta cierto punto, independiente del medio ambiente y por lo tanto se mantiene en funcionamiento aun en condiciones constantes. Una característica notable del reloj biológico es que puede compensar los cambios de temperatura en un rango bastante amplio, cosa bastante poco común en los procesos biológicos. Este marcapasos aporta claves temporales endógenas y modula las variables rítmicas que podamos medir. Para que esto ocurra es necesario que exista alguna vía de salida del reloj que se articule con las variables observables. Esta salida es el segundo elemento del sistema e incluye tanto a las salidas directas del reloj (humorales o conexiones neurales) como a variables conectadas en forma indirecta por medio de otras hormonas, órganos o comportamientos. Por último, mencionamos anteriormente que existe una cierta interacción entre el oscilador central y el medio ambiente y también que los ritmos en condiciones de libre curso presentan algunas diferencias con respecto a los ritmos en

condiciones de luz-oscuridad. Esto puede entenderse planteando la existencia de una vía que conecte al medio ambiente con el reloj, a la cual llamaremos vía de entrada del sistema.

Como se puede observar en la figura 2.3A, queda configurado un sistema circadiano con tres componentes críticos: la vía de entrada, el oscilador central y la vía de salida. Podemos decir entonces que el reloj biológico modula las variables de salida pero lo hace teniendo en cuenta las claves temporales externas o zeitgeber (del alemán *zeit* = tiempo y *geber* = dador) que le llegan desde el medio ambiente. Este esquema organizativo del sistema circadiano fue popularizado por Arnold Eskin y se lo conoce como el “*eskinograma*”; si bien resultó de gran utilidad, presenta un modelo de sistema circadiano extremadamente simplificado con respecto al modelo que podemos plantear hoy en día.

En un principio, el medio ambiente se refería al medio externo al individuo e incluía a factores tales como la luz, la temperatura, interacciones sociales y otros estímulos capaces de modificar los parámetros de los ritmos circadianos. Sin embargo rápidamente se hizo evidente que el medio interno también era capaz de alterar la función del oscilador central, con lo que la entrada del sistema circadiano incluye ahora tanto componentes exógenos como endógenos. Una segunda complicación al esquema inicial se incorporó cuando surgieron evidencias de la capacidad de algunas variables de salida de alterar al oscilador central, lo que las ponía claramente en un rol de vía de entrada además de salida. Asimismo, algunas variables ambientales afectan directamente a los ritmos, sin que esta interacción esté mediada por el oscilador central. Para complicar aún más las cosas, en la actualidad existen componentes que no terminan de ser encasillados dentro de la entrada, la salida o del marcapasos. Es

por esto que propuso un modelo modificado del eskinograma en el cual existen zonas de interacción entre todos los componentes del sistema (Dunlap 1999) (figura 2.3B).

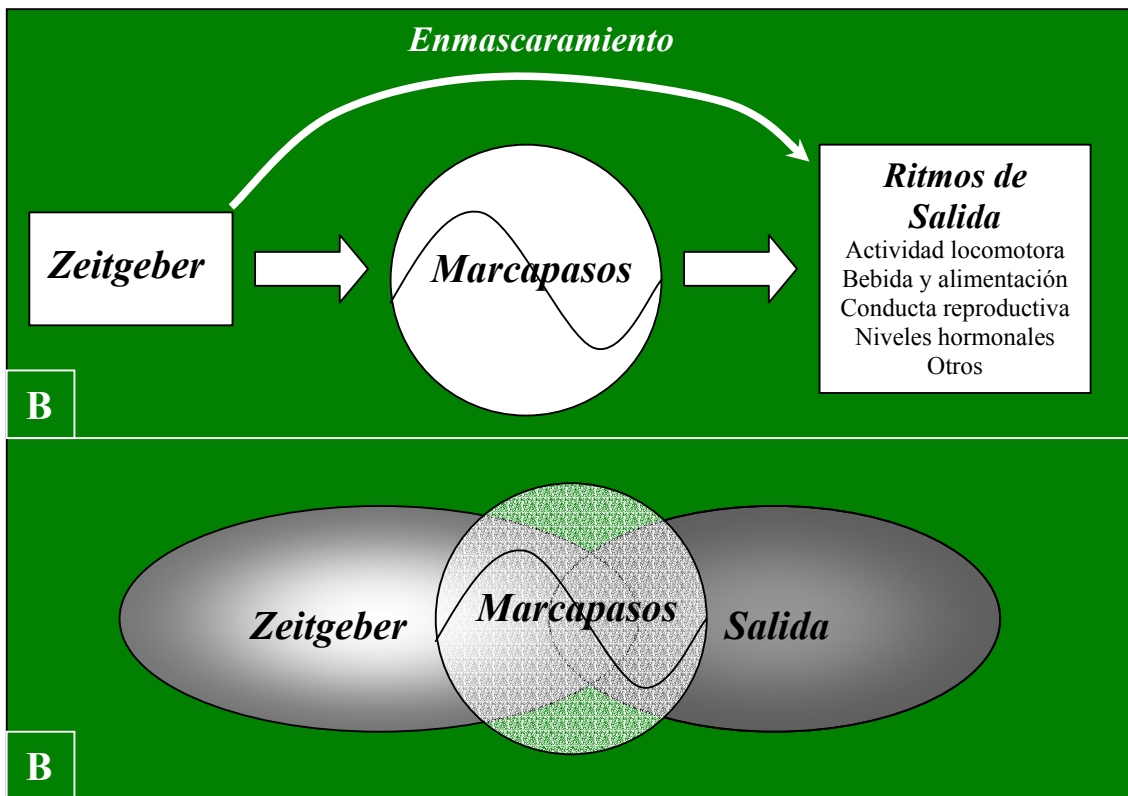


Figura 2.3. El sistema circadiano esta compuesto por tres partes elementales, el oscilador central y vías de entrada y salida.

A) Esquema simplificado del sistema circadiano conocido como eskinograma. Un marcapasos u oscilador endógeno aporta claves temporales endógenas por medio de las cuales modula la fisiología del organismo. Las variables rítmicas observadas (por ej. la actividad locomotora) corresponden a la salida del sistema y los mecanismos involucrados en la sincronización del marcapasos a la vía de entrada (por la vía activada por la luz). Los agentes sincronizadores son conocidos como zeitgebers y en algunos casos además de actuar sobre el marcapasos pueden actuar sobre la salida generando un efecto de enmascaramiento. **B)** Siendo el eskinograma una simplificación extrema del sistema circadiano, Dunlap propuso un esquema similar pero contemplando la interacción entre los tres componentes.

El gran aporte del eskinograma radicó en que permitió diseccionar el sistema de forma tal de hacer posible la detección de sus componentes a nivel molecular y farmacológico. Dicho de otra forma, las mutaciones, drogas o tratamientos capaces de alterar el período o de producir arritmicidad, estarían vinculados probablemente al mecanismo oscilatorio del marcapasos. Aquellos que simplemente cambiaran la fase o modificaran el cambio de fase inducido por algún otro estímulo estarían vinculados

probablemente a la vía de entrada. Por el contrario, aquellos estímulos que modificaran la amplitud, la fase o la ritmicidad, pero en forma temporaria, estarían vinculados con la salida. Estos no representan criterios inequívocos ya que un componente del oscilador central debe cumplir numerosos requisitos para ser considerado como tal (Zatz 1992b) y un cambio de fase puede deberse tanto a un efecto sobre la vía de entrada como a una alteración directa en alguna variable de estado del mecanismo del oscilador.

La modificación temporaria de la fase, la amplitud o la ritmicidad se denomina enmascaramiento (Aschoff 1960) y es un fenómeno de gran importancia, inevitable para individuos que viven en condiciones ambientales normales y muchas veces inevitable también en condiciones de laboratorio. Por otra parte el estudio del enmascaramiento puede darnos algunas claves acerca de la interconexión entre el oscilador y las variables de salida.

Fue en este marco conceptual que se definieron las preguntas claves de la cronobiología:

- ¿Dónde está el reloj?
- ¿Cómo funciona el reloj?
- ¿Cómo se sincroniza el reloj con el medio ambiente (externo e interno)?
- ¿Cómo modula el reloj el comportamiento y la fisiología del individuo?

Así fue que los cronobiólogos salieron a buscar agentes capaces de sincronizar los ritmos circadianos, mutantes o lesiones de algunas áreas que generaran animales arrítmicos o con períodos extraños para tratar de poder identificar anatómica y

genéticamente al reloj biológico y tratamientos que modifiquen el acoplamiento entre el reloj y la salida.

2.2.3. Relojes endógenos.

Una vez aceptado el origen endógeno de los ritmos circadianos el siguiente gran objetivo fue el de localizarlo. Curt Richter, un pionero entre los “bio-relojeros”, realizó una serie de experimentos a principios del siglo XX con los que pretendía determinar la localización del reloj biológico de ratas realizando lesiones o extirpando áreas cerebrales y analizando qué efecto tenían estos tratamientos sobre los ritmos circadianos. Con esto pudo concluir que existen ciertas áreas hipotalámicas probablemente responsables de la generación de los ritmos circadianos. El siguiente paso importante tardó bastante en llegar y requirió de la utilización de marcadores neuronales anterógrados. Dado que la luz es el principal sincronizador del sistema circadiano, Moore y Lenn optaron por administrar un marcador anterógrado en los ojos y localizar el destino de la proyección. Afortunadamente, como se puede ver en la figura 2.4A y B, la vía principal es una conexión directa entre la retina y el hipotálamo llamada haz retinohipotalámico (TRH), que finaliza en unos pequeños núcleos ubicados justo por encima del quiasma óptico llamados núcleos supraquiasmáticos (NSQ) (Moore y Lenn 1972). Experimentos posteriores mostraron que los NSQ aislados del resto del cerebro o mantenidos *in vitro* entran en libre curso (Inouye y Kawamura 1979; Newman 1991) y que la lesión bilateral de los NSQ lleva a la arritmicidad circadiana, la cual se recupera mediante el trasplante de NSQ fetales (Rusak y Zucker 1979; Drucker-Colin *et al.* 1984; Lehman *et al.* 1987; Aguilar-Roblero *et al.* 1994).

La detección de animales mutantes con alteraciones en el sistema circadiano fue crucial para la cronobiología. Por un lado confirmó definitivamente el carácter endógeno del reloj biológico dándole un sustrato genético y, por otro, permitió realizar los experimentos definitivos que llevarían a la identificación anatómica y funcional del reloj central.

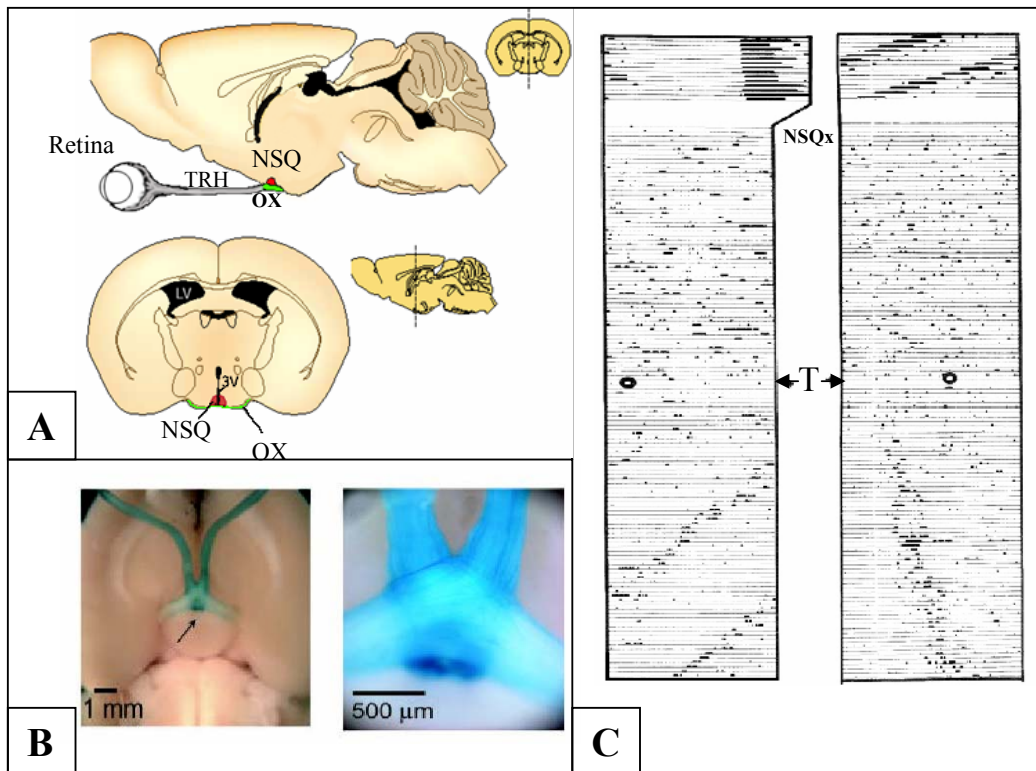


Figura 2.4. EL reloj endógeno principal en los mamíferos son los NSQ y su principal vía de entrada es de la retina vía el TRH.

A) Esquemas de cortes longitudinales y coronales mostrando la ubicación de los NSQ (en rojo), el quiasma óptico (OX, en verde) y la vía de entrada desde la retina por medio del TRH.

B) Fotografías de la vista ventral de cerebros de animales transgénicos en los que las células ganglionares que proyectan de la retina a los NSQ expresan actividad β galactosidasa (revelada en azul). En la foto de la izquierda la flecha negra señala la ubicación de los NSQ. La foto derecha corresponde al mismo cerebro a mayor aumento. (Modificado de Hattar *et al.*, 2002).

C) Actogramas que muestran el experimento que demostró definitivamente la necesidad y suficiencia de los NSQ en la generación de ritmos circadianos de actividad locomotora en rueda. Los NSQ de hamsters normales fueron lesionados (NSQx) y una vez perdidos los ritmos circadianos los animales fueron transplantados con NSQ (T) provenientes de animales mutantes de periodo corto. Los animales recuperaron la ritmicidad pero con el periodo de los donantes. En el actograma de la derecha se observa el mismo resultado para el experimento cruzado. (Modificado de Ralph y Lehman, 1991).

La demostración definitiva de la función marcapasos de los NSQ fue realizada por Martin Ralph y colaboradores valiéndose de hámsteres mutantes denominados Tau cuyo período es significativamente más corto que el de la cepa salvaje. Al trasplantar NSQ fetales de estos animales en animales de cepa salvaje con lesión completa de los NSQ observaron que los animales trasplantados recuperaron la ritmicidad circadiana pero con los parámetros del donante (figura 2.4C). El experimento inverso con la cepa salvaje como donante y la Tau como receptora dio el mismo resultado (Ralph *et al.* 1990). Desde ese entonces, el rol de los NSQ como marcapasos fue confirmado por una enorme cantidad de trabajos y las evidencias son tan concluyentes que se puede decir que ninguna otra estructura cerebral los supera en cuanto a ejemplo de localización funcional.

Los NSQ están ubicados por encima del quiasma óptico, en contacto con el extremo ventral del tercer ventrículo en el hipotálamo ventral anterior. Son muy compactos y en roedores contienen alrededor de 10.000 neuronas cada uno. A pesar de su pequeño tamaño, su gran heterogeneidad los transforma en estructuras de una complejidad asombrosa. El análisis neuroanatómico, electrofisiológico e histoquímico permite subdividirlos en por lo menos dos regiones: la zona ventrolateral, también llamada *core* (centro), que tiene alta densidad celular, alta densidad de terminales del TRH, alto contenido del péptido vasoactivo intestinal (VIP) y del péptido liberador de gastrina (GRP) y la zona dorsomedial, también llamada *shell* (corteza), que presenta alto contenido de calbindina (CALB), arginina vasopresina (AVP) y somatostatina y menor densidad de aferencias retinianas (figura 2.5) (para una revisión (van den Pol 1991; Inouye y Shibata 1994).

La capacidad de los NSQ de generar y mantener ritmos circadianos es una propiedad intrínseca de las células que los componen (Welsh *et al.* 1995). Al disociar

los NSQ, las células individuales mantienen la capacidad de generar ritmos circadianos pero los períodos observados para distintas células provenientes de un mismo núcleo pueden variar entre 23.25 y 25.5 horas aproximadamente. El período de las oscilaciones de los NSQ y, por lo tanto, de los ritmos de actividad locomotora en libre curso corresponde al promedio de los períodos de las células aisladas (Liu *et al.* 1997; Herzog *et al.* 1998). El mecanismo por el cual las neuronas de los NSQ se acoplan para dar al núcleo entero un único período de oscilación es enteramente desconocido.

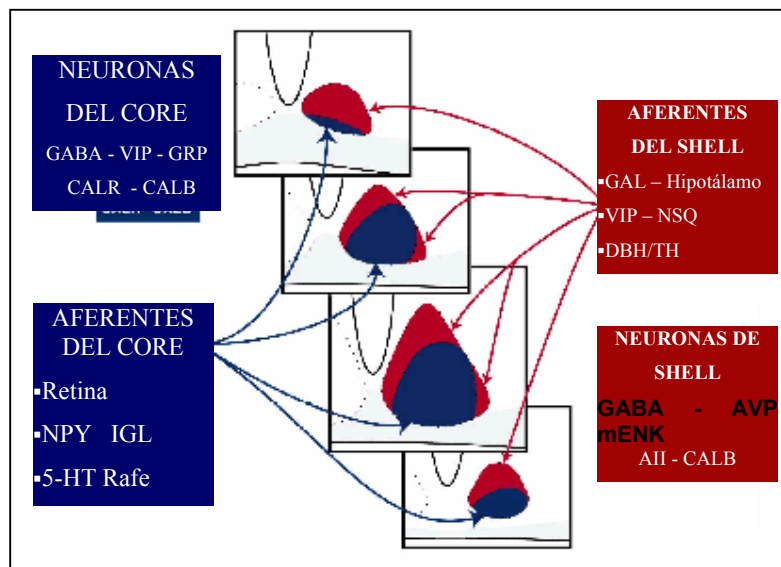


Figura 2.5. *Subdivisiones neuronales de los NSQ y sus aferencias.*

Los distintos gráficos ejemplifican la distribución de las subdivisiones a lo largo del eje antero-posterior de los NSQ de rata. En azul se destaca la zona ventrolateral (*core*) y en rojo la zona dorsomedial (*shell*). Los cuadros con flechas que llegan a los NSQ detallan las vías de entrada a cada subdivisión de los NSQ y el principal neurotransmisor involucrado. Los cuadros sin flechas asociadas detallan los marcadores característicos de cada zona. Modificado de (Abrahamson & Moore, 2001).

Los NSQ fueron considerados los únicos marcapasos del sistema circadiano por mucho tiempo hasta que, recientemente, otros osciladores circadianos fueron descritos tanto en SNC como en órganos periféricos. El oscilador circadiano en la

retina fue el primer oscilador “secundario” descrito en el SNC (Tosini y Menaker 1996) y a ésta le siguió el bulbo olfatorio (Granados-Fuentes *et al.* 2004a; Granados-Fuentes *et al.* 2004b). En la periferia se hallaron osciladores circadianos secundarios en músculo, hígado, pulmón y corazón, entre otros tejidos (Yamazaki *et al.* 2000; Yoo *et al.* 2004). Sorprendentemente, se hallaron líneas celulares provenientes de tejidos periféricos (fibroblastos, hepatocitos, etc.), capaces de mantener ritmos circadianos en cultivos (Balsalobre *et al.* 1998). Todos estos hallazgos nos obligan a admitir que el sistema circadiano es un sistema extremadamente complejo integrado por un gran número de osciladores (órganos y células aisladas) organizados en forma jerárquica tal que existen osciladores centrales capaces de sincronizar a un grupo de osciladores esclavos o secundarios que a pesar de tener la capacidad de oscilar independientemente requieren de una señal sincronizadora para generar y mantener las oscilaciones (figura 2.6).

Si bien existe un gran número de ritmos circadianos que responden a las oscilaciones de los NSQ, existen algunos que no dependen de ellos. El ejemplo más claro es la anticipación al alimento en la que los animales despliegan una actividad anticipatoria a la obtención de alimento cuando éste se le presenta a intervalos regulares de entre 22 a 31 horas (Stephan 1984). Esta actividad anticipatoria al alimento se mantiene aun en animales con lesión total de los NSQ por lo que se ha propuesto que se trata de un ritmo circadiano generado por un reloj independiente de los NSQ al que se denomina FEO (del inglés *feeding entrainable oscillator*) (Stephan 1992a, b; Mistlberger 1994). Existen otros ritmos circadianos en los cuales la dependencia con respecto a los NSQ no ha sido claramente determinada; asimismo, existen evidencias contradictorias, como las correspondientes a las oscilaciones de algunas variables inmunológicas (Depres-Brummer *et al.* 1997; Filipski *et al.* 2004).

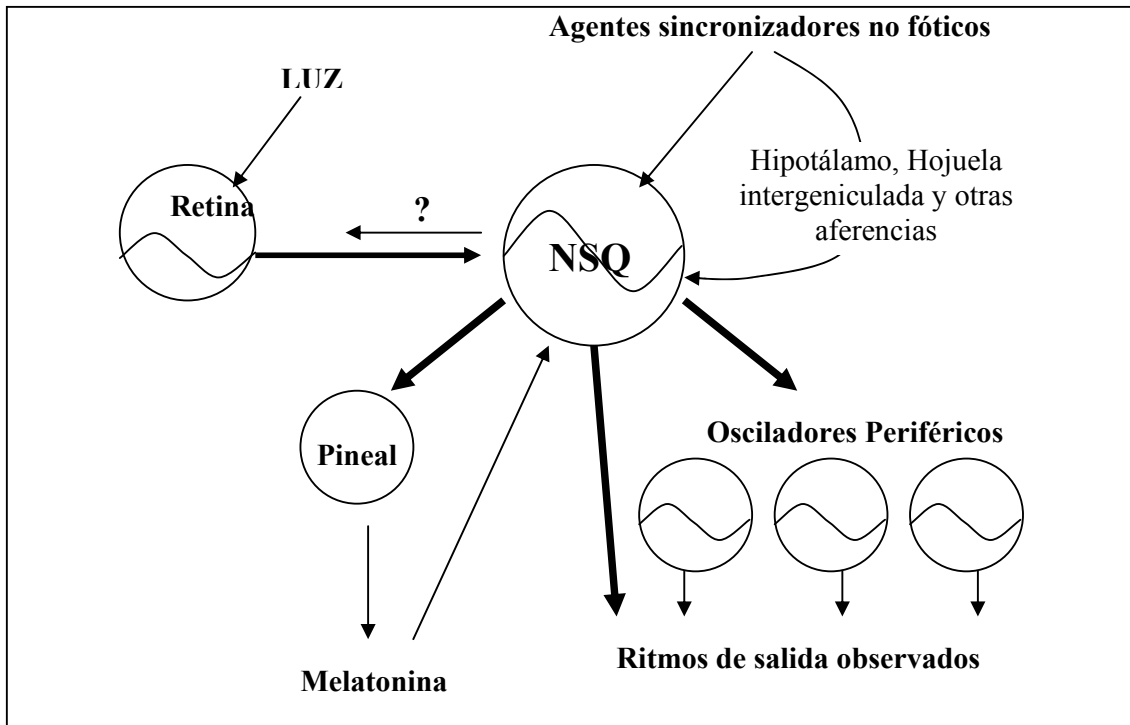


Figura 2.6. *El sistema circadiano es un sistema jerárquico de múltiples osciladores.*

Esquema del sistema circadiano de mamíferos en el que se representa a los NSQ como osciladores centrales capaces de sincronizar a varios osciladores periféricos. Los ritmos de las variables de salida pueden ser modulados a su vez por estos osciladores periféricos o directamente por los NSQ. La retina se comporta como un oscilador secundario y es la vía de aferencia principal de la señal fótica aunque no está determinada con claridad la capacidad de control de los NSQ sobre ella. También se detallan las vías de entrada no fóticas por medio del estructuras talámicas e hipotalámicas.

Es posible que existan numerosas vías de retroalimentación en todos los componentes del sistema que fueron excluidas para mantener la simplicidad del esquema.

(Modificado de Dunlap et al. 2004)

2.2.4. El reloj molecular.

Entonces sabemos ahora dónde está localizado el reloj principal, que el sistema circadiano es en realidad un sistema con múltiples osciladores que interactúan entre sí y que aun células individuales pueden comportarse como osciladores. Y esto nos lleva necesariamente a pensar que existe un mecanismo intracelular capaz de generar y mantener oscilaciones circadianas. ¿Cuál es ese mecanismo?

Las estrategias utilizadas para encontrar los mecanismos moleculares responsables de las oscilaciones circadianas fueron diversas. Retomando el

eskinograma como modelo, una de las estrategias fue la de un acercamiento gradual desde las vías de entrada y salida hacia el oscilador. La idea inmanente en esta estrategia es que profundizando en el conocimiento de las vías de entrada o de salida del sistema, necesariamente se llegaría en algún momento al mecanismo central de oscilación. Si bien esta estrategia no fue muy útil para comprender la base del oscilador, aportó una gran cantidad de información acerca de las vías de sincronización del sistema.

La genética directa y la genética reversa fueron también empleadas como estrategias en la búsqueda de los engranajes del reloj. Si bien las dos hicieron importantes aportes a la cronobiología, la genética directa fue definitivamente la que aportó las piezas claves del rompecabezas. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que lo que permitió que las respuestas se develaran en forma vertiginosa fue la increíble semejanza entre los relojes de diferentes organismos. Los engranajes que constituyen el mecanismo relojero en moscas son prácticamente idénticos a los de mamíferos y el mecanismo general de funcionamiento es incluso similar en bacterias. Todos los relojes biológicos descritos hasta el momento se basan en un sistema de ciclos de retroalimentación negativa y positiva que interactúan entre sí (ver revisiones en (Dunlap 1999; Young 2000; Young y Kay 2001; Guido y de la Iglesia 2002; Panda et al. 2002). El sistema básico consta de un ciclo de retroalimentación negativa en el que un componente positivo promueve la síntesis de un componente negativo que, al acumularse, reprime su propia síntesis (figura 2.7A).

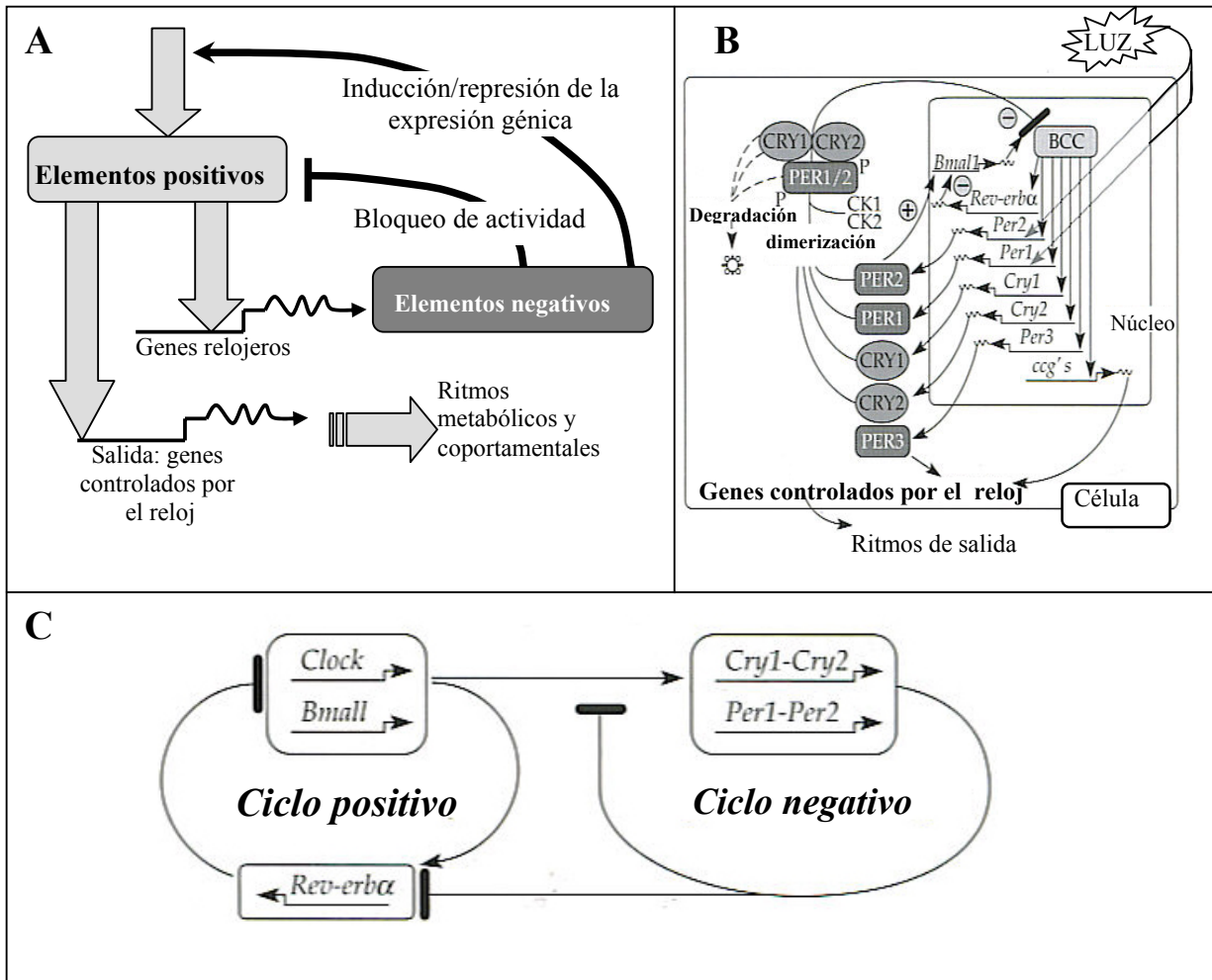


Figura 2.7. El reloj molecular de mamíferos.

Tres esquemas que muestran al reloj molecular con diversos grados de complejidad. Es probable que aún el esquema más complejo resulte extremadamente simplista. **A)** Esquema general del reloj molecular aplicable a todos los relojes moleculares estudiados hasta este momento. Uno o más componentes positivos (factores de transcripción) inducen la expresión de genes de salida y también de genes relojeros que producen los componentes negativos capaces de bloquear la actividad transcripcional del componente positivo. A su vez los componentes negativos podrían modular la expresión de los componentes positivos. **B)** Esquema del reloj molecular de mamíferos en el que se detallan los componentes positivos, los negativos y los mecanismos que modulan su estabilidad, localización y expresión. Brevemente, el complejo CLOCK/BMAL (BCC) es un factor de transcripción capaz de inducir la expresión de los componentes negativos (PER y CRY), de Rev-Erb α una proteína capaz de bloquear la expresión de BMAL y de componentes de salida como AVP. La enzima CK1 ϵ es capaz de fosforilar a la proteína PER disminuyendo su estabilidad y demorando por tanto su entrada al núcleo luego de dimerizarse con CRY. Una vez en el núcleo PER y CRY bloquean la actividad transcripcional de BCC e inducen la expresión de BMAL. **C)** Un esquema que presenta una visión más simple del reloj molecular de mamíferos mostrando claramente los ciclos positivo y negativo interconectados.

Si bien los nombres y la cantidad de los engranajes presentes cambian a lo largo de la escala evolutiva, el principio es siempre el mismo. Esto resulta sorprendente teniendo en cuenta que entre moscas y mamíferos los nombres casi no cambian a pesar de 550

millones de años de separación en la historia evolutiva (tabla 2.2). En moscas, los componentes positivos principales son Clock y Cycle y los negativos son Per, Tim y Cry mientras que en mamíferos los componentes positivos principales son Clock y Bmal (homólogo de cycle) y los negativos serían Per1, Per2 y Cry1. Se han encontrado muchos otros componentes, algunos de los cuales están involucrados en la regulación de la estabilidad de los transcritos y productos proteicos de los componentes positivos y negativos. Esta regulación post-transcripcional es la que determina el período de las oscilaciones.

La genética directa es una estrategia rápida en moscas pero extremadamente laboriosa y lenta en mamíferos. Sin embargo fue esta estrategia la que llevó al clonado del primer gen relojero en mamíferos. Los mutantes clock (del inglés *Circadian Locomotor Output Cycle Kaput*), cuyo período es de 24,6 horas, significativamente más largo que en los ratones normales, fueron generados por mutación inducida (Vitaterna *et al.* 1994). La mutación fue mapeada y ubicada en la zona central del cromosoma 5 y posteriormente el gen Clock fue clonado y secuenciado (Antoch *et al.* 1997; King *et al.* 1997a; King *et al.* 1997b). El producto proteico del gen Clock es una proteína de la familia PAS (en referencia a las proteínas **PER**, **ARNT** y **SIM** de *Drosophila* que contienen este dominio) con un dominio bHLH (del inglés *basic-Helix-Loop-Helix*) y capacidad de activación transcripcional. PAS es un dominio de dimerización que permite la unión a otras proteínas con dominio PAS y el dominio bHLH permite la unión al DNA. La presencia del dominio PAS es una característica muy conservada en los genes relojeros desde hongos a mamíferos y su combinación con el dominio bHLH es común en estos factores de transcripción que incluyen a muchos de los componentes positivos de los osciladores circadianos (Reppert y Weaver 1997). La presencia de un dominio PAS en CLOCK

llevó a la búsqueda de un compañero de dimerización cuyo candidato más reconocido es B-MAL1, también llamado MOP3 (Gekakis *et al.* 1998; Hogenesch *et al.* 1998; Honma *et al.* 1998). El dímero CLOCK/BMAL-1 es capaz de unirse al DNA en regiones que contengan cajas E cuya secuencia consenso es CACGTG y activar la transcripción de los genes asociados a ellas (Hao *et al.* 1997; Kako y Ishida 1998; Jin *et al.* 1999; Darlington *et al.* 2000; Munoz *et al.* 2002). Esto los convierte en buenos candidatos a ser los componentes positivos del ciclo de retroalimentación negativa que mencionamos anteriormente.

Tabla 2.2. Componentes del reloj molecular de mamíferos y de *Drosophila*.

Familia	Proteínas		Mutantes en mamíferos	Propiedades
	Drosophila	Mam.		
bHLH-PAS	CLOCK	CLOCK	Período largo, luego arrítmico	Expresión constitutiva. Se une a BMAL1 o 2 e induce la transcripción de Per, Cry, Rev-erba
	CYCLE	BMAL1 BMAL2	Arrítmico	El mRNA cicla con máximos por la noche. Se une a Clock para ejercer actividad transcripcional en genes con elemento E.
PER-PAS	PER	PER1 PER2 PER3	Período corto y luego arrítmicos, el doble mutante de Per1 y 2 es arrítmico	Las proteínas y el mRNA ciclan. Se unen a Cry e inhiben su propia síntesis. Inducen la expresión de BMAL1.
Flavoproteínas	CRY	CRY1 CRY2	Cry1 tiene período corto, Cry2 tiene período largo y el doble mutante es arrítmico.	El mRNA cicla. Se une a PER y lo estabiliza. Inhibe la transcripción de Per y Cry.
Caseína Quinasa	DBT	CQ1ε CQ1δ	Período corto (Tau)	Expresión constitutiva. Fosforila PER afectando su estabilidad.
Factor de transcripción b-ZIP	VRILLE	E4BP4		Suprime la expresión de Per1 en cultivos celulares.
Receptor nuclear huérfano		REV-ERBα	Período corto	El mRNA cicla. Induce la transcripción de Bmal1.

Al clonado de Clock le siguió el de los genes Per – que presentan tres variantes en mamíferos (Albrecht *et al.* 1997; Shearman *et al.* 1997; Sun *et al.* 1997;

Tei *et al.* 1997; Zylka *et al.* 1998b) - y el del gen Tim (Koike *et al.* 1998; Sangoram *et al.* 1998; Zylka *et al.* 1998a). El clonado de los genes Per1 y Tim en mamíferos fue facilitado en gran medida por la alta homología que tienen respectivamente con los genes Per y Tim de *Drosophila* que habían sido descritos previamente (Konopka y Benzer 1971). Posteriormente se agregaron a esta lista los genes Cry1 y 2 que, si bien habían sido descritos anteriormente en mamíferos, no habían sido vinculados al sistema circadiano (Miyamoto y Sancar 1998; Thresher *et al.* 1998; Kume *et al.* 1999).

Si bien conocemos en la actualidad unos cuantos componentes del reloj molecular, estamos lejos de entender su funcionamiento por completo. Sin embargo, existe cierto consenso en la comunidad cronobiológica como para plantear un modelo del funcionamiento del reloj molecular en mamíferos (figura 2.7B). De acuerdo con este modelo, la generación de las oscilaciones depende de un componente positivo generalmente compuesto por un heterodímero formado por CLOCK y BMAL-1, que es un factor de transcripción capaz de inducir la expresión de los componentes negativos, los genes Per y Cry (Hogenesch *et al.* 1998; Sangoram *et al.* 1998). Una vez sintetizadas, las proteínas PER y CRY son capaces de formar heterodímeros que entran al núcleo y reprimen su propia síntesis, inhibiendo la actividad transcripcional del dímero CLOCK/BMAL-1. Esta secuencia genera un ciclo de transcripción de los genes Per y Cry, la que lleva a un ciclo en los niveles de síntesis de sus productos proteicos. Normalmente un ciclo de este tipo podría completarse en apenas algunas horas pero en este caso la acumulación de PER1 y CRY en el citoplasma es retardada por modificaciones transcripcionales que las hacen inestables aumentando su degradación. La mutación Tau, que genera hámsteres de período muy corto, fue mapeada recientemente y llevó a la identificación de un gen cuyo producto proteico es

la caseína kinasa 1ε (CK1ε), una enzima que puede fosforilar a PER aumentando su tasa de degradación y es homóloga a DOUBLETIME en moscas (Lowrey *et al.* 2000; Young 2000). Esto hace que exista una demora hasta que la concentración del dímero PER/CRY se halle en el citoplasma en concentraciones suficientes como para entrar al núcleo y ejercer su efecto represor. Esta demora es una de las principales causas que hacen que el período de esta oscilación sea circadiano y no menor.

Con respecto al mecanismo por el cual PER y CRY son capaces de inhibir la actividad transcripcional de CLOCK/BMAL1 sabemos poco y nada. De hecho no está muy claro cuál es exactamente el rol de las tres variantes de PER y las 2 de CRY en este ciclo. De acuerdo con un trabajo de Reppert y colaboradores, CRY sería el componente negativo propiamente dicho, PER1 estaría involucrado en el control de proteínas controladas por el reloj como la vasopresina y PER3 (Jin *et al.* 1999), y PER2 participaría de un segundo ciclo (en este caso de retroalimentación positiva) estimulando la transcripción de Bmal1 (Shearman *et al.* 2000b). Con respecto a Cry1 y 2, se sabe que son mutuamente redundantes; la presencia de por lo menos una de ellas resulta fundamental para mantener el circuito de retroalimentación negativo funcionando. Esto se puso en evidencia al observar que los *knock-outs* de uno sólo de los genes no pierden su ritmicidad mientras que esto sí ocurre en el doble *knock-out* Cry1^{-/-} / Cry2^{-/-} (van der Horst *et al.* 1999; Vitaterna *et al.* 1999). La función de PER3 no ha sido determinada claramente hasta la actualidad y parece no ser muy relevante en el mecanismo de oscilación molecular (Shearman *et al.* 2000a).

Recientemente se agregó a la lista de genes relojeros un componente nuevo. Rev-Erbα, un receptor nuclear huérfano, es un gen cuya expresión es activada por el dímero CLOCK/BMAL1 y es capaz de reprimir la síntesis de Bmal actuando sobre los elementos de respuesta a Rev-Erb/ROR presentes en el promotor de Bmal1 (Preitner

et al. 2002; Ueda *et al.* 2002). Esto hace que cuando los niveles de PER y CRY están altos, la expresión de Bmal sea mínima. Esta interacción entre los ciclos de retroalimentación negativa y positiva hace que los componentes positivos se expresen en antifase con respecto a los componentes negativos, lo que se ve reflejado en un ritmo circadiano con máximos durante el día para Cry, Per1, 2 y 3 y con máximos durante la noche para Bmal1 (en mamíferos la expresión de Clock es constitutiva o presenta oscilaciones circadianas de muy baja amplitud). Este mecanismo genera oscilaciones más robustas, impidiendo el efecto de amortiguación que se vería en caso de haber un único ciclo de retroalimentación negativa. Dentro de este modelo, la regulación de las variables de estado del sistema, tales como la tasa de producción, la actividad específica y la estabilidad de los elementos positivos y negativos, permite modular parámetros de las oscilaciones incluyendo la fase y el período (Guido y de la Iglesia 2002). Así es que puede considerarse que la generación de un ritmo en particular es una propiedad intrínseca de las células reloj y que éstas pueden ser sincronizadas por señales extracelulares mediadas por diversos mecanismos de transducción, capaces de modificar las variables de estado del sistema (Dunlap 1999).

2.2.5. Sincronización fótica y no fótica.

Desde el momento en que De Candolle observó en 1832 que los ritmos en condiciones de libre curso tenían un período diferente al de los ritmos en condiciones normales de luz:oscuridad, se hizo evidente que, en situaciones normales, los ritmos biológicos estaban siendo sincronizados por la luz. En el transcurso del siglo XX se hicieron muchos experimentos para entender las características y los mecanismos implicados en el proceso de sincronización. Los primeros experimentos mostraron que el sistema no es igualmente sensible a la luz a cualquier hora del día; de hecho, la

respuesta puede ser totalmente opuesta entre dos horarios diferentes. En hámsteres se observó que pulsos de luz administrados durante el día subjetivo no tienen efecto alguno sobre los ritmos de actividad locomotora mientras que al comienzo de la noche subjetiva producen retrasos de la fase y, si son aplicados en el final de la noche subjetiva, se obtienen avances de la fase. Se observaron resultados similares en otros roedores nocturnos y diurnos. Estos primeros experimentos definieron lo que se denominó curva de respuesta de fase (CRF) que representa el efecto de un tratamiento sobre la fase de un ritmo, en función de la hora a la cual se realiza el tratamiento.

Además de la luz, las CRFs de muchos otros estímulos fueron determinadas, lo que llevó a una clasificación de los estímulos en función de la CRF obtenida. Aquellos estímulos que causan retrasos de fase al ser administrados al comienzo de la noche subjetiva y adelantos al aplicarlos hacia el final de la misma, se clasifican como estímulos fóticos por generar una CRF similar a la causada por la luz (figura 2.8). Los tratamientos que produjeron una CRF diferente fueron catalogados como no fóticos y generalmente producen adelantos de fase al ser aplicados durante el día subjetivo y tienen poco o ningún efecto durante la noche subjetiva. En general los estímulos fóticos y no fóticos presentan efectos antagónicos de forma tal que se inhiben mutuamente.

Las curvas de respuesta de fase son una característica de cada especie (y en algunos casos dependen también de la cepa) y, si bien presentan similitudes, las diferencias pueden ser notables. Pittendrigh y Daan estudiaron detenidamente las CRFs de distintas especies de animales nocturnos y elaboraron ciertas predicciones o reglas que proponen que la diferencia entre los avances y retrasos de fase inducidos por luz en la noche subjetiva dependen del período endógeno (τ) del animal, de forma tal que a menor τ mayor es la relación retraso/avance. Esto a su vez determina que los

animales con τ menores a 24 horas tiendan a sincronizarse con el ciclo L:O mediante retrasos de fase y tomen como fase de referencia la transición luz:oscuridad compatible con la vida nocturna, mientras que los animales diurnos tendrían τ mayor a 24 horas, utilizarían los avances de fase para sincronizarse y la transición oscuridad:luz como fase de referencia (Pittendrigh y Daan 1976). Por otro lado, sugirieron que las diferencias en las CRFs estarían también vinculadas a la capacidad de mantener la sincronización en fotoperíodos variables.

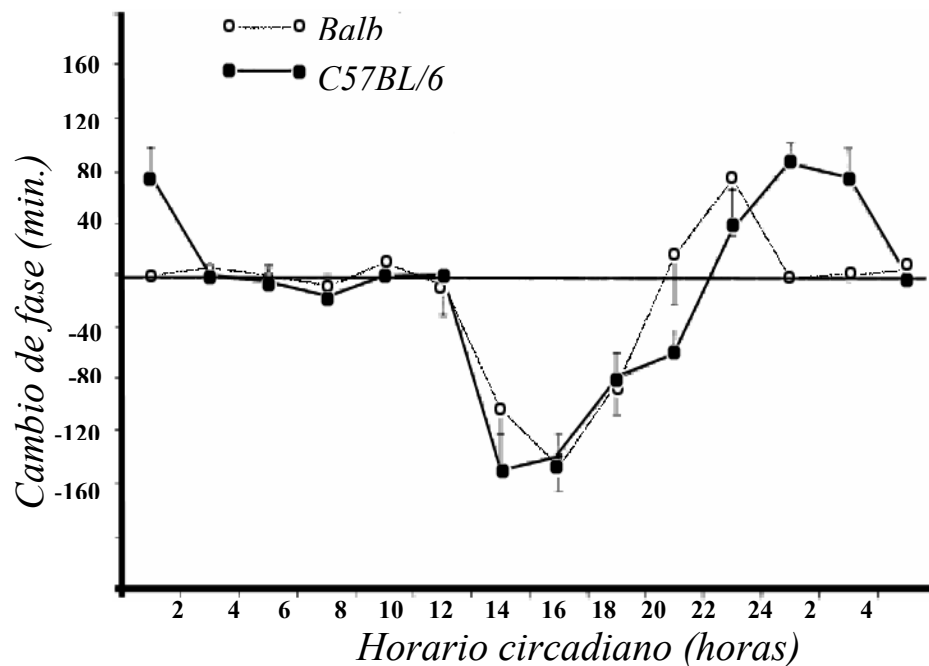


Figura 2.8. Curvas de respuesta de fase fótica de ratones C57BL/6 y BalbC.

La magnitud de los cambios de fase inducidos por diversos estímulos varía en función del horario circadiano (CT) en el que se realiza la estimulación. En particular los estímulos de tipo fótico, como los pulsos de luz en esta figura, producen retrasos de fase cuando son aplicados en las primeras horas de la noche subjetiva (entre CT 12 y 18), avances al aplicarlos al final de la noche subjetiva (entre CT 18 y 24) y no tiene grandes efectos durante el día subjetivo (entre CT 24 y 12). Esto varía de acuerdo a la especie y a la cepa de los animales. En el caso de los ratones comparados en esta figura se pueden observar diferencias fundamentalmente en la zona de avances. En ambos casos los retrasos máximos se obtienen entre CT13 y 15.

Las diferencias en las CRFs de distintas especies se hacen notables al comparar las de hámsteres y ratones. En los hámsteres ($\tau \approx 24,07$ horas) los avances son de mayor magnitud que los retrasos mientras que en ratones ($\tau \approx 23,5$ horas) los

retrasos son de mayor magnitud que los avances, al punto que en algunas cepas los avances inducidos por pulsos de luz al final de la noche subjetiva no se observan.

Si bien las curvas de fase se conocieron ya a principios de la década de 1970, aún no existía un sustrato anatómico definido y mucho menos aún un mecanismo molecular asociado a este fenómeno. En 1989 y 1990 aparecieron los primeros trabajos mostrando que luego de un pulso de luz durante la noche la inmunoreactividad de FOS en los NSQ aumenta en forma dramática en menos de una hora (Rea 1989; Aronin *et al.* 1990; Rusak *et al.* 1990). Estos resultados sugirieron un rol de los genes de expresión inmediato-temprana (IEGs) en la sincronización del reloj biológico. Esta hipótesis tomó aun más fuerza al demostrarse que la distribución de la inmunoreactividad de FOS en los NSQ se correspondía, en las distintas especies estudiadas, con el patrón anatómico de las terminales de las aferentes retinianas (Rusak *et al.* 1992). Además, el umbral de sensibilidad a la luz para cambios de fase e inducción de Fos es similar y la intensidad de la expresión aumenta al aumentar la intensidad de los pulsos de luz al igual que lo hacen los cambios de fase (Kornhauser *et al.* 1990). Los estímulos no fóticos, en cambio, no son capaces de inducir la expresión de FOS en los NSQ pero sí en la IGL, una estructura que interviene en los cambios de fase no fóticos (Janik y Mrosovsky 1992; Mead *et al.* 1992).

Además de Fos, el control rápido por parte de la luz fue demostrado para otros IEGs dentro de los NSQ, incluyendo miembros de la familia Jun, NGFI-A y NGFI-B (Ebling *et al.* 1996; Guido *et al.* 1996a; Guido *et al.* 1996b, c; Schwartz *et al.* 2000). Estos resultados reforzaron la idea de que la expresión de IEGs está estrechamente ligada a los cambios de fase inducidos por estímulos fóticos. Sin embargo, hasta el día de hoy el rol de los IEGs en la sincronización del sistema circadiano no ha sido determinado con claridad.

En cuanto aparecieron candidatos a componentes moleculares del reloj, los primeros estudios correspondieron a sus respuestas a los estímulos fóticos y no fóticos. Así se supo rápidamente que, en mamíferos, Per1 y 2 responden a los pulsos de luz en la noche mostrando un rápido incremento en su expresión y no muestran cambios al aplicar pulsos de luz durante el día. Si bien esto muestra claramente un mecanismo por medio del cual la luz puede modificar en forma directa una variable de estado del oscilador, y esto necesariamente debe traducirse en un cambio de fase, estamos muy lejos aún de comprender los mecanismos que determinan que un mismo estímulo produzca retrasos a una hora y adelantos a otra (Meijer y Schwartz 2003). En este sentido se ha reportado la inducción diferencial de Per1 y 2 con pulsos en la noche temprana (retrasos) o en la noche tardía (avances). Esto llevo a postular que Per1 estaría involucrado en los avances de fase y Per2 en los retrasos (Albrecht *et al.* 1997) pero existen trabajos que ponen en duda esta interpretación (Zylka *et al.* 1998b; Yan *et al.* 1999). Asimismo, existen evidencias que cuestionan la importancia de Per 1 y 2 en los cambios de fase inducidos por luz. Ratones incapaces de expresar PACAP responden con retrasos de fase en lugar de adelantos cuando son expuestos a pulsos de luz en la noche tardía, lo cual sugiere que este neuropéptido sería crucial para los adelantos (Hannibal *et al.* 2001). Por otro lado, existen hasta el momento tres líneas de ratones deficientes en mPer1 y una en mPer2 que presentan algún tipo de sincronización por luz (Albrecht *et al.* 2001; Cermakian *et al.* 2001; Bae y Weaver 2003). Tampoco tenemos muy claro cuál es el mecanismo involucrado en los cambios de fase de tipo no fótico, si bien existen evidencias que muestran que la presentación de estímulos no fóticos en los momentos en que inducen avances de fase produce una disminución en los niveles de expresión de Per1 en los NSQ (Maywood *et al.* 1999).

2.2.6. Vías de entrada y salida de los núcleos supraquiasmáticos.

Una de las características más asombrosas de los NSQ es su capacidad de modular prácticamente toda la fisiología y el comportamiento de los mamíferos. De hecho, es más difícil hoy en día encontrar variables que no presenten ritmos circadianos que variables que los tengan. Esto no quiere decir que los NSQ sean imprescindibles para que los procesos fisiológicos ocurran sino que tienen la capacidad para determinar cuándo es que ocurren. El otro factor interesante es que pueden ser sincronizados por un gran número de estímulos diferentes, incluyendo luz, temperatura, hábitos sociales, conducta reproductiva, actividad, olores, etc. Y todo esto lo hacen aproximadamente 20.000 neuronas y 8.000 astrocitos compactados en menos de 1mm^3 (en roedores de laboratorio). ¿Cuáles son las vías de entrada y de salida que le dan a los NSQ esta increíble capacidad de comunicación con el medio y con las variables de salida?

Volviendo a los experimentos de trasplantes de NSQ, se hace evidente que existen dos alternativas para que los trasplantes puedan restaurar muchos de los ritmos perdidos. Una posibilidad es que los trasplantes establezcan conexiones nerviosas con el cerebro del hospedador o que la comunicación sea humoral. Este problema fue resuelto en parte por Rae Silver y sus colaboradores quienes aislaron los trasplantes de NSQ en cápsulas de un polímero sintético antes de insertarlos en los animales lesionados (Silver *et al.* 1996). Si bien las cápsulas impiden que se establezcan contactos directos entre los explantos y el huésped, los ritmos se restauraron al igual que en los explantos no aislados en cápsulas. Esto sugiere que el control que los NSQ ejercen sobre los ritmos restablecidos es, por lo menos en parte, humoral. Lo que no está todavía claro es por qué algunas variables no recuperan sus ritmos. Puede ser que dependan del establecimiento de comunicación nerviosa, que en

el proceso del trasplante los NSQ hayan perdido su capacidad para controlar esa variable o que la lesión misma imposibilite el restablecimiento de los ritmos. Se sabe por numerosos trabajos que existen conexiones nerviosas entre los NSQ y algunas salidas, siendo la síntesis de melatonina en la pineal el más claro ejemplo. Se puede decir entonces que los NSQ se comunican con el resto del organismo utilizando tanto vías nerviosas como humorales y que esto vale tanto para las vías de entrada como para las de salida.

Las principales aferencias a los NSQ provienen de la retina. La información desde la retina sigue dos vías posibles, una directa a través del TRH y una vía colateral que pasa por la hojuela intergeniculada lateral del tálamo (IGL) y luego inerva la zona ventrolateral de los NSQ. A esta segunda vía se la conoce como vía genículo-hipotalámica (VGH). Además, como puede verse en la figura 2.9.A, existen aferencias desde el rafe, tanto del núcleo dorsal como del medial y del núcleo paraventricular del tálamo (PVT) (Moga y Moore 1997; Krout *et al.* 2002).

Las terminales de las aferencias retinianas se encuentran principalmente en la zona ventrolateral de los NSQ, ya sea que provengan del TRH como de la VGH. Sin embargo, los neurotransmisores involucrados en las terminales de ambas vías son diferentes. En el caso del TRH se liberan principalmente glutamato y PACAP mientras que en la VGH los neurotransmisores liberados son NPY y GABA. En el caso de la vía proveniente del rafe, cuyo campo terminal también se extiende principalmente en la zona ventrolateral, el neurotransmisor empleado es la serotonina. La naturaleza química de la vía proveniente del PVT es desconocida, así como el tipo de información que transmite. A diferencia de las vías anteriores, sus terminales tienen una distribución fundamentalmente dorsomedial. Por otro lado muchos de los

núcleos hipotalámicos inervados por los NSQ establecen en realidad circuitos bidireccionales inervando ellos mismos a los NSQ (Kroust *et al.* 2002).

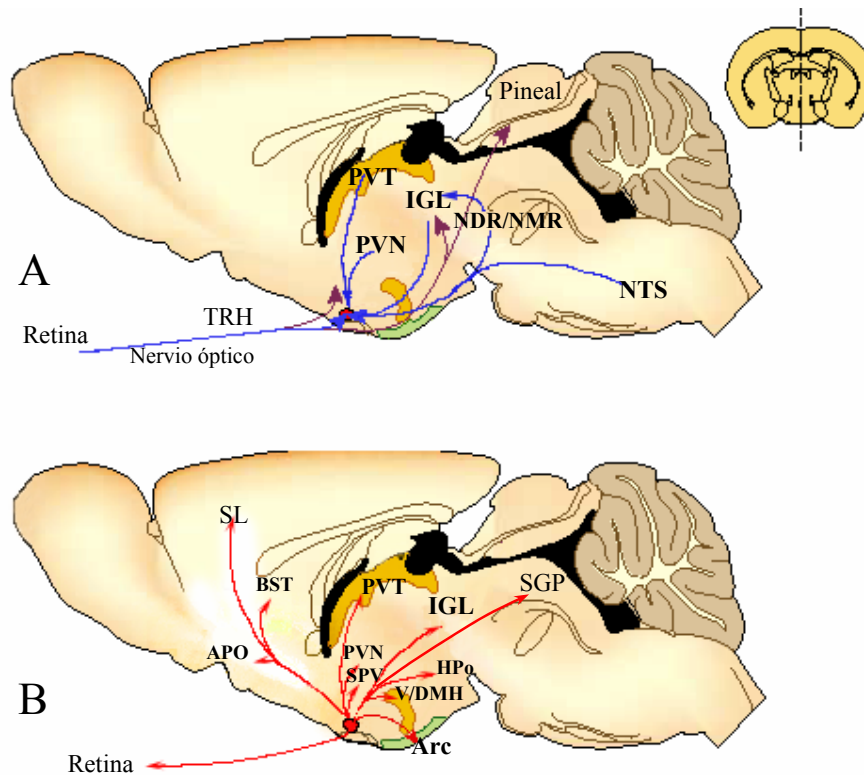


Figura 2.9. Aferencias y eferencias de los NSQ.
A) Aferencias de los NSQ (flechas azules) y vías de entrada de la información proveniente de la retina a otras zonas vinculadas al sistema circadiano (flechas violetas). **B)** Eferencias desde los NSQ (flechas rojas). Para mantener el esquema en forma simplificada se han obviado algunas vías de salida como la salida hacia la pineal descrita en la introducción y se ha omitido los rótulos de los NSQ y del quiasma óptico. Abreviaturas: (APO) área pre óptica, (Arc) núcleo arcuato (en verde), (BST) núcleo de la estría terminal, (HPo) hipotálamo posterior, (IGL) hojuela intergeniculada lateral, (NDR/NMR) núcleos dorsal y medial del rafe, (NTS) núcleo del tracto solitario, (PVN) núcleo paraventricular hipotalámico, (PVT) núcleo paraventricular del tálamo, (SGP) sustancia gris periacueductal, (SL) septuma lateral, (SPV) zona subparaventricular, (TRH) tracto retinohipotalámico, (V/DMH) núcleos hipotalámicos dorso y ventromediales.

De todas las vías aferentes la mejor caracterizada es la del TRH. Esta vía se originaría en las células ganglionares que contienen melanopsina, las cuales tienen capacidad fotorreceptora (Berson *et al.* 2002; Hattar *et al.* 2002; Provencio *et al.* 2002; Beaulé *et al.* 2003; Morin *et al.* 2003). La activación de esta vía genera los cambios de fase fóticos en respuesta a la luz, liberando glutamato en el *core* de los

NSQ. A pesar de haber sido caracterizada la retina como un oscilador endógeno, poco es lo que se sabe acerca de su interacción entre ella con los NSQ más allá de la respuesta a la luz. La VGH, y las aferencias desde el rafe, estarían involucradas en la modulación de las terminales del TRH y aparentemente aportan información acerca de la iluminación ambiental. Se ha demostrado en numerosos trabajos que estas vías, por medio de la liberación de NPY, serotonina y GABA, están involucradas en la señalización no fótica, por lo que a veces se las denomina vías de entrada no fóticas (Azmitia y Segal 1978; Card y Moore 1982; Moore y Speh 1993).

Con respecto a las vías de entrada humorales, se han descrito en los NSQ una gran variedad de receptores que permitirían que moléculas de señalización de origen humoral modifiquen la actividad del oscilador o su capacidad de respuesta a *zeitgebers*. Entre estos factores capaces de actuar sobre los NSQ se destacan la melatonina, el NPY, NGF, BDNF, interferón gamma ($IFN\gamma$), $TGF\alpha$, angiotensina y prolactina entre otros (Pi y Grattan 1998; Liang *et al.* 2000; Li *et al.* 2002). Sin embargo es poco lo que se sabe hasta el momento del rol que cumplen las vías de entrada humorales en la sincronización del sistema circadiano.

Si bien falta mucho por entender acerca de las vías de entrada a los NSQ, es mucho lo que sabemos en comparación con el conocimiento que tenemos de las vías de salida. Al igual que en las vías de entrada, podemos encontrar tanto salidas humorales como neurales. Con relación a la inervación aferente, la inervación eferente de los NSQ es bastante más compleja ya que son muchas las áreas cerebrales que reciben aferencias de ellos (figura 2.9B). Entre otras podemos nombrar la zona subparaventricular (SPV), área preóptica, área retroquiasmática, núcleo dorsomedial del hipotálamo, septum lateral, el núcleo de la estría terminal, los núcleos paraventriculares hipotalámicos (NPV), el PVT, la IGL y la sustancia gris

mesencefálica. Dado que en proporción a la cantidad de variables reguladas por los NSQ las vías de salida son pocas, se ha propuesto que los núcleos inervados por ellos funcionarían como estaciones de relevo transmitiendo en forma divergente la información con la fase del oscilador central. Un claro ejemplo de esto sería la glándula pineal, que es inervada indirectamente por los NSQ. Este sistema se origina en los NSQ y pasa por la SPV, el PVT, la columna intermedio lateral de los segmentos cervicales de la médula espinal y el ganglio cervical superior. Las fibras noradrenérgicas de éste último regulan las enzimas limitantes de la síntesis de melatonina en el pinealocito. De esta forma, por medio de la liberación de melatonina, los NSQ podrían controlar todas las variables que son blanco de esta hormona. Los NSQ también proyectan hacia neuronas liberadoras de la hormona de crecimiento (GRH), hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) y a neuronas que contienen receptores nucleares para estrógeno, modulando de esta manera el ciclo reproductivo en las hembras y la producción de testosterona en los machos (Watts *et al.* 1989; de la Iglesia *et al.* 1995; Van der Beek *et al.* 1997; de la Iglesia *et al.* 2003). Asimismo, proyecta hacia grupos celulares en los núcleos paraventriculares del hipotálamo que son activados por el estrés, modulando la respuesta de glucocorticoides, a neuronas dopaminérgicas implicadas en la regulación de la liberación de prolactina en la región tuberoinfundibular, a neuronas que proyectan a los sistemas autonómicos simpático y parasimpático (controlando la actividad de adrenales, páncreas, y del hígado, ovarios y otros órganos) y a neuronas magnocelulares involucradas en la secreción neurohipofisiaria de hormonas.

De este modo, se pueden separar las proyecciones de los NSQ en cuatro tipos diferentes: conexiones directas con neuronas neuroendócrinas, directas con neuronas autonómicas que transmiten la señal del reloj a los distintos órganos, con estructuras

hipotalámicas que se encuentran entre el reloj y el PVN, y áreas fuera del hipotálamo que sincronizan comportamientos no controlados por el hipotálamo, tales como la actividad locomotora.

La vía de salida humoral tampoco es bien conocida y se han caracterizado unas pocas moléculas señalizadoras producidas y liberadas por los NSQ, entre las que se encuentran angiotensina II, vasopresina, hormona liberadora de tirotrófina (TRH), AVP, NO, CO, BDNF, TGF β y prokineticina II. Comprender cómo se acoplan los NSQ con el resto de los osciladores endógenos y con las variables que controla es claramente una cuenta pendiente en la cronobiología. El estudio de este acoplamiento permitirá sin ninguna duda comprender en forma cabal cuál es la importancia evolutiva del sistema circadiano y nos brindará seguramente la posibilidad de entender y tratar patologías asociadas a desordenes circadianos.

2.3. Ritmos en el sistema inmune.

En esta última década el campo de la neuroinmunoendocrinología creció con un ritmo vertiginoso y lo mismo ocurrió con la comprensión de los relojes biológicos, fundamentalmente en sus aspectos moleculares. Teniendo en cuenta que el sistema circadiano es el responsable de la sincronización temporal de los procesos fisiológicos en general, no es descabellado pensar que puede llegar a controlar o modular a los sistemas nervioso, inmune y endócrino. Basta pensar en el ciclo de sueño y vigilia para poner en evidencia el rol del sistema circadiano sobre el sistema nervioso, o en el ritmo diario de corticosterona para comprobar la modulación que ejerce sobre el sistema endócrino. ¿Pero qué pasa con el sistema inmune? ¿Existen ritmos diarios o circadianos en el sistema inmunológico?

Analizando la presencia de ritmos diarios en el número de células inmunes, tanto en humanos como en roedores nocturnos, se observa que los resultados varían notablemente de acuerdo al tejido en el cual se hace el recuento, encontrándose variaciones bien definidas en la sangre y poco definidas en otros tejidos. A su vez, si se estudian tipos celulares muy generales (por ejemplo leucocitos totales) en lugar de hacer estudios más específicos (como linfocitos T), los resultados suelen ser bastante contradictorios. Es importante aclarar que estas contradicciones podrían ser consecuencia de las diferentes metodologías empleadas, las distintas especies animales utilizadas o de la existencia de variaciones estacionales descritas para la actividad inmunológica (Haus *et al.* 1997). Los linfocitos T totales, los T helper, los B y los granulocitos eosinófilos y basófilos coinciden en presentarse en mayor número durante la noche, y los linfocitos NK y los neutrófilos durante el día; pero existen datos contradictorios para linfocitos T supresores/citotóxicos y monocitos (Harkness *et al.* 1982; Levi *et al.* 1988; Born *et al.* 1997; Suzuki *et al.* 1997). En roedores nocturnos, algunos parámetros como los linfocitos T totales, los B y los granulocitos presentan ritmos opuestos a los hallados en humanos (Brown y Dougherty 1956; Abo *et al.* 1981; Kawate *et al.* 1981), lo que sugiere alguna relación entre el estado de actividad o reposo y la capacidad de respuesta del sistema inmune.

La información que da el conteo de células inmunes es insuficiente si se pretende tener un panorama de lo que está ocurriendo a nivel fisiológico. No es lo mismo tener una gran cantidad de linfocitos activos que inactivos. Esta es la razón por la cual resulta necesario estudiar la existencia de variaciones diarias en la actividad celular. Para medir esto se estudia la producción y liberación de citoquinas, la actividad fagocítica y otras variables relacionadas con los procesos inflamatorios. Las interleuquinas 1, 6, 10 y 12, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y el interferon

gamma (IFN γ) son las que presentan ritmos diarios más definidos en cuanto a su fase, con una mayor concentración plasmática durante la noche en el humano (Moldofsky 1995; Entzian *et al.* 1996; Petrovsky y Harrison 1997). Por el lado de la fagocitosis, varios trabajos indican una mayor actividad en la fase de reposo, aunque existen datos contradictorios al respecto (Szabo *et al.* 1978; Bongrand *et al.* 1988). La actividad del factor nuclear kappa B (NF- κ B), un factor de transcripción responsable de la inducción de genes fundamentales en los procesos inflamatorios, presenta en el bazo de roedores nocturnos una variación diaria con máximos durante la mañana (fase de reposo) (Chuang *et al.* 1996). Dado que los linfocitos se encuentran en grandes cantidades en el bazo, se puede decir entonces que en este órgano existe una mayor actividad linfocitaria durante la noche. Por otra parte, los ritmos en los niveles de la producción y actividad de factores inmunes correlacionan con las variaciones temporales en sus efectos.

Al revisar estos ejemplos de ritmos circadianos en el sistema inmune podemos decir que, si bien existen algunas contradicciones, la mayoría de las células involucradas en los procesos inflamatorios se encuentran en mayor número y están más activas durante la noche en humanos y durante el día en roedores nocturnos, coincidiendo esto con las respectivas fases de reposo.

Si el sistema inmune presenta ritmos circadianos, entonces tiene que existir un oscilador que los controle. Sabemos que los NSQ son los osciladores principales en mamíferos y, por lo tanto, son los primeros candidatos como responsables de la oscilación de los parámetros inmunes. Pero hasta el momento no existen trabajos que hayan analizado claramente la relación entre los NSQ y el sistema inmune. Hasta el momento el trabajo más claro al respecto, es el de Depres-Brummer y Bourin quienes demostraron que los ritmos circadianos de leucocitos circulantes y en el número de

linfocitos se mantiene en condiciones de LL en las que la mayoría de los ritmos comportamentales y hormonales desaparecen (Depres-Brummer *et al.* 1997). No está claro qué sucede con el sistema inmune cuando se lesionan los NSQ, aunque aparentemente algunos ritmos se mantienen en médula ósea aun después de las lesiones. Tampoco fue estudiado el sistema inmune en animales mutantes con alteraciones en el sistema circadiano ni los sistemas circadianos de animales con alteraciones en el sistema inmunológico, como por ejemplo ratones atímicos o deficientes en la síntesis de citoquinas proinflamatorias o de sus receptores. Llegado este punto, es interesante destacar que se han descrito variaciones diarias en la expresión de *hPer1* en células mononucleares de sangre periférica en humanos (Takata *et al.* 2002). En estas células se observó mayor expresión de *hPer1* por la mañana que por la noche y no se encontraron variaciones en la expresión de *hClock*. Esto sugiere que los monocitos podrían ser considerados como osciladores periféricos.

Las células inmunes tienen receptores para la mayoría de las hormonas que, como sabemos, poseen variaciones circadianas. En algunos casos es posible correlacionar temporalmente a estos mensajeros con los ritmos circadianos inmunes. Dado que animales adrenalectomizados pierden los ritmos de linfocitos y neutrófilos en plasma (Brown y Dougherty 1956) es posible suponer que los glucocorticoides sean los responsables de algunas de las variaciones diarias en el sistema inmune. Sin embargo, existen evidencias que sugieren que dicha modulación no es pareja para todos los parámetros inmunes. Al analizar los ritmos en función de la actividad se observó que el cortisol inyectado a las 21 h inhibe el pico nocturno de $IFN\gamma$ y $TNF\alpha$ pero no el de IL-6 e IL-10 (Petrovsky y Harrison 1997), y la privación de sueño induce un incremento en la producción de IL-1 e IL-2, así como una disminución de

la actividad de las células NK, independientemente del ritmo circadiano del cortisol (Moldofsky *et al.* 1989). Es decir que otros sistemas podrían llegar a "ganarle" a la modulación adrenal en algún tipo de influencia.

Las células con máximas concentraciones plasmáticas en la fase diurna expresan más receptores adrenérgicos que colinérgicos, y éstos a su vez se expresan más en las células con máximas concentraciones plasmáticas nocturnas. Los sistemas adrenérgico y colinérgico utilizados por el sistema nervioso autónomo para regular la homeostasis podrían modular las variaciones circadianas de estos grupos celulares. De hecho, luego del ejercicio físico, que aumenta la liberación de catecolaminas, se incrementa principalmente el número de los tipos celulares diurnos (Suzuki *et al.* 1997). También existen algunas evidencias que sugieren que la Prolactina (PRL), un importante inductor de los fenómenos inmunológicos, podría ser uno de los intermediarios buscados, ya que el aumento de la misma incrementa respuestas a antígenos sólo en la fase diurna, mientras que su depleción disminuye esas respuestas durante la misma fase, sin registrar cambios en otros horarios (Cincotta *et al.* 1995).

Respecto a los esteroides sexuales, no se han encontrado hasta el momento evidencias que permitan vincularlos estrechamente a los ritmos circadianos inmunes, hecho que sí ocurrió con la melatonina (Cardinali *et al.* 1999). Las evidencias para encontrar un "culpable" de la ritmicidad circadiana inmune son por lo tanto múltiples, en función de la diversidad de factores hallados que pueden modular estos ritmos.

El ciclo sueño/vigilia también influye sobre los ritmos del sistema inmune. La privación del sueño incrementa la producción de IL-1 e IL-2, y disminuye la actividad de las células NK (Moldofsky *et al.* 1989). Inclusive, si hacemos dormir individuos desde las 23 h hasta las 02:30 h, luego de despertarlos presentan menor producción de TNF- α e IL-1; en cambio, si los hacemos dormir desde las 3 h hasta las

06:30 h, luego de ser despertados presentan mayor producción de IL-2, indicando un efecto diferencial dependiente del horario (Uthgenannt *et al.* 1995). Algunos autores postulan que estos cambios son en realidad adelantos y retrasos de fase de los ritmos circadianos de las citoquinas (Born *et al.* 1997).

Hay muchas patologías en las cuales el sistema inmunológico es un partícipe necesario, es decir que, aunque no sea el único responsable de su origen, por lo menos colabora en el desarrollo de la enfermedad. Una de ellas es el asma, una patología inflamatoria de las vías aéreas en la que una población importante de pacientes presenta mayor frecuencia de crisis durante la noche. Numerosos estudios comprobaron una estrecha relación de los síntomas con una mayor concentración de algunos tipos celulares, como por ejemplo de eosinófilos, de citoquinas (IL-1 entre otras) y de moléculas de adhesión (Mackay *et al.* 1994; Kraft *et al.* 1996). También el síndrome de Apnea Obstructiva del Sueño presenta modificaciones en el ritmo circadiano de secreción de citoquinas (Entzian *et al.* 1996).

Dentro de las enfermedades reumatológicas, caracterizadas todas por inflamaciones crónicas de articulaciones y tejidos blandos, encontramos que los pacientes con artritis reumatoidea presentan mayor rigidez y dolores articulares en la mañana al despertarse. Este aumento en el dolor y la rigidez correlaciona con modificaciones de los ritmos circadianos de algunos parámetros inmunológicos, como por ejemplo la mayor amplitud del ritmo de concentración plasmática de IL-6 con máximos en la mañana (Harkness *et al.* 1982; Crofford *et al.* 1997). También resulta de gran utilidad tener en cuenta a los ritmos circadianos en la activación de respuestas inmunes con fines preventivos o terapéuticos (inmunizaciones). Inyectando antígenos a distintos momentos del día es posible analizar diferencias en su efecto dependiendo del momento de administración. De hecho, se ha encontrado mayor producción de

anticuerpos en pacientes vacunados al mediodía contra el virus Influenza, así como mayores reacciones adversas locales en una segunda dosis inyectada al año siguiente, en horas de la tarde (Langlois *et al.* 1995). Resultados similares se obtienen al activar fisiológicamente el sistema inmune estimulando la mucosa bronquial (Gervais *et al.* 1977).

Por último, no podemos dejar de mencionar el ritmo circadiano de temperatura, de indudable importancia clínica ¿Podría ser modulada esta variación térmica por el ritmo circadiano de citoquinas? Sabemos que ratas transgénicas con déficit de IL-1 o IL-6 mantienen el ritmo circadiano de temperatura normal (Kozak *et al.* 1995), 1997) lo que nos sugiere que a niveles basales estas citoquinas no modularían la variable, pero si se inyecta IL-1 en roedores en distintos momentos del día, la temperatura aumenta observándose un mayor aumento durante la fase de luz (Opp y Toth 1998).

En definitiva, en cuanto a la presencia de ritmos en el sistema inmune, ya no existen demasiadas dudas de que existen muchos parámetros inmunológicos con variación circadiana, aunque por supuesto hay que estudiarlas con mayor profundidad y fundamentalmente aclarar algunos datos contradictorios. Queda aún por determinar cuál es la causa de estas variaciones y esto lleva necesariamente al estudio de la interacción entre los núcleos supraquiasmáticos, el sistema inmune y el sistema endócrino. Si bien en general las variaciones descritas en el sistema inmune se encuentran en antifase con las de los glucocorticoides, esto no es cierto para todos los parámetros estudiados y, por lo tanto, el origen de los ritmos inmunológicos no se puede atribuir en forma exclusiva al efecto inmunosupresor de los glucocorticoides. El conocimiento de la existencia de ritmos en el sistema inmunológico nos genera

nuevas intrigas. Conocer quién los genera nos aporta una mayor comprensión de las relaciones del sistema inmune con otros sistemas del organismo.

2.4. Sistema neuroinmune.

2.4.1. Otro poco más de historia (bastante reciente).

Si bien existen numerosas evidencias en la vida cotidiana y en la cultura popular acerca de la interacción entre el sistema nervioso central (SNC) y el sistema inmunológico, no fue sino hasta mediados de la década de 1970 que este tema tomó relevancia en el ámbito científico. El sistema inmunológico tiene una función muy clara de respuesta del organismo frente a agentes nocivos y el sistema nervioso tiene un rol también muy claro de manejo de información y de control de funciones orgánicas (esqueléticas y viscerales). ¿Por qué no habríamos de imaginar una interconexión entre ambos sistemas?

Para comenzar debemos comprender que de acuerdo a una gran cantidad de trabajos realizados en el transcurso de las tres últimas décadas (y a lo que decían nuestras abuelas), los comportamientos asociados a la enfermedad no resultan de una depresión inespecífica del comportamiento sino que son, de acuerdo a lo dicho por Hart, *“una estrategia altamente organizada que puede resultar crítica para la supervivencia de un individuo en estado salvaje”* (Hart 1988). La fiebre, que se produce en general cuando el sistema inmune reacciona contra algún agente infeccioso, fue reconocida ya en el antiguo Egipto como un proceso benéfico de curación. La misma idea existía en la antigua Grecia y en los imperios Romano y Persa y, de hecho, se mantuvo hasta tiempos modernos en los que la “terapia de fiebre” se introdujo para tratar enfermedades tales como artritis reumatoidea, depresión maníaca, migrañas, neurosífilis, herpes zoster y desórdenes de piel y ojos.

Inicialmente la terapia de fiebre se realizaba mediante la administración de microorganismos gram negativos hasta que en 1933 Boivin pudo purificar el material endotóxico de las bacterias. Luego de ser probadas en animales, las endotoxinas fueron utilizadas en humanos para inducir respuestas febriles terapéuticas que se utilizaron por primera vez en el tratamiento de neurosífilis en 1942.

Dado que la temperatura corporal es regulada por el SNC (en ciertos núcleos hipotalámicos) y que esta regulación se ve alterada cuando el sistema inmune se activa resulta claro que, al activarse, el sistema inmunológico envía señales al SNC y éste responde cambiando los parámetros de regulación de la temperatura corporal dando lugar al proceso febril o a la hipotermia. Si bien éste es uno de los ejemplos más evidentes de interacción neuroinmune, está lejos de ser el único. A fines del siglo XIX se observó que las enfermedades infecciosas iban acompañadas de glucosuria. A esto le siguió la observación de hiperglucemia, resistencia a insulina, la detección de pirógenos endógenos y la identificación de un mediador endógeno derivado de leucocitos al que se llamó LEM (del inglés *leukocyte-derived endogenous mediator*). LEM era capaz de inducir un grupo de proteínas hepáticas conocido como factores de fase aguda y se demostró que los pirógenos endógenos son capaces de inducir la liberación de ACTH. Ya en 1975 estaba claro que las enfermedades infecciosas generan una respuesta neuroendócrina que involucra a los glucocorticoides, mineralocorticoides, insulina, glucagón, hormona de crecimiento y grandes cambios metabólicos (Beisel 1975). Los experimentos del grupo de Besedovsky a principios de la década de 1980 mostraron que algunos mediadores inmunes son capaces de inducir la liberación de glucocorticoides en ratas (Besedovsky *et al.* 1981) y Healy y colaboradores demostraron que la timosina produce la liberación de ACTH (Healy *et al.* 1983). Al mismo tiempo se demostró que la citoquina IL-1 es una de las

principales responsables de la inducción del proceso febril. Todo esto llevó a Berczi a postular en 1986 a IL-1 como uno de los factores inmunes capaces de actuar sobre la hipófisis, lo que fue demostrado posteriormente por varios laboratorios (Berczi 1986; Berkenbosch *et al.* 1987; Bernton *et al.* 1987; Sapolsky *et al.* 1987).

Muchos otros puntos de interacción fueron demostrados en ambas direcciones en las décadas siguientes, incluyendo la síntesis de neurotransmisores y sus receptores en muchas de las células inmunes, la síntesis de citoquinas pro y antiinflamatorias y de sus receptores en el SNC (tanto por parte de células de la glía como en neuronas) y la participación de variables inmunológicas en patologías neurológicas tales como depresión, enfermedades neurodegenerativas y desórdenes del sueño. Todo esto llevó a muchos investigadores a considerar que las diferencias entre los sistemas inmune y nervioso son en realidad menos que las semejanzas y que podría considerarse al sistema inmune como un “sentido” más, cuya función principal es la de “sentir” cuerpos extraños e informar al SNC acerca de dicha presencia.

Cuando el SNC detecta un proceso infeccioso, inicia una respuesta coordinada que involucra cambios comportamentales, metabólicos y endócrinos con el objeto de retornar a un estado normal (lo cual puede entenderse como un fenómeno de homeostasis reactiva) y recuperar la salud del organismo. Dentro de dichos cambios comportamentales, se encuentran la disminución de la ingesta, aislamiento social, comportamiento letárgico, disminución de la libido, disminución de la actividad exploratoria y alteraciones en el ciclo sueño-vigilia entre otros. A esta serie de cambios se los denomina colectivamente *sickness behavior* (traducible como comportamiento de enfermedad) y son mediados principalmente por la acción dentro del SNC de IL-1, IL-6 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Dantzer *et al.* 1998; Dantzer *et al.* 1999; Bluthé *et al.* 2000a; Bluthé *et al.* 2000b; Dantzer 2001).

Resulta de interés destacar, en este caso, el efecto de las infecciones sobre el ciclo sueño-vigilia, dado que es éste el más evidente ritmo diario y circadiano que podemos encontrar en la naturaleza (Richardson *et al.* 1985; Ebihara *et al.* 2003). Si bien el efecto varía entre las distintas especies (incluso entre distintas cepas de una misma especie) y de acuerdo al patógeno y la vía de infección, en general se observa una disminución del sueño REM y un aumento del sueño NREM (Toth *et al.* 1993; Fang *et al.* 1995; Toth y Opp 2001; Alt *et al.* 2003). Muchos de los cambios del ciclo sueño-vigilia inducidos por infecciones se observan también como consecuencia de la administración central o periférica de citoquinas pro inflamatorias (Shoham *et al.* 1987; Takahashi *et al.* 1999; Hogan *et al.* 2003) o de LPS (Krueger *et al.* 1986; Lancel *et al.* 1995; Schiffelholz y Lancel 2001).

El efecto de las citoquinas proinflamatorias y el LPS depende claramente de la hora de administración (figura 2.10) y esto vale para los efectos sobre la regulación de la temperatura, el ciclo sueño-vigilia, respuesta inmunológica y letalidad, entre otros (Halberg *et al.* 1960; Opp *et al.* 1991; Hrushesky *et al.* 1994; Toth y Krueger 1995; Lancel *et al.* 1996; Opp y Toth 1998; Morrow y Opp 2005). Esta dependencia podría ser consecuencia de la variación circadiana de hormonas de conocido efecto inmunomodulador tales como los glucocorticoides o la melatonina. En roedores en condiciones de laboratorio, los glucocorticoides presentan un máximo en su concentración plasmática al comenzar el período de actividad (noche) y un mínimo durante el período de reposo (día) (Magarinos *et al.* 1988; Griffin y Whitacre 1991) y, dado que los glucocorticoides afectan la síntesis de citoquinas (Goujon *et al.* 1996; Pezeshki *et al.* 1996; Mustafa *et al.* 1999); es probable que se encuentren involucrados en la variación diaria de mRNA de IL-1 y TNF (Bredow *et al.* 1997; Taishi *et al.* 1997) y en la variación diaria de la respuesta inmunológica en general.

La melatonina ha sido propuesta como hormona inmunomoduladora por numerosos autores (Arzt *et al.* 1988; Chuang *et al.* 1996; Zhang *et al.* 1997) y se ha postulado que su efecto supresor depende de la inhibición de la activación del factor de transcripción NF- κ B (Chuang *et al.* 1996). Si bien existe cierta controversia acerca de los niveles de melatonina endógena en ratones C57BL/6J y se la llegó a catalogar como una cepa carente de niveles detectables de melatonina (Ebihara *et al.* 1986; Goto *et al.* 1989), existen trabajos que muestran en estos ratones un pico de melatonina a ZT 19 (Conti y Maestroni 1998; Vivien-Roels *et al.* 1998). Las variaciones diarias en los niveles plasmáticos de melatonina permiten suponer que ésta podría ser responsable de algunas de las diferencias en el efecto de desafíos inmunológicos en función de la hora de administración.

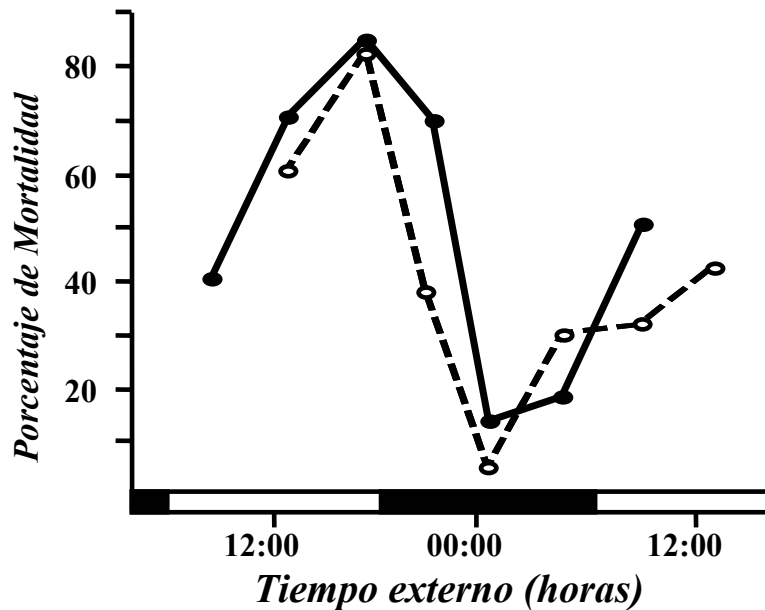


Figura 2.10. Ritmo diario de letalidad inducida por dosis altas de LPS.

Experimento presentado por Halberg en 1960 y parte de uno de los trabajos fundacionales de la cronobiología como área reconocida dentro del ámbito científico. La administración de dosis letales de LPS, producen una mortalidad del 80% cuando el LPS es administrado durante la tarde, pero se reduce a un escaso 10% si el LPS se administra hacia la mitad de la noche. Dado que la respuesta al LPS es principalmente de tipo inmunológica, este resultado sugiere una fuerte interrelación entre el sistema circadiano y el inmune. (Modificado de Halberg, 1960).

2.4.2. Citoquinas

Como se mencionó anteriormente, los diversos componentes celulares del sistema inmune se comunican entre sí y con otros sistemas principalmente mediante la síntesis y liberación de proteínas y glicoproteínas comúnmente conocidas como citoquinas. Las citoquinas pueden dividirse en principio en dos grandes grupos, por un lado las citoquinas pro-inflamatorias (IL-1, TNF- α , IL-6, IL-8 entre otras) y por otro las anti-inflamatorias (IL-4, IL-10, IL-1Ra, factor inhibitorio de leucemia (LIF) y el inhibidor de la síntesis de TNF entre otras). También se las puede subdividir más adecuadamente en familias de acuerdo a su homología de secuencia y estructura y el tipo de receptores utilizados (tabla 2.3). De acuerdo a esta última clasificación encontramos 7 familias principales de citoquinas, la familia IFN/IL-10 (IFN- α/β , IFN γ e IL-10), la familia Gp130 (IL-6, IL-11, OSM, LIF, CNTF y CT-1), la familia γ C/IL-2 (IL-2, -4, -7, -9, -13, -15 y -21), la familia IL-12 (IL-12, -23 y -27), la familia TGF- β , la familia IL-1 (IL-1 α , -1 β , IL-1Ra e IL-18) y la familia TNF (TNF α , TNF β y otros 18 miembros). La evidente complejidad de las citoquinas nos obliga a centrarnos en aquellas conocidas como “citoquinas proinflamatorias maestras” que son TNF α e IL-1.

La familia de TNF está compuesta por un total de 20 miembros de los cuales pocos han sido estudiados en profundidad. Son proteínas de membrana de tipo II que pueden actuar ancladas a membrana o como citoquinas libres luego de sufrir proteólisis. En particular TNF- α (o caquectina) y β (o linfotoxina) han sido los únicos miembros de la familia estudiadas en el SNC con cierto detalle. TNF- α es una citoquina pleiotrópica definida originalmente sobre la base de su capacidad de inducir necrosis hemorrágicas en transplantes tumorales y por su citotoxicidad selectiva hacia

Tabla 2.3. Principales citoquinas y sus efectos.

Citoquina	Peso	Efectos principales
Familia IFN/IL-10		
IFN α	18-20	Inhiben replicación viral y crecimiento tumoral. Modulan producción de anticuerpos. Disminuye expresión de genes reloj.
IFN β	20	
IFN γ	20-25	Promueve migración de macrófagos, estimula proliferación y diferenciación de linfocitos B. Modifica el ritmo de actividad eléctrica en NSQ (junto a LPS e IL-1)
Familia Gp 130		
IL-6	23-30	Es pirogénica, aumenta la producción de anticuerpos y de proteínas de respuesta de fase aguda. Induce la expresión de <i>mPer in vitro</i> .
IL-11	24	Proinflamatoria, induce producción de anticuerpos.
LIF		Activa el sistema neuroendócrino.
OSM		
CNTF		
CT-1		
Familia γC/IL-2		
IL-2	14-15	Proinflamatoria. Induce proliferación y diferenciación de linfocitos T y B.
IL-4	20	Proinflamatoria, produce el cambio de Th a Th2.
IL-7	25	Maduración y proliferación de pre y proB y de timocitos inmaduros.
IL-9	30-40	Induce proliferación de linfocitos T y maduración de mastocitos
IL-13	10	Induce liberación de IgE.
IL-15	14-15	Estimulación y diferenciación de células NK.
IL-21		
Familia IL-12		
IL-12	75	Induce a células NK a liberar IFN γ . Produce cambio de Th a Th1. Antagoniza algunos efectos de IL-4.
IL-23		
Familia TGF		
TGF α	5-20	Induce crecimiento tumoral y angiogénesis. Vinculado a la salida de sistema circadiano.
TGF β	25	Antiinflamatorio, induce cicatrización y angiogénesis.
Familia IL-1		
IL-1 α	15-17	Proinflamatorias, pirogénicas. Induce sueño, anorexia, induce liberación de IL-6 y TNF α . Cambios en la actividad eléctrica de NSQ.
IL-1 β	15-17	
IL-18	?	Similar a IL-1, induce liberación de IFN γ .
IL-1ra	17	Antiinflamatoria. Antagonista endógeno de IL-1.
Familia TNF		
TNF α	17	Proinflamatoria, pirogénica. Induce liberación de IL-1 e IFN γ . Citotóxica
TNF β	25	Proinflamatoria, citotóxica.

Dado que los efectos de algunas citoquinas son extremadamente complejos sólo se detallan los más importantes de las citoquinas con efectos bien definidos. Abreviaturas: CNTF, factor neurotrófico ciliar; CT-1, cardiotrofina 1; IFN, interferón, IL, interleuquina: IL-1ra, antagonista del receptor de IL-1; IgE, inmunoglobulinas de tipo E; LIF, factor inhibitorio de leucemia; NK, células asesinas; OSM, oncostatina M; Th, linfocitos T colaboradores; Th1, linfocitos T colaboradores de tipo 1; TNF factor de necrosis tumoral.

células transformadas (Carswell *et al.* 1975). Actualmente se lo conoce como un factor pro inflamatorio cuya función principal es la de organizar la cascada de eventos implicados en el control apropiado de procesos infecciosos/inflamatorios y de inmunidad en general. Es expresado como una proteína transmembrana de 26 kDa que puede ser clivada por la enzima TNF convertasa (TACE/ADAM17). Puede ser liberado en respuesta a estímulos inmunogénicos por una gran variedad de células que incluye neutrófilos, monocitos activados/macrófagos y otras células mieloides y derivadas de epitelio. En el sistema nervioso central se ha demostrado su síntesis en microglía, astrocitos, células de las meninges, neuronas y células mieloides fagocíticas (Allan *et al.* 2001; Stoll *et al.* 2002; Conti *et al.* 2004).

Entre las respuestas inducidas por el TNF- α podemos mencionar shock séptico, pérdida de peso (caquexia), fiebre, náuseas, fatiga, aumento de glucocorticoides y catecolaminas plasmáticos, cambios en la actividad electroencefalográfica y de la actividad de nervios simpáticos, desórdenes alimentarios y del metabolismo de macronutrientes. Todas estas respuestas dependen del SNC.

Existen dos tipos de receptores de TNF- α (TNFR1 y 2), de los cuales TNFR1 es el responsable de la mayor parte de las respuestas biológicas inducidas por TNF α (revisado en (Chen y Goeddel 2002). Como se puede ver en la figura 2.11A, una vez unido al ligando, TNFR1 induce la expresión de genes blanco por medio de la activación del factor de transcripción NF- κ B y también por medio de la activación de las kinasas JANUS (JAKs). La activación del receptor puede llevar en algunos casos a la unión de la proteína de dominio de muerte asociada a FAS (FADD) que es una proteína adaptadora para la unión a caspasa 8. Una vez activada, la caspasa 8 amplifica una vía que determina la entrada en apoptosis. Además existe un receptor

soluble de TNF que es liberado al medio extracelular y que es incapaz de transducir señales en respuesta al LPS (Wallach *et al.* 1999).

IL-1 es otra de las principales citoquinas proinflamatorias que se liberan en respuesta al LPS. Existen dos variantes de IL-1, la α y la β , que comparten una baja homología de secuencia (aproximadamente 20 % en humanos) pero una alta homología en sus estructuras secundaria y terciaria. Ambas variantes son sintetizadas como un precursor de 31 kDa que es procesado a un péptido de 17 kDa por la enzima convertidora de interleuquinas/caspasa1 (ICE del inglés *interleukin converting enzyme*). Ambas variantes se unen con alta afinidad a los receptores de IL-1, de los cuales existen dos tipos, el IL-1RI y el IL-1RII. Los receptores de tipo IL-1RII no son capaces de transducir señales al medio intracelular aún cuando se encuentran unidos a IL-1 y se consideran como señuelos. Por este motivo, la mayor parte de los efectos biológicos de IL-1 se atribuyen a su unión con el receptor de tipo IL-1RI. Una vez unido a IL-1 (figura 2.11B), el receptor se une a una proteína accesoria (IL-1RAcP) y por medio de la unión a ,y activación de, proteínas quinasas activa a NF- κ B (revisado en (Alheim y Bartfai 1998).

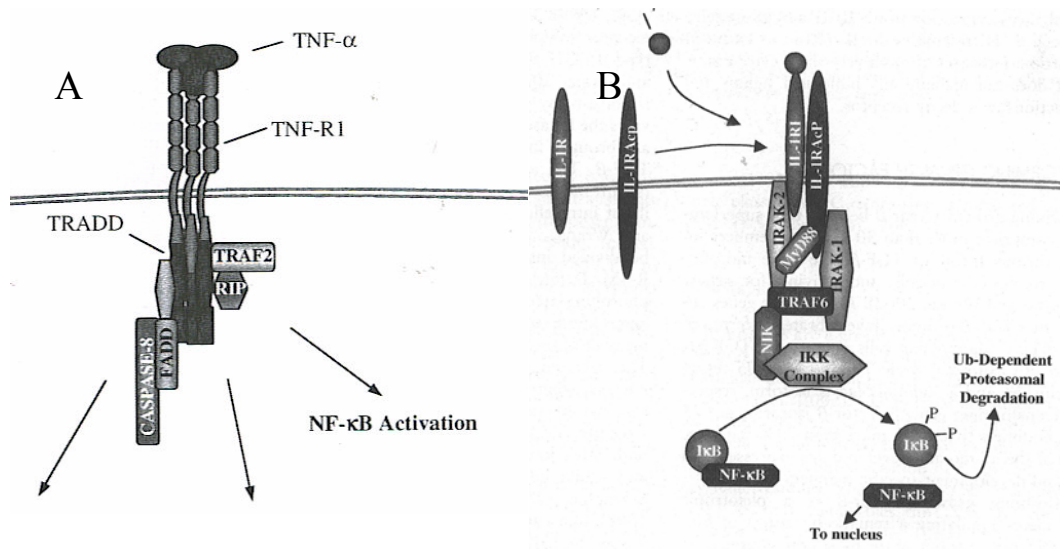


Figura 2.11. Mecanismos de señalización de IL-1 y TNF.

A) Sistema de señalización mediada por el receptor de TNF. B) Sistema de señalización mediado por el receptor de IL-1.

Dentro de esta misma familia existe una citoquina denominada antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra) que es capaz de unirse a los receptores de tipo I y II pero es incapaz de generar una señal en estos receptores y hasta el momento no se ha encontrado ningún otro receptor al que se pueda unir y generar una cascada de señalización. Por este motivo se lo considera como un antagonista endógeno de IL-1 y se postula que cumple una función de control sobre la respuesta inmune (Allan y Rothwell 2001).

2.4.3. Vías de comunicación entre sistema nervioso central y sistema inmune.

Las vías de comunicación entre el SNC y el sistema inmune son diversas y durante mucho tiempo se ha discutido intensamente acerca de cuál de ellas es de mayor importancia. Junto con las primeras evidencias de la interacción entre los sistemas inmune y nervioso aumentó el conocimiento de la estructura y propiedades bioquímicas de las citoquinas. Luego de un período en el cual se creyó que la activación inmunológica producía la liberación de citoquinas que además de actuar

sobre blancos inmunológicos podían llegar directamente a las células del SNC, se hizo evidente que las citoquinas no podrían atravesar fácilmente la barrera hematoencefálica.

Se postularon entonces cuatro vías posibles por medio de las cuales el sistema inmune puede enviar señales al SNC:

Acción sobre el endotelio cerebral. Las citoquinas y el LPS podrían actuar sobre el endotelio vascular del SNC y estas células endoteliales responder liberando dentro del cerebro moléculas tales como prostaglandinas, NO, citoquinas pro y antiinflamatorias, neurotransmisores, etc.

Transporte a través de la barrera. Las citoquinas y el LPS podrían atravesar la barrera hematoencefálica mediante transporte facilitado. Esto requiere de la presencia de transportadores saturables en las células endoteliales cerebrales.

Entrada directa. Los órganos sensoriales circumventriculares (CVOs) y algunas otras áreas presentan un endotelio fenestrado generando una barrera menos selectiva. En estas zonas, las citoquinas y el LPS podrían ingresar directamente.

Vía nerviosa. Por último existen terminales nerviosas en los tejidos periféricos capaces de activarse en respuesta a la presencia de citoquinas y de esta forma informar al SNC cuando ocurre una infección en la periferia. Dos ejemplos de esta última vía son las ramas aferentes del nervio vago y del nervio glosofaríngeo (Maier *et al.* 1998; Simons *et al.* 1998; Romeo *et al.* 2001).

Existen numerosos trabajos que muestran evidencias para los cuatro mecanismos propuestos y es probable que todas estas formas de comunicación sean funcionales dependiendo del modelo y la severidad de la reacción inflamatoria. Sin embargo, se acepta generalmente que, en modelos de inflamación baja o moderada, las citoquinas periféricas y el LPS inyectado en forma sistémica no son capaces de

actuar directamente sobre el parénquima del SNC sino que deben actuar por medio de la activación del endotelio cerebral o mediante la activación de nervios periféricos (Blatteis 1992). En estos casos la tasa de entrada de las citoquinas o el LPS es extremadamente baja como para tener efecto. En caso de reacciones severas, las altas concentraciones plasmáticas de citoquinas y LPS pueden producir una disrupción de la barrera hematoencefálica (Lustig *et al.* 1992; Persidsky *et al.* 1997; Dyatlov *et al.* 1998) que podría aumentar su tasa de entrada al SNC y hacer posible un efecto directo sobre neuronas y células de la glía. Sin embargo, a pesar del evidente aumento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica no está nada claro hasta el momento si el LPS y las citoquinas proinflamatorias pueden llegar fácilmente al parénquima cerebral profundo, ya que en experimentos con citoquinas y LPS marcados radiactivamente no se ha detectado radiactividad dentro del SNC luego de su administración periférica (Singh y Jiang 2004).

La vía inversa de interacción, desde el SNC hacia el sistema inmunológico, involucra la liberación de hormonas a nivel hipotalámico e hipofisario y el control directo por vías simpáticas y parasimpáticas. Existe en la actualidad un gran número de trabajos en los que se define inequívocamente la inervación simpática y parasimpática del timo y del bazo y su función inmunomoduladora (Tollefson y Bulloch 1990).

2.4.4. Citoquinas en el sistema nervioso central.

Cuando se hizo evidente que los cambios comportamentales y neuroendócrinos asociados a los procesos infecciosos están mediados por la acción de citoquinas, inmediatamente se pensó que debían existir receptores para las mismas en SNC. Los receptores se encontraron pero, dado que las citoquinas difícilmente

podrían atravesar la barrera hematoencefálica, la explicación más coherente para la presencia de los receptores de citoquinas en el SNC fue la síntesis central de estas moléculas. En la actualidad la síntesis de citoquinas por parte de células del sistema nervioso es aceptada en forma generalizada. Sin embargo, el rol de las citoquinas centrales está aún lejos de ser comprendido.

Resulta ahora muy claro que el sistema inmunológico se comunica con el sistema nervioso central, pero es difícil entender por qué el SNC utiliza los mismos mensajeros que el sistema inmune. Una vez que la información llega al endotelio cerebral o a las terminales nerviosas periféricas, podría ser conducida por las vías canónicas de la comunicación nerviosa; sin embargo, en muchos de los modelos de inflamación se observa que en respuesta al proceso inflamatorio se induce la síntesis de citoquinas en diversas áreas del cerebro, principal pero no exclusivamente, en los órganos sensoriales circumventriculares (CVOs) (Breder *et al.* 1994; Quan *et al.* 1997; Vallieres y Rivest 1997; Nadeau y Rivest 1999).

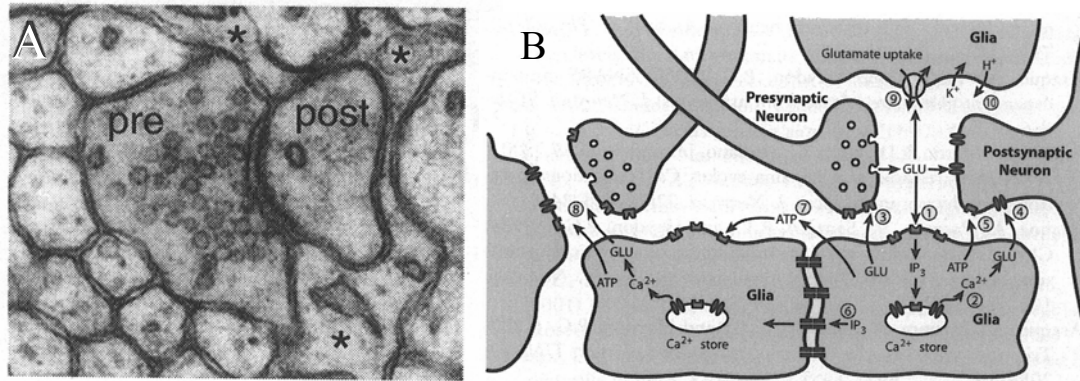
Resulta interesante destacar que además de la respuesta del SNC a procesos inflamatorios, las citoquinas sintetizadas en el SNC parecen tener un rol fundamental en la modulación del ciclo sueño/vigilia. El grupo de Krueger ha trabajado extensamente en la regulación del sueño por parte de las citoquinas y es posible decir que éste es hasta el momento el rol más claro para las citoquinas centrales (Kapas *et al.* 1998; Krueger *et al.* 1998; Krueger *et al.* 2001; Krueger *et al.* 2003). Además existen evidencias que sugieren que las citoquinas centrales podrían estar vinculadas a la modulación de funciones tales como alimentación, regulación de la temperatura y actividad locomotora. Además fueron implicadas en patologías neurodegenerativas y depresión.

2.5. Respuesta al LPS y citoquinas.

Como su nombre lo indica, el LPS (figura 2.12) es una molécula compleja compuesta por un núcleo de azúcares hidrofílicos unido covalentemente a un componente lipofílico denominado “lípidos A” compuesto por seis cadenas de ácidos grasos (de alrededor de 14 carbonos). El LPS es un componente natural de la membrana externa de bacterias gram negativas y su liberación es el principal causante de los daños y alteraciones patofisiológicas asociadas a infecciones de tipo gram negativo incluyendo fiebre, hipotermia y disfunciones neurológicas (revisado en (Berczi 1998; Linthorst y Reul 1998).

Existen muchos tipos diferentes de LPS de acuerdo con la especie y cepa de la cual se obtiene y del serotipo que presenta. Los serotipos varían principalmente de acuerdo con la composición de la fracción lipídica y dependen en general del método de purificación utilizado para su obtención. Habitualmente las bacterias utilizadas para la obtención de LPS son *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* aunque también se utilizan otras bacterias como *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*. Dentro de los LPS obtenidos de *E. coli* los más comúnmente utilizados son 0127:B8, 055:B5 y 111:B14.

El poder inflamatorio del LPS varía notablemente de acuerdo con la bacteria de la cual proviene y su serotipo. A su vez, se observa que si el LPS es hidrolizado, obteniendo por un lado la fracción hidrofílica y por otro el lípidos A, la fracción de mayor potencia inflamatoria es el lípidos A, que es el componente capaz de unirse a la proteína de unión a LPS, LBP (del inglés *LPS-binding protein*).



A) Fotografía obtenida por microscopía electrónica en la cual se pueden observar las terminales pre (pre) y postsináptica (post) de una sinapsis que está estrechamente rodeada por un proceso de un astrocito (*). B) Esquema que representa algunas de las posibles vías de interacción en la sinapsis tripartita modificado de Newman et al, 2004. En la sinapsis tripartita, los astrocitos participan activamente del proceso sináptico modulando la concentración de neurotransmisores en el espacio sináptico y regulando la actividad neuronal por medio de mensajeros parácrinos tales como el ATP. Esta modulación ejercida por los astrocitos incluye tanto la captación y o degradación de los neurotransmisores como su liberación

Al ser administrado en forma periférica, el LPS forma un complejo con la isoforma soluble de CD14 (CD14s) y LBP (Wright *et al.* 1990). El complejo LPS-CD14s-LBP entra en contacto con células que expresan CD14 en su membrana (CD14m) y el LPS es transferido del CD14s al CD14m. Luego un cambio conformacional en CD14m permite que el LPS sea incorporado a la célula (Hailman *et al.* 1996; Vasselon *et al.* 1999). Tras ingresar a la célula el LPS activa numerosas vías de transducción de señales que inducen la expresión de genes proinflamatorios y la liberación de moléculas de señalización tales como NO, citoquinas anti y pro inflamatorias, aminoácidos excitatorios, aminas biógenas, etc. La respuesta del sistema inmunológico a la presencia de LPS incluye la activación de linfocitos T y B pero no genera linfocitos de memoria y no produce una liberación masiva de inmunoglobulinas. Sin embargo, la exposición repetida a LPS (generalmente en dosis bajas) disminuye temporariamente la reacción del organismo en un fenómeno

conocido como tolerización. Este proceso es utilizado muchas veces con el objeto de disminuir los efectos de reacciones alérgicas causadas por bacterias gram negativas.

La respuesta neuroendócrina y metabólica a las infecciones es conocida hoy como respuesta de fase aguda APR (del inglés *acute phase response*). La APR incluye la síntesis de un gran número de proteínas y glicoproteínas de fase aguda (principalmente de origen hepático) entre las que se encuentran LBP, proteína C reactiva (CR), componentes del complemento (anafilotoxinas), fibrinógeno, inhibidor de α 1-proteasas, α 2 macroglobulinas y enzimas convertidoras de citoquinas entre muchas otras. Además de estas proteínas, la APR incluye la liberación de citoquinas pro y antiinflamatorias y una respuesta neuroendócrina que involucra aumentos de ACTH, glucocorticoides, hormona de crecimiento, insulina, glucagón, MSH, endorfinas, adrenalina, noradrenalina, AVP y aldosterona, entre otras hormonas.

La APR va acompañada en general de una serie de cambios comportamentales y fisiológicos que, como ya mencionamos, se engloban bajo el término *sickness behaviour* y que incluyen aislamiento social, pérdida del apetito y de la libido, disminución de la actividad exploratoria y de la actividad general, cambios en el comportamiento termoregulatorio (temblores, piloerección y otros), aumento del sueño de onda lenta, diarrea y fiebre o hipotermia (Dantzer *et al.* 1998; Linthorst y Reul 1998; Kronfol y Remick 2000; Dantzer 2001; Gahtan y Overmier 2001).

Es de interés notar que todos los fenómenos asociados al *sickness behaviour* y a la APR son procesos normalmente modulados por el sistema circadiano y que en patologías “cronobiológicas”, como el síndrome de depresión estacional (SAD), también están alterados. De hecho, si se establece una comparación entre la respuesta a una infección, la respuesta de estrés, la depresión mayor y el SAD, se observa que comparten muchas de sus características.

2.6. Astrocitos y el sistema circadiano

La existencia de la neuroglía fue propuesta por el patólogo alemán Rudolph Virchow a mediados del siglo XIX quien acuñó el término neuroglía (cemento neuronal) en el año 1856. Al referirse a la neuroglía, Virchow parece haberse referido al tejido intersticial que rodea las neuronas sin asignarle un componente celular. Por lo tanto, la neuroglía era vista en un principio como un cemento en el cual están inmersas las neuronas y de hecho era considerada un tejido conectivo de origen mesodérmico. Al mismo tiempo, otro patólogo alemán, Heinrich Müller, publicó el primer dibujo de una célula de la glía (muy superior en calidad a los presentados por Virchow) y ya en 1851 había notado en un estudio comparativo entre varios vertebrados que la retina tiene fibras radiales, a las que hoy conocemos como células de Müller. Rápidamente, y a medida que avanzaban las técnicas histoquímicas, se hizo evidente que la neuroglía no era de origen mesodérmico y que estaba compuesta por células de una gran variedad estructural. Ya en 1909 Cajal afirmó que “hemos enfatizado que dos elementos especiales, que son en realidad abstracciones derivadas de muchos ejemplos, forman todo tejido nervioso: la neurona con sus procesos y la célula de la glía”.

Desde mediados del siglo pasado el análisis histológico dejó lugar al estudio funcional de la glía, lo que permitió asignarle funciones a los diferentes tipos de células que la componen. En forma simplificada podemos decir que la glía está compuesta, en principio, por dos grupos de células, la macroglía y la microglía. Al primer grupo corresponden las células ependimales (que recubren los ventrículos cerebrales), los oligodendrocitos (que forman vainas de mielina) y los astrocitos (con

funciones muy variadas). Entretanto, la microglía tiene una función primordialmente macrofágica y de respuesta a agentes extraños.

Los estudios desarrollados en células de la glía en la última década revolucionaron la neurobiología tradicional. Hoy sabemos que, por medio de señales químicas convencionales y no convencionales, las células gliales pueden regular la formación de sinapsis (Fields y Stevens-Graham 2002), controlar la fuerza sináptica y hasta diferenciarse a neuronas (Kondo y Raff 2000; Seri *et al.* 2001). Por otro lado, la actividad neuronal es capaz de regular la actividad y la fisiología glial incluyendo su proliferación y diferenciación. La glía también está implicada en el metabolismo de la glucosa y la liberación de neuropéptidos y aminoácidos excitatorios. De esta forma, las células de la glía dejaron de ser consideradas como células accesorias que funcionan simplemente como sostén fisiológico y anatómico de las neuronas para tomar un rol activo en la fisiología del sistema nervioso.

Las funciones de los astrocitos incluyen la producción y secreción de moléculas de adhesión y de matriz extracelular, guía para la migración neuronal, producción de factores neurotróficos, participación en el proceso de angiogénesis cerebral, inducción y mantenimiento de la Barrera Hematoencefálica (BHE), regulación de pH, concentración iónica y osmolaridad, detoxificación, funciones neuroendócrinas, fagocitosis y funciones inmunes (Kettenmann y Ransom 2005). De hecho, la importancia de los astrocitos en la regulación de la actividad sináptica llevó a crear el concepto de la “sinapsis tripartita” (figura 2.13) en la que además de las neuronas pre y postsináptica, participan astrocitos capaces de liberar y recaptar sustancias neuroactivas (Araque *et al.* 1999). Se ha demostrado también que los astrocitos suelen estar unidos entre sí por uniones de tipo gap, lo que los transforma en una suerte de tejido sincisial en el que las señales se pueden propagar de una célula

a otra por medio de ondas de calcio e incluso por cambios en el potencial de membrana. También se han descrito hemidesmosomas por medio de los cuales pueden liberar neuropéptidos, aminoácidos excitatorios y sustancias necesarias para el metabolismo neuronal. Se caracterizan además por ser células extremadamente complejas con receptores para una gran cantidad de moléculas señalizadoras entre las que se pueden nombrar casi todos los neuropéptidos, catecolaminas, aminoácidos excitatorios, GABA, citoquinas, neurotrofinas, prostaglandinas, tromboxanos, factores de crecimiento y muchas hormonas. También tienen la capacidad de sintetizar muchos de esos compuestos (ver tabla 2.4). Esto los transforma en células capaces de desplegar una gran variedad de respuestas frente a muy diversos estímulos.

Tabla 2.4. Moléculas de señalización y receptores expresados en astrocitos.

Familia	Ligando	normal	reactivo	Receptor
Hormonas	TRH			TRH1
	Oxitocina			
Purinas	Adenosina			A2A
	ATP			P2X7
Neuropéptidos	(Brdiquinina)			B1 y 2 (in vitro)
	(Taquiinina)			NK1, 2 y 3
	(Somatostatina)			SST _{2A}
	(Histamina)			H1 y H2
	(Dopamina)			D1 y D2
	Glicina			
	Glutamato			Todos los receptores de glutamato
	Aspartato			
	IL-4	nd	nd	IL-4R
Citoquinas y factores de crecimiento	TNF α	-	++	TNFR1
	IL-1	-	++	IL-1R1
	IL-6	+	+++	-
	IFN γ	-	++	IFNR
	IFN α/β	-	++	IFNR
	IL-10	nd	nd	IL-10R
	LIF	+	+++	LIF receptor
	Prolactina			
	Prostaglandinas	+	+++	
	TGF α	+	Nd	ErbB1-4
	TGF β	++	Nd	TGF β receptor
	GDNF	-	+++	
	BDNF	-	+++	
	NGF	+++	++++	
	CNTF	+	+++	CNTFreceptor

Tabla 2.4. Se detallan aquellas moléculas liberadas por astrocitos in vivo o in vitro y los receptores para dichas moléculas cuya expresión se ha demostrado in vivo o in vitro. Para aquellas moléculas estudiadas en condiciones basales y en astrocitos reactivos se detalla cualitativamente la expresión en cada caso con los signos más indicando mayor expresión. Las celdas vacías corresponden a moléculas no descritas hasta el momento y las celdas con un signo – corresponden a moléculas presumiblemente no expresadas en astrocitos. Abreviaturas: ATP, adenosina trifosfato; BDNF, factor neurotrófico derivado de cerebro; CNTF factor neurotrófico ciliar; GDNF, factor neurotrófico derivado de células gliales; IFN, interferón; IL, interleuquina; LIF, NGF, factor de crecimiento neuronal; TGF, factor de crecimiento transformante; TNF, factor de necrosis tumoral; TRH, hormona liberadora de tirotrófina.

¿Qué es lo que sabemos del rol de los astrocitos en el sistema circadiano?

Desgraciadamente, extremadamente poco. Si bien existen trabajos en los que se demuestra la participación de la glía y en particular de los astrocitos en el sistema circadiano de diversos animales (van den Pol *et al.* 1992; Prosser *et al.* 1994; Shinohara *et al.* 2000), su rol está muy lejos de haber sido esclarecido.

A la compleja anatomía de los NSQ (Abrahamson y Moore 2001) se le agrega la presencia de los astrocitos que, a juzgar por la heterogeneidad de respuestas a neurotransmisores, son también muy heterogéneos (van den Pol *et al.* 1992). La densidad de astrocitos en los NSQ de mamíferos es muy alta en comparación con otras estructuras cerebrales, llegando a un astrocito por cada tres neuronas (Guldner 1983; Morin *et al.* 1989). Como se mencionó anteriormente, los pulsos de luz durante la noche inducen la expresión de c-Fos en los NSQ y en ratones se demostró mediante estudios de microscopía electrónica que aproximadamente un 7% de la inmunoreactividad de c-Fos inducida por la luz se da en astrocitos (Castel *et al.* 1997). Este resultado concuerda con un trabajo previo en ratas en el que se encontraron aumentos de expresión de c-FOS en células gliales en respuesta a la luz (Bennett y Schwartz 1994). También existen evidencias que indican que esta activación de c-Fos en respuesta a la luz y la actividad de la glucógeno fosforilasa, una enzima que en el SNC se encuentra principalmente en astrocitos, son circadianas. Estudios de la expresión de la proteína glial fibrilar ácida (GFAP), un microfilamento

intermedio del citoesqueleto de astrocitos, indican además que los astrocitos presentan variaciones circadianas en su distribución en hámsteres (Lavialle y Serviere 1993), aunque existen datos contradictorios en ratones y ratas (Fernandez-Galaz *et al.* 1999; Moriya *et al.* 2000). A su vez, ratones knock-out de GFAP muestran alteraciones en sus ritmos circadianos y animales enucleados muestran una disminución de la inmunoreactividad de GFAP (GFAPir) en los NSQ (Yamazaki *et al.* 2002).

Dado que el significado fisiológico de los fenómenos mencionados en el párrafo anterior es poco claro analizaremos con mayor detalle los resultados que vinculan a los astrocitos con el reloj. En mamíferos ha sido demostrada una inmunorreactividad de GFAP (GFAPir) particularmente densa en los NSQ ((Morin *et al.* 1989)) estimando que un astrocito puede tener contacto con cientos de neuronas influyendo sobre su comportamiento. Se sabe además que los astrocitos de los NSQ son capaces de acoplarse mediante uniones gap, tanto *in vivo* como *in vitro* (van den Pol *et al.* 1992; Welsh y Reppert 1996) y que el bloqueo de dichas uniones interrumpe el patrón circadiano de disparos neuronales durante el período de acción de la droga, recuperándose luego el patrón normal (Prosser *et al.* 1994). Asimismo, la administración i.c.v. del inhibidor del metabolismo glial provoca arritmicidad comportamental durante 1 semana, recuperándose luego la actividad locomotora normal pero con un retraso de fase (Prosser *et al.* 1994).

Siguiendo el mismo tipo de análisis se ha observado que la incubación de NSQ en cultivo en presencia de antimitóticos (normalmente utilizados para reducir el número de células gliales) desincroniza los ritmos de liberación de péptidos VIP y AVP (Shinohara *et al.* 1995).

En otra estrategia de investigación sobre el rol de estas células en el reloj se analizó la relación existente entre el desarrollo del RHT y la aparición de los

astrocitos en los NSQ (Lavialle y Serviere 1995). En ratas, donde la tinción de GFAP se observa preferentemente en la zona ventral de los NSQ (Tamada *et al.* 1998; Munekawa *et al.* 2000), se produce un aumento de la GFAPir en dos momentos determinados del período postnatal: durante los días 3 y 4 (P3-P4) se observa un aumento del número de células GFAP positivas y entre los días P20-P25 un incremento en el número de procesos (o prolongaciones) GFAP positivos, alcanzándose a P30 el nivel de adulto (Munekawa *et al.* 2000).

Debido a la relación existente entre la aparición de astrocitos en los NSQ y el desarrollo del RHT, es importante definir si los astrocitos están involucrados en el fenómeno de sincronización fótica y si la luz tiene efectos sobre la morfología y función de estas células. Lo primero que se observó es que, en hámsteres, la GFAPir varía a lo largo del día no sólo en condiciones de luz oscuridad (L:O) sino también en oscuridad constante (O:O) (Lavialle y Serviere 1993). La variación circadiana es observada en la distribución de GFAP, pasando desde una red compacta a un estado más laxo. Sin embargo, hay diferencias en cuanto a la presencia, o no, de un ritmo de GFAP-ir en las especies analizadas. En rata parece no haber ritmo de GFAP-ir ni en LD ni en DD (Tamada *et al.* 1998; Munekawa *et al.* 2000). Análogamente, Moriya y colaboradores reportaron en ratones la ausencia de variación en GFAPir (figura 2.14) en todas las condiciones analizadas (DD, LD y LL) (Moriya *et al.* 2000) si bien Araujo y colaboradores mostraron un ritmo de GFAP en ratones C57BL/6 coincidente con el reportado por Lavialle en hámster (Araujo, 2003, comunicación personal). En el mismo trabajo, Moriya y colaboradores estudiaron el ritmo de actividad locomotora de ratones knock-out de GFAP, observando igual comportamiento que los ratones de cepa salvaje en LD, DD y respuesta a pulsos de luz. La única diferencia significativa

que pudieron caracterizar es una mayor arritmicidad de los mutantes, con respecto a los controles, al situarlos en condiciones de luz constante (LL).

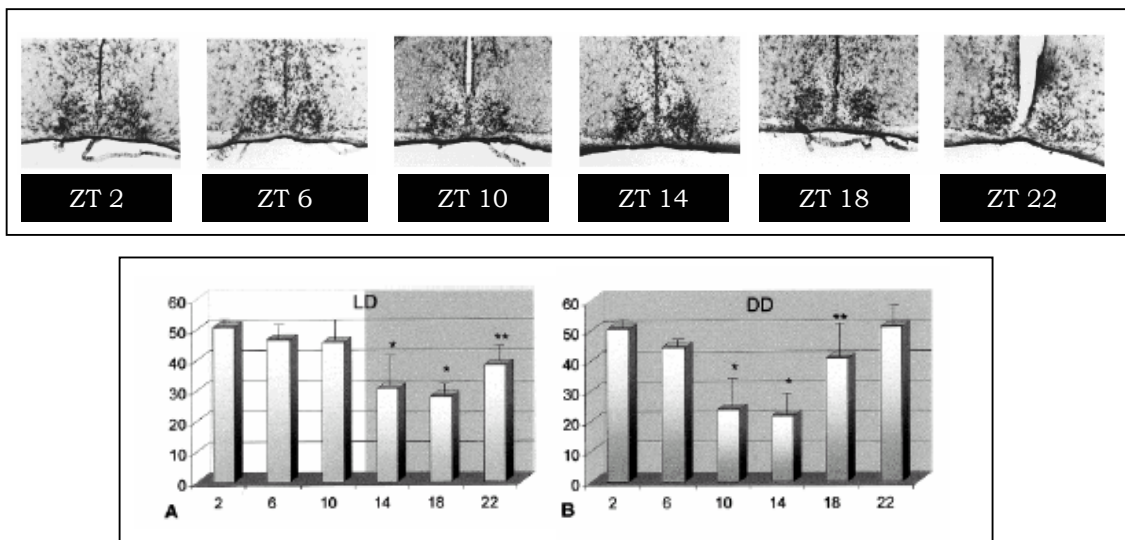


Figura 2.14. Hasta el momento la presencia de ritmos de GFAPir en los NSQ de ratones es contradictoria.

La cuantificación de la GFAPir en los NSQ de ratones no es simple y hasta el momento existen evidencias contradictorias acerca de la presencia de ritmos en ratones. En el panel superior se pueden observar las microfotografías publicadas por Moriya y colaboradores (1999) de acuerdo a las cuales dicen no encontrar ritmos de la GFAPir. Sin embargo en las fotos parece evidente una mayor GFAPir a ZT2 así como una clara diferencia en la localización anatómica de la inmunomarcación. En el panel inferior se puede observar la cuantificación de la GFAPir en los NSQ de hámsteres reportada por Lavialle et al., 2001. En dicho trabajo se reporta una mayor área cubierta por GFAPir alrededor de ZT 3 en ciclos L:O (LD en la figura) y un resultado similar en ciclos O:O (DD en la figura).

Más allá de la supuesta ausencia de ritmos de GFAPir en ratón y rata, el grupo de Lavialle y colaboradores publicó más tarde un nuevo trabajo donde no sólo confirmaron la presencia de una variación circadiana en GFAPir en los NSQ de hámsteres en diferentes condiciones (LD, LL y DD), sino que además caracterizaron la inmunorreactividad del marcador glial a lo largo del eje antero-posterior mostrando diferencias de acuerdo con la zona de los NSQ observada (Lavialle *et al.* 2001). Por otro lado, la enucleación bilateral de hámsteres produce una notable disminución de la GFAPir, aún en aquellos animales mantenidos en DD desde su nacimiento (Lavialle *et al.* 2001; Yamazaki *et al.* 2002). Si bien se analizó la distribución de muchos de los

neuropéptidos de los NSQ en los animales enucleados, las únicas alteraciones halladas hasta el momento son la disminución de GFAPir y el ritmo de fosforilación de ERK1 y 2 (del inglés *extracellular signal-regulated kinases 1 & 2*) en la zona central de los NSQ (Lee *et al.* 2003).

Sin duda, los astrocitos están involucrados en el funcionamiento del reloj de una u otra manera. Su relación con el desarrollo del TRH y la disminución de GFAPir en animales enucleados sugiere que estarían vinculados a la vía de entrada del sistema pero, además, dado que la expresión de TGF α estaría involucrada en el *output* del reloj (Kramer *et al.* 2001) y se sabe que las células responsables de su expresión en los NSQ son astrocitos (Li *et al.* 2002), es posible que estén involucrados también en las vías de salida. Hay dos factores que hacen aun más complicado el análisis de estos resultados: por un lado se sabe muy poco acerca del rol fisiológico de GFAP haciendo imposible por el momento entender desde el punto de vista funcional cuál es el significado de los cambios en la GFAPir o de las observaciones en los knock-out de GFAP y, por otro lado, la eliminación de los astrocitos, la inhibición de su metabolismo o el bloqueo de la comunicación entre ellos puede afectar de manera indirecta a las neuronas, dado que la glía es indispensable para estas células. Por lo tanto, si se inhibe el metabolismo glial, las neuronas pueden verse afectadas y en ese caso no podremos discernir si la causa del efecto observado es por la falta de la función glial o por muerte o mal funcionamiento neuronal.

Muy recientemente se ha reportado que, en los mamíferos, los astrocitos presentan ritmicidad circadiana *in vivo* (Prolo *et al.* 2005) y como ya fue mencionado, estarían involucrados en la comunicación entre la retina y los NSQ. En otros animales, los astrocitos también han sido vinculados al sistema circadiano. En polillas

se ha descrito la expresión rítmica de Per1 en astrocitos y en moscas se describieron ritmos circadianos en el volumen celular de astrocitos (Wise *et al.* 2002).

Los astrocitos no sólo están relacionados con el sistema circadiano sino que también están en estrecha comunicación con el sistema inmunológico. Una de las funciones “clásicas” de los astrocitos es su función como células inmunocompetentes en el SNC (Dong y Benveniste 2001). Estas células tienen la capacidad de responder a una amplia variedad de citoquinas, entre las que podemos nombrar a IL-1, TNF α , IFN γ y otras interleuquinas (IL-6, -10), entre las más importantes. La liberación de algunas de estas moléculas por parte de los astrocitos hace que sean fundamentales en la naturaleza, magnitud y duración de los procesos inflamatorios en el SNC. Además se ha propuesto que el mantenimiento de la homeostasis tisular y la respuesta a estímulos patológicos en el SNC depende de una compleja acción integrada de citoquinas predominantemente producidas por la neuroglia (Aloisi, 2004). Tanto IL-1 como TNF α han sido involucradas en mecanismos de formación de memoria, aprendizaje, sueño y otras funciones del SNC (Katsuki *et al.* 1990; Hauss-Wegrzyniak *et al.* 1998; Krueger *et al.* 1998; Gahtan y Overmier 2001).

IL-1 es un polipéptido sintetizado tanto por astrocitos como por la microglía en el SNC. Cuando se inyecta en forma i.c.v. promueve el proceso denominado astrogliosis (Aschner 1998a), que es el sello de muchas enfermedades neurodegenerativas y se caracteriza por la proliferación, cambios morfológicos y aumento de la expresión de ciertas proteínas. Se sabe también que la estimulación de astrocitos con IL-1 *in vitro* desencadena la liberación de otras citoquinas como TNF α , IL-6, G-CSF y GM-CSF (Aschner 1998b) y que el LPS estimula la liberación de IL-1 por parte de los astrocitos en cultivo (Fontana *et al.* 1982). Por lo tanto, los astrocitos son capaces de responder a IL-1 y de secretarla en respuesta a ciertos estímulos.

TNF- α es otra citoquina proinflamatoria de 17 kDa expresada por astrocitos y microglía en el SNC (Aschner 1998a). La administración de este factor aumenta la permeabilidad del endotelio vascular (Brett *et al.* 1989) y estimula la liberación de otras citoquinas (IL-1, -6 y también TNF α) en diversos tipos celulares, incluidos los astrocitos (Aschner 1998b).

2.7. El factor de transcripción NF- κ B.

Como se mencionó anteriormente, la respuesta al LPS y a las citoquinas proinflamatorias requiere de la activación del factor de transcripción NF- κ B. Este factor de transcripción es realmente asombroso en varios aspectos: es activado por una gran diversidad de estímulos, es capaz de inducir la expresión de un gran número de genes, interactúa con muchos otros factores de transcripción, tiene una regulación extremadamente compleja, da lugar a respuestas extremadamente rápidas y está altamente conservado en la escala evolutiva.

Originalmente fue descrito como un factor de transcripción vinculado al sistema inmune pero, si bien tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa dependen de su activación, actualmente se le conocen muchas otras funciones fuera del sistema inmunológico. Su actividad ha sido vinculada a procesos de desarrollo, apoptosis, procesos de aprendizaje y memoria, protección frente a situaciones ambientales nocivas como la exposición a radiación ultravioleta o a radicales libres y muchos otros procesos más. En términos generales se puede decir que se trata de un factor de transcripción vinculado a estímulos del medio que requieren de la inducción de respuestas rápidas.

Si bien los mecanismos de control de la actividad transcripcional de NF- κ B vienen siendo revisados constantemente y aparecen continuamente datos novedosos que

ponen en duda los paradigmas anteriores de activación, podemos decir que en términos generales se trata de un dímero de localización citoplasmática que al ser activado se trasloca al núcleo donde ejerce su actividad transcripcional uniéndose a secuencias consenso en el ADN en los promotores de los genes blanco (Karin *et al.* 2004).

NF- κ B representa en realidad a un grupo de proteínas estructuralmente relacionadas y evolutivamente conservadas que en mamíferos tiene cinco componentes, Rel (c-Rel), RelA (p65), RelB, NF- κ B1 (p50 y su precursor p105) y NF- κ B2 (p52 y su precursor p100). Las proteínas de este grupo pueden existir como homo o heterodímeros y si bien casi todas las combinaciones son transcripcionalmente activas, los homodímeros de p50 y de p52 pueden reprimir la transcripción de sus genes blanco (Zhong *et al.* 2002). Presentan un dominio de homología Rel (RHD) de 300 aminoácidos altamente conservado en su extremo N-terminal que les permite unirse al ADN, dimerizarse y unirse a proteínas inhibitorias (I κ B) (Ghosh *et al.* 1998). En reposo, la mayor parte de los dímeros de NF- κ B se encuentran retenidos en el citoplasma unidos a proteínas de la familia I κ B.

La familia I κ B tiene siete miembros conocidos en mamíferos, I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , I κ B γ , Bcl-3 y las proteínas Rel precursoras p105 y p100. Las proteínas de la familia I κ B se caracterizan por la presencia de múltiples dominios de tipo ankirina, que son dominios de interacción proteína-proteína y les permiten a los miembros de esta familia interactuar con NF- κ B mediante el dominio RHD.

Como se puede ver en la figura 2.15, una gran variedad de agonistas puede activar una vía de señalización que finalmente resulta en la activación de una kinasa específica de I κ B (IKK) (Karin y Ben-Neriah 2000). IKK es un complejo compuesto al menos por tres subunidades, IKK α , IKK β e IKK γ (NEMO). IKK α y β son las

subunidades catalíticas e IKK γ es una subunidad regulatoria que probablemente es la que vincula al complejo con sus activadores. Se demostró que el peso molecular del complejo IKK es de entre 700 y 900 kDa, lo que sugiere que además de las tres subunidades descritas deben existir otros miembros. Recientemente se sugirió que Cdc37 y HSP90 serían también componentes del complejo IKK aunque su función en este complejo es aún desconocida (Chen *et al.* 2002).

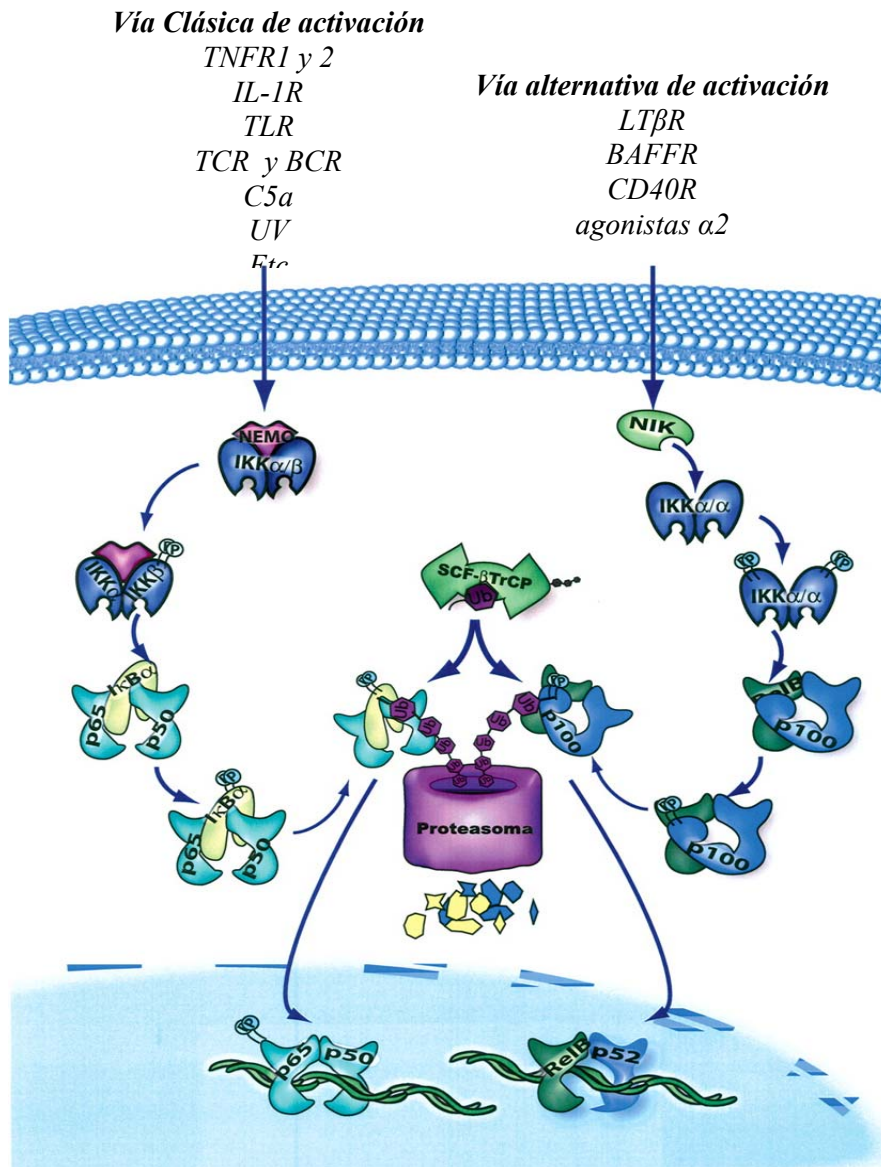


Figura 2.15. *Vías de activación de NF-κB.*

Existe una gran variedad de estímulos capaces de activar al factor de transcripción NF-κB por dos vías principales. La vía clásica es mediada por la activación de IKKβ que lleva a la fosforilación y degradación de IκB. La vía alternativa involucra la activación de IKKα mediada por NIK y la posterior fosforilación y procesamiento de p100 generando heterodímeros p52:RelB. En ambas vías los dímeros libres migran al núcleo donde pueden inducir la expresión de aproximadamente 50 genes diferentes. (Modificado de Hayden y Ghosh, 2004).

La activación de IKK, esencial para la activación de NF-κB, lleva a la fosforilación de por lo menos dos residuos serina en la región N-terminal regulatoria de IκB. Esta fosforilación marca a las proteínas IκB para la poliubiquitinización por parte de una

ubiquitina ligasa perteneciente a la familia SCF (Ben-Neriah 2002). Una vez ubiquitinadas, las proteínas I κ B son degradadas por el proteosoma, liberando a NF- κ B y permitiendo su entrada al núcleo. La entrada de NF- κ B al núcleo depende de señales de localización nuclear (NLS) que están parcialmente enmascaradas en el complejo NF- κ B:I κ B y son liberadas al ser degradada I κ B. Sin embargo, se ha demostrado que I κ B presenta una señal de exportación nuclear y que luego de la activación de NF- κ B, puede ingresar al núcleo, unirse al dímero y forzar la exportación de todo el complejo hacia el citoplasma (Arenzana-Seisdedos *et al.* 1997; Rodriguez *et al.* 1999).

Existen trabajos que sugieren que el complejo NF- κ B:I κ B es capaz de entrar al núcleo por medio de una NLS en p50 que no es enmascarada por I κ B y que una vez en el núcleo, la NES de I κ B llevaría a todo el complejo nuevamente al citoplasma ((Tam *et al.* 2000; Malek *et al.* 2001). Esto llevaría al establecimiento de un equilibrio entre la localización nuclear y citoplasmática del complejo NF- κ B:I κ B que quedaría determinado por la dominancia del efecto de NES sobre NLS. Asimismo se ha descrito que la proteína β TrCP, responsable de la unión entre I κ B fosforilado y la ubiquitina ligasa, está localizada exclusivamente en el núcleo poniendo en duda la localización citoplasmática del proceso de degradación de I κ B (Ben-Neriah 2002; Davis *et al.* 2002).

La actividad transcripcional de NF- κ B también parece ser regulada en forma bastante compleja. De hecho sabemos en la actualidad que no basta con que el dímero entre al núcleo, sino que tendría que sufrir algunas modificaciones postraduccionales (acetilaciones y/o fosforilaciones) para ser transcripcionalmente activo (Mosialos y Gilmore 1993; Neumann *et al.* 1995). Esto probablemente se deba a que el extremo C-terminal de p65 podría interactuar con el RHD interfiriendo en la unión al DNA y a coactivadores. La fosforilación en la serina 276 y otras modificaciones serían capaces

de prevenir esta asociación intramolecular. Muchas enzimas quinasas fueron involucradas en la fosforilación de NF- κ B incluyendo la subunidad catalítica de PKA (PKAc), PKC ζ , caseína quinasa II (CKII), IKK, NIK y las serina/treonina quinasas GSK3 β y TBK/t2k/NAK.

Es evidente, por lo tanto, que NF- κ B es un factor de transcripción extremadamente complejo dado que su actividad transcripcional se regula a muchos niveles y puede ser activada por muchos estímulos diferentes. Es un participante necesario de las respuestas de tipo inflamatorio incluyendo la respuesta a IL-1, TNF α , LPS y otras pero además participa de varios procesos fisiológicos a nivel del SNC incluyendo memoria y aprendizaje, potenciación a largo término, ciclo sueño-vigilia y otros (Kassed y Herkenham 2004).

La pregunta que cabe hacerse es, entonces, si NF- κ B está de alguna forma vinculado al sistema circadiano. Existen numerosas evidencias que NF- κ B participa de alguna forma en el sistema circadiano. Por un lado, J. Krueger y colaboradores mostraron que el efecto de las citoquinas sobre el ciclo sueño:vigilia es dependiente de la activación de NF- κ B y además observaron ritmos diarios en su actividad en la corteza de ratas con máximos durante la mañana (Chen *et al.* 1999). También se ha sugerido que el efecto inmunomodulador de la melatonina depende de sus propiedades antioxidantes que le darían la capacidad de inhibir la activación de NF- κ B y que en el bazo existirían variaciones diarias de actividad κ B que podrían ser sincronizadas por melatonina (Chuang *et al.* 1996). En cuanto al sistema circadiano propiamente dicho, existen dos trabajos hasta el momento que sugieren un rol de NF- κ B. Por un lado Hayashi y colaboradores propusieron que los ratones de período anormalmente largo presentan una mutación en el cromosoma 19 que estaría vinculada al gen de IKK, muestran la presencia de mensajeros de esta enzima en los NSQ (Hayashi *et al.* 2003).

Asimismo, en nuestro laboratorio hemos demostrado la presencia de NF- κ B en los NSQ de hámsteres y su relevancia en los avances de fase inducidos por luz (Marpegan *et al.* 2004). En dicho trabajo observamos por *western blot* que existe expresión de p65 en los NSQ de hámsteres y que dicha expresión no presenta variaciones diarias ni circadianas (figura 2.16). A su vez mostramos que la expresión de p65 en los NSQ correlaciona con la actividad NF- κ B demostrada por medio de ensayos de cambio de movilidad electroforética (figura 2.17) y que la aplicación i.c.v. de pirrolidina ditiocarbamato (PDTC), un inhibidor de la activación de NF- κ B, previa a un pulso de luz saturante a CT18 inhibe los avances de fase observados (figura 2.18).

En conjunto estas evidencias sugieren que la vía de NF- κ B estaría involucrada de una forma aún no del todo clara en el sistema circadiano de mamíferos. Es evidente por lo tanto que NF- κ B sería un candidato ideal como posible mediador de las interacciones neuroinmunes en el sistema circadiano de mamíferos.

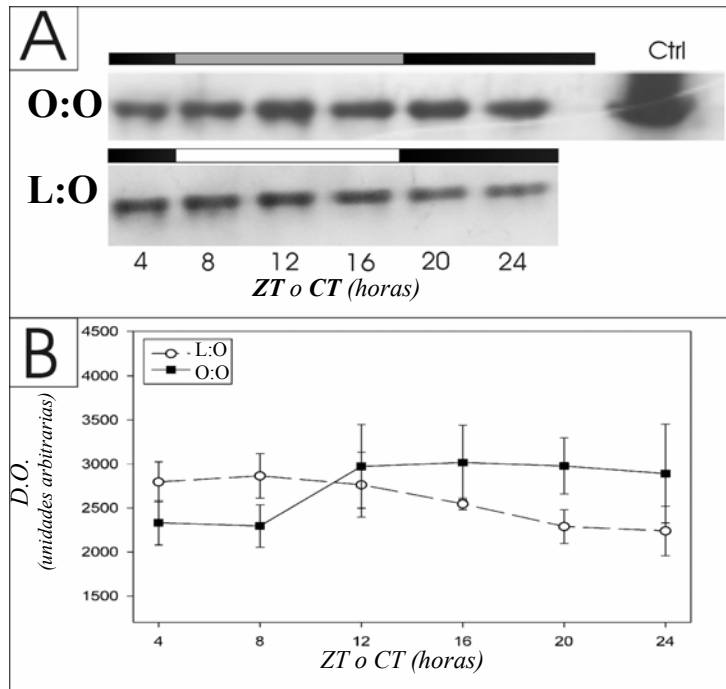


Figura 2.16. Expresión de p65 en los NSQ de hamster.

Western blots representativos de extractos totales provenientes de NSQ de hámsteres provenientes de ciclos L:O u O:O, sacrificados en distintos horarios. No se encontraron variaciones diarias ni circadianas significativas en la expresión de la subunidad p65 de NF-kB en los NSQ de hamsteres.

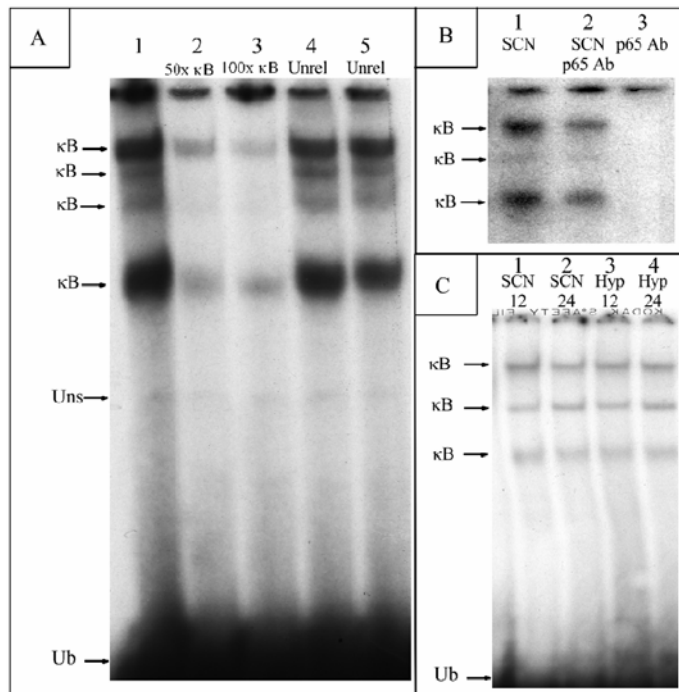


Figura 2.17. Actividad de NF-kB en los NSQ de hámsteres.

La actividad de NF-kB en los NSQ de hámster fue estudiada mediante ensayos de cambio de movilidad electroforética. Se identificaron bandas específicas correspondientes a la unión de NF-kB al oligonucleótido específico κB marcado radiactivamente.

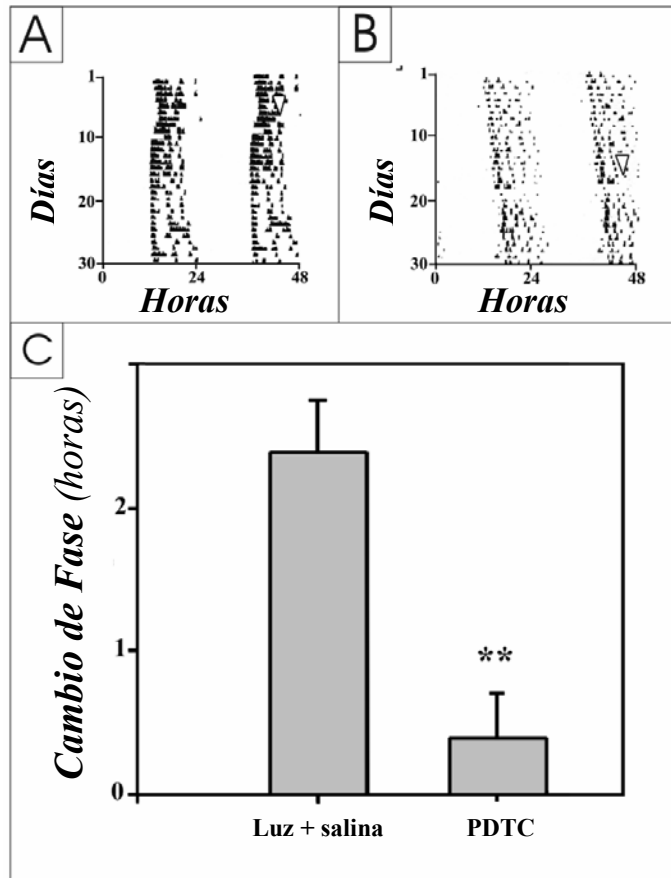


Figura 2.18. La aplicación de PDTC *i.c.v.* inhibe los avances de fase inducidos por luz en hámster. La aplicación de pulsos de luz saturante a ZT 18 en hámsteres produce adelantos de fase que fueron inhibidos al aplicar PDTC en forma *i.c.v.* Esto sugiere que NF- κ B participa del mecanismo de transducción de señales involucrado en la generación de avances de fase en respuesta a la luz.

2.8. Algunas evidencias de la interacción entre los sistemas circadiano e inmune.

Hasta el momento describimos al sistema circadiano, cómo es capaz de controlar variables inmunológicas (entre muchas otras) y nos detuvimos momentáneamente en las interacciones neuroinmunes, los astrocitos y el factor de transcripción NF- κ B. Pero más allá de una descripción de las partes, la idea de este trabajo es entender cómo todas estas partes pueden interactuar entre sí. Y para esto es necesario describir brevemente cuáles fueron las principales evidencias que nos

llevaron a pensar que efectivamente los sistemas circadianos e inmune interactúan entre sí.

Basta recordar lo ya mencionado acerca de los ritmos de las variables inmunes en la sección 2.3 para saber que el sistema circadiano modula al sistema inmune. Y basta recordar las palabras de Fraser en la sección 2.2 para pensar que los múltiples osciladores endógenos y las variables por ellos controladas deben interactuar entre sí para mantener el presente orgánico que es la vida. Esto nos lleva a pensar que debe existir una vía de retroalimentación desde el sistema inmune hacia el sistema circadiano, pero necesitamos evidencias. Como se puede ver en la tabla 2.5, hay unas cuantas, aunque hay algunas que son particularmente interesantes. Ellas son las alteraciones de la actividad bioeléctrica de los NSQ descritas por Romanovski y colaboradores en 1988, las alteraciones del sistema circadiano en patologías infecciosas como mal de Chagas, malaria e infecciones por HIV (Romanovskii y Grigor'ev 1988; Bourin *et al.* 1993; Vagnucci y Winkelstein 1993; Bentivoglio *et al.* 1994; Fernandez Alfonso *et al.* 2003), la modulación de la respuesta a la luz por parte de inmunosupresores (Golombek *et al.* 1998), la disminución de la respuesta del eje HPA frente al tratamiento con LPS en animales con los NSQ lesionados (Givalois *et al.* 1999) y la presencia de receptores de IFN γ en los NSQ (Lundkvist *et al.* 1999). Además cabe resaltar la importancia del resultado obtenido por Halberg en referencia a la mortalidad inducida por endotoxina (Halberg *et al.* 1960). Teniendo en cuenta que la incidencia de la mortalidad por shock séptico es alta (sobre todo en accidentes y abortos inducidos) el hecho de que haya una diferencia de mortalidad del 60 % o más de acuerdo al horario en que se produce la septicemia podría ser de gran relevancia clínica si los mismos mecanismos estuvieran implicados en el humano.

El hecho de que la ciclosporina A y el Tacrolimus produzcan cambios de fase y alteren las respuestas del sistema circadiano a la luz (Golombek *et al.* 1998), es extremadamente sugestivo ya que plantea la posibilidad de que el sistema inmunológico esté vinculado al circadiano en condiciones fisiológicas. En otras palabras, si un inmunosupresor tiene un efecto por sí mismo es porque el sistema inmune está involucrado en la respuesta fisiológica. Esto concuerda con el rol propuesto para las citoquinas en la fisiología del sueño (Krueger *et al.* 2001; Krueger *et al.* 2003), función para la cual no se requiere (por suerte) una activación exógena del sistema inmunológico. Comenzar a comprender cuál es la función de las variables inmunológicas en el sistema circadiano tanto en condiciones fisiológicas como patológicas es el objetivo de este trabajo.

Tabla 2.5. Publicaciones que aportan evidencias de una interacción neuroinmune en el sistema circadiano.

<i>Año</i>	<i>Autor</i>	Evidencias de interacción aportadas.
1950	<i>Halberg</i>	Diferencia diaria en la mortalidad inducida por dosis letales de LPS.
1985	<i>Hrushesky</i>	Estudio cronoofarmacológico del inmunosupresor Ciclosporina A en pacientes con daño renal
1988	<i>Romanovskii</i>	La aplicación de LFM/IL-1 altera la actividad eléctrica de los NSQ y varios otros núcleos hipotalámicos (en ruso).
1994	<i>Hrushesky</i>	Diferencia diaria en la mortalidad inducida por dosis letales de caquectina/TNF α . Bentivoglio describe alteraciones del sistema circadiano en animales con tripanosomiasis experimental.
1996	<i>Lancel y Mathias</i>	Estudiando el efecto de IL-1 sobre EEG, describen una variación circadiana en sus efectos.
1997	<i>Ohdo</i>	Variación circadiana en la fiebre inducida por la administración de IFN α . Floyd encuentra una variación diaria de TNF en el cerebro.
1998	<i>Lundkvist</i>	Expresión diaria del receptor de IFN γ en los NSQ. Opp y Toth analizan los efectos somnógenicos y pirogénicos de IL-1 y de LPS y demuestran la participación del vago en estas respuestas.
	<i>Golombek</i>	Los inmunosupresores Ciclosporina A y Tacrolimus modulan la actividad del sistema circadiano y su respuestas a la luz
	<i>Krueger</i>	Describen la relación entre citoquinas centrales y el ciclo sueño:vigilia.
1999	<i>Givalois</i>	Animales con los NSQ lesionados presentan una disminución en la respuesta del eje HPA frente a la administración de LPS.
2000	<i>Mathias</i>	Variación diaria en el sickness behavior y activación del eje HPA, inducidos por LPS. Nava demuestra que el LPS es capaz de aumentar la liberación de AVP en explantos de NSQ in vitro.
2001	<i>Takahashi</i>	Incremento de la expresión de Per1 en NPV en respuesta a LPS y a estrés físico.
2002	<i>Motzkus</i>	IL-6 induce la transcripción de Per1 en cultivos
	<i>Koyanaagi</i>	Alteraciones circadianas en animales tratados con IFN α subcutáneo.
	<i>Li</i>	Demuestra la expresión de TGF α en los NSQ
	<i>Lundkvist</i>	Alteraciones de la actividad eléctrica de los NSQ en respuesta a TNF α + IFN γ + LPS.
2003	<i>Fernandez Alfonso</i>	Describe alteraciones en el sistema circadiano de ratones infectados con Trypanosoma cruzi.

Hipótesis y Objetivos

3. Hipótesis y Objetivos:

3.1. Hipótesis:

Las evidencias que describimos anteriormente en referencia a una posible interacción bidireccional entre los sistemas inmune y circadiano nos llevan a postular la siguiente **hipótesis general**:

Existe una vía de interacción entre el sistema inmune y el sistema circadiano de forma tal que éste puede ser sincronizado por variables inmunológicas.

De esta hipótesis general se desprenden algunas hipótesis secundarias que detallaremos a continuación:

- ⊙ *Si las variables inmunológicas son capaces de sincronizar al sistema circadiano, la inducción de las mismas con LPS debe tener también un efecto sincronizador. Además este efecto sincronizador debería darse aún con dosis bajas de LPS.*
- ⊙ *La administración de citoquinas proinflamatorias, independientemente de la vía, sincroniza al sistema en forma similar al LPS.*
- ⊙ *De acuerdo con lo que se sabe en la actualidad, un agente sincronizador debe cambiar la fase del sistema circadiano actuando sobre los NSQ; de esta manera, el LPS y/o las citoquinas deben afectar a los NSQ.*
- ⊙ *Dado que el factor de transcripción NF- κ B está vinculado al sistema inmune y al sistema circadiano, es probable que su actividad sea necesaria en la interacción entre ambos sistemas.*
- ⊙ *Los astrocitos de los NSQ son potenciales mediadores de las interacciones neuroinmunes en el sistema circadiano y por lo tanto deben tener la capacidad de responder a LPS y/o a citoquinas proinflamatorias. Esta respuesta probablemente esté vinculada a la activación de NF- κ B.*

- ◉ *Las interacciones entre el sistema inmune y el sistema circadiano son relevantes tanto en condiciones “fisiológicas” como en condiciones “patológicas”.*

3.2. Objetivos:

De acuerdo con las hipótesis planteadas en el párrafo anterior, planteamos los siguientes objetivos para este trabajo:

Objetivo general:

Determinar si existe una interacción entre el sistema inmune y el sistema circadiano y establecer sus posibles mecanismos.

Objetivos particulares:

- ☒ *Determinar si la administración periférica de LPS produce alteraciones en algún parámetro de los ritmos circadianos de actividad locomotora en rueda y estudiar si dichos efectos varían en función del horario de tratamiento.*
- ☒ *En caso de producir cambios de fase, determinar si son de tipo fótico o no fótico y estudiar si sigue las vías descritas para estos tipos de estímulos analizando la interacción con estímulos fóticos o no fóticos conocidos.*
- ☒ *Estudiar el efecto de la administración periférica de LPS sobre la expresión del gen de expresión inmediato-temprana cFos, con el objeto de determinar si el LPS afecta la actividad celular de los NSQ.*
- ☒ *Determinar si el LPS administrado i.p. produce alguna modificación de la expresión de genes reloj en los NSQ.*
- ☒ *Analizar si la vía de acción del LPS requiere de la activación central y/o periférica del factor de transcripción NF- κ B.*

- ☒ *Estudiar el efecto de la administración i.c.v. de citoquinas proinflamatorias sobre el sistema circadiano y analizar si la respuesta a estas citoquinas es similar a la respuesta inducida por LPS.*
- ☒ *Determinar la capacidad de los astrocitos de los NSQ para actuar como mediadores de la interacción neuroinmune en el sistema circadiano de ratones.*
- ☒ *Analizar las interacciones neuroinmunes del sistema circadiano de ratón en condiciones patológicas con particular énfasis en el rol del sistema circadiano en el proceso de sepsis en ratones.*

Materiales y Métodos

4.1. Animales

Se utilizaron ratones C57BL/6 (*Mus musculus*) criados en nuestra colonia bajo un fotoperíodo de 12:12 (luz:oscuridad) (encendido de luces a las 8:00 horas) con libre acceso a comida (alimento balanceado) y agua. Los experimentos se realizaron con machos adultos (27-32 grs). En el caso del registro bajo condiciones de luz-oscuridad (L:O) se utilizó como referencia la hora de apagado de las luces, denominada por convención hora del sincronizador o zeitgeber (*zeitgeber time*) 12 (ZT 12). Bajo condiciones de oscuridad constante (O:O) el horario de referencia fue el del comienzo de la actividad locomotora de los animales, que se fijó convencionalmente como hora circadiana (*circadian time*) 12 (CT12)

4.2. Registro de actividad locomotora en rueda.

Adquisición de datos de actividad. La actividad locomotora fue registrada mediante un sistema de adquisición de datos Dataquest III versión 3.1 (Minimitter Co., Inc., Sunriver, OR) acoplado a matrices de consolidación BCM 100 (Data Sciences International). El almacenamiento de datos se realizó en una computadora PC.

Medición de actividad locomotora en rueda. Los animales se colocaron en jaulas individuales (con alimento y agua *ad libitum*) provistas de ruedas de locomoción de 15 cm. de diámetro. Cada rueda contiene un imán que es detectado por un sensor magnético cada vez que gira (un evento por vuelta). Todos los animales fueron expuestos inicialmente a un fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad (L:O) por dos semanas antes de ser transferidos a condiciones de oscuridad constante (O:O). Tanto en los ciclos L:O como en los ciclos O:O, los animales fueron expuestos en forma constante a iluminación roja de baja intensidad proveniente de diodos emisores de luz (LEDs). La iluminación con estos LEDs no es capaz de sincronizar a los

animales. En los experimentos que involucraron la administración de drogas i.c.v. los animales fueron colocados en las jaulas con rueda por una semana en L:O, canulados, transferidos nuevamente a las jaulas por dos semanas en ciclo L:O y luego transferidos a O:O. En primer lugar se administró LPS o vehículo en diversos horarios a lo largo del ciclo circadiano, a fin de determinar la curva de respuesta de fase. Para establecer interacciones con luz, se inyectaron con 100 μ l LPS 25 μ g/kg o se les administraron pulsos de luz (100 lux, 10 minutos) a la hora circadiana 15 (CT 15), con previa administración i.p. de 100 μ l de sulfasalazina 55 μ M o vehículo (solución fisiológica) en el caso que correspondiera.

El análisis de los cambios de fase fue realizado por al menos 3 observadores ciegos al procedimiento experimental mediante la estimación gráfica de la proyección de los comienzos de actividad en los 7 días previos y los 10 días posteriores (eliminando los 3 días inmediatamente posteriores) a la administración de las drogas. El cambio de fase fue definido como la diferencia entre ambas proyecciones al día de la manipulación.

4.3. Registro por telemetría de actividad general y temperatura corporal.

La temperatura corporal y la actividad locomotora general fueron registradas cada 5 minutos en ratones implantados intraperitonealmente con sensores de temperatura de tipo TA, VH-FM (Minimitter Co., Inc., Sunriver, OR). Luego de la implantación de los sensores, los ratones fueron alojados individualmente en jaulas plásticas apoyadas sobre placas receptoras RA-1010 (Data Sciences Inc.), capaces de recibir la señal de radio emitida por los sensores. La frecuencia de la señal es modulada por la temperatura a la que se encuentra el sensor de forma tal que a mayores temperaturas mayor es la frecuencia emitida. La frecuencia recibida en el receptor es enviada a la matriz de consolidación BCM-100 y de allí a la PC. De acuerdo a una calibración

previa del sensor, los datos de frecuencia son transformados a datos de temperatura (en grados centígrados) mediante el software de registro Dataquest III.

La actividad locomotora general es registrada como consecuencia del movimiento del sensor sobre la placa receptora. Este movimiento es detectado en función de la amplitud de la señal que varía de acuerdo a la posición del animal en la jaula.

Luego de dos semanas de descanso post-operatorio y verificando que los ritmos diarios de temperatura y actividad fueran normales se procedió a separar los ratones en tres grupos e inyectarlos con solución fisiológica o LPS en la dosis requerida para cada experimento.

4.4. Cirugías y perfusiones.

Implantación intraperitoneal de sensores para telemetría:

Los ratones fueron anestesiados profundamente por medio de la administración de una mezcla de Ketamina y Xilacina en dosis de 8 y 60 mg/kg respectivamente. Una vez perdido el reflejo podal, se realizó una incisión por divulsión de 1,5 cm de largo en la piel, se hizo un corte perpendicular anterior en la musculatura abdominal y se colocó un sensor desinfectado y recubierto en parafilm. Las incisiones fueron suturadas independientemente una de otra y los animales se colocaron nuevamente en una jaula con viruta esterilizada.

Colocación de cánulas guías para administración i.c.v:

Los animales fueron anestesiados profundamente con una mezcla de ketamina y xilacina en dosis de 10 y 70 mg/kg de respectivamente. Una vez perdido el reflejo podal, los animales fueron colocados en un aparato estereotáxico (Stoelting, Alemania) en el que se realizó la colocación de cánulas guía de 26 ga. (Plastics One, Roanoke, VA, USA.) en el tercer ventrículo (coordenadas relativas a Bregma:

anteroposterior -0,5mm, mediolateral 0.0mm, dorsoventral -5.0mm) fijadas al cráneo con acrílico dental. Luego de recuperados de la anestesia, se mantuvieron bajo un ciclo L:O por dos semanas, y luego se colocaron en luz roja tenue (< 1 lux).

Una vez finalizados los experimentos, la posición de las cánulas fue confirmada mediante la administración de colorante (tinta china) y posterior localización del área de inyección en cortes coronales de 50µm.

Perfusiones:

Los animales fueron anestesiados con una dosis letal de una mezcla de ketamina y xilacina en dosis de 15 y 100 mg/kg respectivamente. Una vez perdidos los reflejos, se realizó una incisión longitudinal en la pared abdominal y se cortó el diafragma ganando acceso al corazón. Se realizó una incisión en la aurícula derecha y se colocó una aguja en el ventrículo izquierdo por el que se pasaron PBS y fijador. Se pasaron primero 10 ml de PBS en 10 min. y luego 60 ml de fijador en 20 min. El fijador utilizado fue el de Karnowski que contiene paraformaldehído al 4% en buffer fosfato 0,1M a pH 7,4 a excepción del estudio de la barrera hematoencefálica en el que el contenido de paraformaldehído fue de 2% y se agregó glutaraldehído al 0,2%.

Una vez pasado el fijador, los cerebros fueron disecados y post-fijados por 4 horas en el mismo fijador a 4 grados centígrados.

4.5. Tratamientos.

Todos los animales utilizados en el presente trabajo fueron tratados una única vez. En los casos en los que los tratamientos debieron realizarse durante la noche o en

animales en ciclos O:O, todo el procedimiento fue llevado a cabo con luz roja de baja intensidad (>1Lux).

Pulsos de luz

Se utilizaron dos tipos de pulsos de luz en este trabajo: saturantes y no saturantes. Los pulsos saturantes consistieron en la exposición de los animales a una fuente de luz blanca fluorescente con una intensidad de 400 Lux durante 10 min. Los pulsos no saturantes consistieron en la exposición de los animales al mismo tipo de iluminación pero de 50 Lux durante 5 min.

Administración intraperitoneal de LPS, Sulfasalazina y vehículo.

Las administraciones intraperitoneales fueron realizadas con jeringas de tuberculina y agujas de 25 ga. En todos los casos el volumen total administrado fue de 100µl y las soluciones fueron llevadas a temperatura ambiente antes de su administración.

Las dosis de LPS i.p. utilizadas en este trabajo fueron de 5, 25 y 250 µg/kg en la elaboración de la CRF de LPS, el estudio de la relación dosis:respuesta, el análisis del efecto de LPS sobre la temperatura corporal y la inducción de citoquinas proinflamatorias. Las dosis utilizadas para estudiar el efecto del LPS sobre la integridad de la barrera hematoencefálica fueron de 25 y 500 µg/kg. Los estudios vinculados a procesos de sepsis fueron realizados con una dosis de 300µg/kg. En todos los casos el LPS fue administrado con solución fisiológica apirogénica comercial (salina) como vehículo. Los animales control fueron tratados con esta solución fisiológica sin LPS. En todos los casos el tratamiento con LPS fue agudo con una administración única.

El tratamiento con sulfasalazina se realizó una hora antes de la administración de LPS i.p. La droga fue disuelta en dimetilsulfóxido (DMSO) 15% en salina y llevada a pH 7,4 mediante el agregado de NaOH. Como vehículo se utilizó DMSO 15% en salina a pH 7,4.

Administración endovenosa de LPS y peroxidasa.

En todos los casos el volumen de solución inyectado por vía endovenosa fue de 50µl. Los animales fueron colocados en un cepo para ratones, la cola fue sumergida en agua a 45 grados por 3 min. y la inyección se realizó por las venas laterales de la cola con una jeringa de tuberculina con una aguja de 27ga.

Para estudiar el efecto de la administración endovenosa de LPS sobre los ritmos de actividad locomotora en rueda, se utilizó una dosis de LPS de 25µg/kg o el mismo volumen de vehículo.

Para realizar la técnica de Hanker-Yates se administraron i.v. 0,4µg de peroxidasa III disuelta en salina, una hora antes de tratar a los animales con LPS i.p o con vehículo i.p.

Administración intracerebroventricular de TNF α , IL-1 β y vehículo.

En todos los casos se utilizaron inyectores de 28 ga. (Plastics One) y la administración se realizó con jeringas Hamilton de 5µl de capacidad total. El volumen administrado fue de 1µl con un flujo aproximado de 0,2 µl/min. Una vez administrada todo el volumen se dejó el inyector colocado durante 2 min. y luego se retiró lentamente. Una vez colocado el inyector los animales dispusieron de libertad de movimientos durante todo el tratamiento.

4.6. Extracción de suero, tejidos y mRNA total.

Con el objeto de medir la expresión de citoquinas proinflamatorias en respuesta al tratamiento con LPS, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical 90 min. después del tratamiento. Se les extrajo la mayor cantidad de sangre posible (400 µl aproximadamente) y el bazo. La sangre se incubó a 37 °C durante media hora, se la centrifugó a 800 rpm. por 5 min. y se extrajo el sobrenadante (suero) que fue inmediatamente congelado a -80 °C hasta su utilización. Los bazos fueron cortados en dos mitades, una fue congelada inmediatamente a -80 °C y la otra utilizada para extraer su mRNA total.

Para extraer el mRNA total de bazo se homogeneizaron los fragmentos de bazo en un homogenizador vidrio/vidrio (Wheaton) con Trizol (Sigma) a razón de 1 ml por gramo de tejido.

4.7. Tinciones inmunohistoquímicas.

Para determinar la inmunoreactividad de cFos, GFAP, p65 y p50 en los núcleos supraquiasmáticos de ratones o en cultivos primarios de astrocitos se realizó inmunohistoquímica (IHC) de corte coronales de cerebro e inmunocitoquímica (ICC) de cultivos primarios de astrocitos. Las ICCs de los cultivos se desarrollaron con los mismos protocolos que los utilizados para los cortes de cerebro a excepción del buffer utilizado para la incubaciones que fue PB en lugar de PBS y que la fijación se realizó sumergiendo los vidrios de cultivo en paraformaldehído 4% por 4 min.

Una vez fijados los cerebros fueron transferidos a una solución de sacarosa al 30% durante 48 h. En un crióstato se obtuvieron secciones coronales de 25 µm conteniendo los NSQ, las cuales fueron lavadas en PBS con tritón 0,3% y bloqueadas luego por 90

min. en PBS conteniendo 1% BSA, Tritón X-100 0.3% y 5% de suero no inmune de caballo. Finalizado el bloqueo, fueron incubadas 48 horas en presencia de anticuerpo primario. Luego se lavaron los cortes en PBS y se incubaron 1 hora con anticuerpo secundario universal biotinilado o con anticuerpo secundario anti-conejo unido a un fluoróforo.

En todos los casos se realizaron controles negativos en los que no se incubó con anticuerpo primario o con anticuerpo secundario.

Anticuerpos

Los anticuerpos anti p65, anti p50 y anti cFOS utilizados en el presente trabajo fueron anticuerpos policlonales obtenidos en conejo de Santa Cruz Co., Inc. El anticuerpo anti GFAP es un anticuerpo anti GFAP de vaca, obtenido de Dako Inc. Los anticuerpos secundarios fueron obtenidos en todos los casos de Vector Laboratories.

El anticuerpo anti p65 fue utilizado en una dilución de 1:1200, el de p50 en 1:500, el de cFOS 1:5000 y el de GFAP en 1:1000. El anticuerpo secundario universal fue utilizado en una dilución de 1:250 y los secundarios fluorescentes en 1:500.

Revelado

Para el revelado de los cortes incubados con anticuerpos primario y anti IgG biotinilado, se utilizó el kit comercial ABC Universal *elite* proveniente de Vector Laboratories siguiendo las instrucciones del fabricante. El cromógeno utilizado para la visualización de la actividad peroxidasa fue diaminobencidina (DAB).

4.8. Tinción de Hanker-Yates para analizar la integridad de la barrera hematoencefálica.

Una vez fijados en fijador de Karnovsky y criopreservados en sacarosa al 30%, los cerebros fueron cortados en un crióstato en secciones coronales de 45 µm de espesor y procesados en el mismo día. Los cortes fueron lavados en buffer fosfato y luego incubados por 10 min. en una solución de pre-reacción conteniendo 6 partes de CoCl al 1%, 4 partes de NiS:NH₃ al 1% y una parte de solución de Hanker -Yates (HY, p-fenilendiamina al 0,05%, catecol al 0,1% en solución de cacodilato conteniendo: HCl 0,04N, cacodilato 1,07%, pH5,1). Luego de 2 lavados de 2 min. en PB, se incubaron por 15 min. en solución de HY a la que se le agregó previamente H₂O₂ (50 µl cada 100 ml de HY).

Luego de ser lavados en PB, los cortes fueron montados en portaobjetos gelatinizados, secados a temperatura ambiente, deshidratados y cubiertos con cubreobjetos en bálsamo de Canadá sintético.

4.9. Hibridación in situ

Se sacrificaron los animales y los cerebros se sumergieron en isopentano a -35 °C por 5 minutos. Se mantuvieron dentro de hielo seco por 10 minutos y luego se colocaron a -80 °C en aluminio libre de RNAsa. Cortes coronales de 14 µm conteniendo los NSQ se montaron y mantuvieron a -80°C hasta el momento de la fijación. Todos los reactivos y soluciones utilizadas se encontraban libres de RNAsas. Se fijaron los cortes montados en paraformaldehído 4% en buffer fosfato 0.1M por 5 minutos. Se lavaron dos veces en solución SSC 2x. Se acetilaron las muestras en presencia de trietanolamina HCl/ anhídrido acético por 10 minutos y rápidamente se lavaron en SSC 2x. Luego de deshidratar y delipidar las muestras se prehibridaron en una solución 50 % SSC 4x, 50% formamida desionizada durante 1 hora. La hibridación se realizó con buffer de hibridación (4 % v/v dextran sulfato, 20 % v/v formamida desionizada, 4 % SSC 20x, 0.4 % solución Denhart, 0.02 % tRNA, 0.2 % DNA espermatozoos de salmón) con 0.5 a 1x10⁶ dpm de sonda marcada con ³⁵S por portaobjetos a 55 °C durante 20 horas. Luego de la incubación se lavaron los cortes 2

veces en solución SSC durante 10 minutos. Se lavaron en formamida no desionizada 50 % en SSC por 5 minutos a 52°C. Se lavaron nuevamente en SSC 2x durante 5 minutos 2 veces y se incubaron por 30 minutos a 37°C en buffer con RNAsa (100µg/ml) para eliminar la sonda no hibridada. Se lavaron los preparados con formamida 50% por 5 minutos a 52 °C y luego se deshidrataron y se expusieron durante una semana con Hyperfilm (Amersham).

4.10. Northern blot de IL-1β.

Para estudiar la expresión de IL-1β en respuesta a la administración i.p. de LPS, se extrajo RNA total de bazo y de NSQ de animales tratados con LPS o con solución fisiológica. La concentración del RNA obtenido fue determinada por su absorción a 260 nm y su pureza determinada por la relación de absorbancias a 260nm con respecto a 280 nm. Una vez medida su concentración, las muestras fueron desnaturalizadas en un buffer de siembra (MOPS 0,04 M, pH 7; AcNa 0,01M; EDTA 1mM; formaldehído 3% y formamida desionizada 50%) a 65°C por 15 min. Las muestras fueron sometidas luego a electroforesis en geles de agarosa al 1,2% en condiciones desnaturalizantes (MOPS 0,04M, pH 7; AcNa 0,01M, EDTA 1mM, formaldehído 6%) sembrando 15 µg de RNA por calle. Finalizada la corrida electroforética se realizó una transferencia por capilaridad a membranas de nitrocelulosa (Amersham). Luego de la transferencia la membrana fue lavada en buffer SSC 2X y luego se fijó el RNA a la membrana por calor, colocándola en una estufa a 190°C por dos horas.

A continuación la membrana fue expuesta a la hibridación con una sonda específica para IL-1β marcada radiactivamente con ³²P por el método de *random priming*. Brevemente, 50 ng de sonda de DNA fueron incubados por 30 min. a 37 °C en presencia de 3µl de dNTPs (1 de dATP, 1 de dTTP y 1 de dGTP), 50 µCi de dCTP, α³²P y enzima Klenow. El proceso de hibridación se realizó en un horno de

hibridación por un período de 24 horas a una temperatura de 45°C. Luego de la hibridación las membranas fueron sometidas a autoradiografías en casetes con placas amplificadoras a -70°C por 24 horas.

4.11. Ensayo biológico para TNF α .

Cultivos celulares de la línea L929 fueron utilizados para realizar un ensayo biológico con el fin de determinar la actividad de TNF α en suero de animales tratados con LPS. Para medir la actividad de TNF se realizaron cultivos celulares en placas de 96 pocillos. Se sembraron 15.000 células por pocillo y se las dejó crecer por 24 horas hasta llegar a una confluencia del 80% en medio de cultivo esencial mínimo (MEM) de baja glucosa (2%) (GIBCO). Las células fueron sensibilizadas con actinomicina D (0,25 μ g/ml) y luego se les agregó suero de animales tratados con LPS o con solución fisiológica en diluciones seriadas al 50%. Se realizaron dos curvas control, una con TNF α y la otra con TNF α y suero de animales control. Una vez estimuladas, las células se dejaron crecer por 16 horas y luego se las sometió a una tinción con cristal violeta que permite determinar la cantidad relativa de células en cada pocillo. Una vez teñidas las células se extrajo el colorante incorporado con una solución de ácido acético al 33% y se midió la absorbancia de cada pocillo a una longitud de onda de 535nm en un lector de ELISA. La absorbancia se correlaciona en forma directa con la concentración de colorante que se correlaciona a su vez con la cantidad de células vivas presentes en el pocillo en el momento de realizar la tinción.

En cada placa de 96, uno de los pocillos no fue sembrado con el objeto de tomarlo como blanco de la absorción de colorante por parte del plástico, tres pocillos sembrados fueron mantenidos sin tratamiento y otros tres fueron tratados únicamente con actinomicina D para tener en cuenta el efecto de esta droga sobre el crecimiento celular. La viabilidad en las células tratadas únicamente con actinomicina fue tomada

como una viabilidad del 100% y fue utilizada para comparar los grupos tratados. De cada muestra de suero se realizó por triplicado una dilución seriada al 50% comenzando con una dilución inicial de 1:20.

4.12. Ensayos en cultivos primarios de astrocitos derivados de NSQ.

Obtención de los cultivos primarios: Para la preparación de los cultivos primarios se utilizaron ratones neonatos de 4 a 5 días postnatales. Las crías fueron deacapitadas y las cabezas sumergidas en ETOH 70% por 5 min. Luego los cerebros fueron disecados y, utilizando material de microcirugía, se extrajo una porción de tejido de la región medio-basal del hipotálamo conteniendo a los NSQ.

Los fragmentos de tejido fueron lavados con medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino y luego con PBS para eliminar el suero presente. Una vez lavados, se los incubó en tripsina por 20 min. a 37 grados y luego se los disgregó mecánicamente hasta lograr una suspensión homogénea. La disgregación mecánica se realizó pasando la suspensión por pipetas Pasteur de vidrio con diámetros decrecientes.

Una vez finalizada la disgregación, las células fueron sembradas en placas de cultivo para células eucariotas. Los cultivos obtenidos para inmunofluorescencia fueron realizados en las mismas placas conteniendo cubreobjetos de vidrio pretratados. Los cubreobjetos de 18 mm x 18 mm fueron lavados con detergente no iónico (GT Lab), seguido de alcohol 96% y luego secados e incubados en Ácido Nítrico puro durante 12 h. Este tratamiento mejora la adhesión de las células al vidrio (Goslin y Banker 1991). Luego se realizaron lavados con agua miliQ, 2 de 1 hora y 2 de 30 minutos, para eliminar los restos de ácido nítrico. Una vez realizados dichos lavados, los cubreobjetos fueron secados durante 1 hora a 60 °C en estufa y luego esterilizados durante al menos 4 horas a 200 °C.

El medio de cultivo utilizado fue en todos los casos DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10% y bicarbonato de sodio para regular el pH.

Ensayo de actividad κB en cultivo de células de NSQ

Transfección por lipofectamina.

Para las transfecciones se crecieron las células en placas de seis pocillos en medio DMEM suplementado a una densidad inicial de 3×10^5 células/well. A las 24 horas se procedió a la transfección utilizando lipofectamina (Gibco BRL), con una masa total de DNA de 3-4 μg . La concentración óptima de lipofectamina es de 8 μl por cada 3 μg de DNA, y en los casos de las transfecciones que requerían 4 μg se utilizaron 12 μl de lipofectamina.

Se mezclaron 100 μl de DMEM que contienen 3-4 μg de DNA plasmídico (incluyendo 0.5 μg de gen plásmido reportero y 0.5 μg del plásmido RSV- β -gal en todas las transfecciones que se hicieron para analizar la expresión de genes reporteros) con 100 μl de DMEM conteniendo 8-12 μl de lipofectamina (Gibco BRL) en un tubo de transfección. Se utilizó DMEM sin antibióticos ni suero. Se dejó 45 minutos en la campana de flujo laminar para permitir la adsorción del DNA a los lípidos. Se agregaron 800 μl de DMEM (volumen final de 1 ml). Se lavó 2 veces con PBS 1X para eliminar los restos de suero y antibióticos, y se agregó la mezcla de DNA con lipofectamina a cada pocillo.

Estimulación con LPS, TNF α e IL-1

Luego de 5 horas de transfección el medio se aspiró el sobrenadante y se agregaron 1,5 ml de DMEM suplementado con suero libre de esteroides al 10%.

A las 24 horas de la transfección se procedió a la estimulación de las células con LPS 0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, TNF α 20ng/ml o IL-1 5 ng/ml.

Análisis de expresión de genes reporteros

Cosecha de las células

Se cosecharon las células 24 horas luego de la estimulación, se lavaron previamente 2 veces con *PBS 1X*. Se agregaron 200 μ l de buffer de lisis (*Reporter Lysis Buffer* comercial de Promega), que lisa completamente las células. Se dejó actuar por 15 minutos y luego se colectó en un tubo eppendorf. Se eliminaron los restos celulares por centrifugación (5 minutos a 10.000 rpm) y se pasó el sobrenadante (lisado celular) a un nuevo tubo eppendorf.

Medición de la actividad β -galactosidasa (β -gal)

Para medir la actividad presente en los extractos de células transfectadas, se incubaron 10-20 μ l de extracto con el sustrato cromogénico ONPG (orto-nitro-fenil-galactósido) en *buffer β -gal 1X*, en 100 μ l de volumen final durante 1 hora, a 37 °C. Luego se detuvo la reacción con el agregado de 100 μ l de Na_2CO_3 1M; se cuantificó la aparición del producto coloreado (orto-nitro-fenol) midiendo la absorbancia a 415 nm en un lector de Elisa.

Medición de la actividad luciferasa

Para medir la actividad presente en los extractos se tomaron 15 μ l de extracto y se pasó a tubos para luminómetro de 5 ml. Luego se agregaron 50 μ l del reactivo para el ensayo de luciferasa (kit: *Luciferase Assay System Freezer 1-Pack*, de Promega).

Se anotaron los valores obtenidos de las Unidades Relativas de Luciferasa (URL) y se procedió al análisis de los datos, normalizando estos valores con los obtenidos para el ensayo de β -galactosidasa, es decir el cociente entre URL y los valores de β -gal.

Se realizó un control utilizando 15 μ l de *Reporter Lysis Buffer* en lugar de extracto celular.

4.13. Drogas

Todas las drogas utilizadas en el presente trabajo fueron obtenidas en Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EE.UU. a excepción de aquellas en las que detallamos su procedencia.

4.14. Análisis estadístico

En todos los casos los cambios de fase del ritmo de actividad locomotora en rueda fueron estimados visualmente por tres observadores independientes que desconocían las condiciones experimentales (ciegos). Tanto la curva de respuesta de fase para LPS como el experimento de coadministración de luz y LPS fueron analizados utilizando ANOVA de dos vías. Los experimentos de mortalidad inducida por LPS fueron analizados utilizando la prueba exacta de Fisher y análisis de Kaplan-Meyer. Los datos extraídos de los demás experimentos fueron analizados utilizando ANOVA de una vía y post tests de Bonferroni o Dunnett.

En todos los casos se presentan los datos como media \pm desviación estándar y los valores de $p < 0,05$ fueron tomados como estadísticamente significativos.

Resultados

5. Resultados:

5.1. Caracterización del sistema circadiano de ratones C57BL/6:

Antes de poder estudiar la posible interacción entre los sistemas inmune y circadiano en ratones C57BL/6, fue necesario caracterizar algunos de los parámetros y comportamientos básicos del sistema circadiano de los animales que utilizamos, ya que éstos no habían sido utilizados con anterioridad en trabajos de nuestro laboratorio. En la figura 5.1a se puede ver que el análisis de los ritmos de actividad locomotora en rueda mostró, como era de esperarse en condiciones L:O, que los animales presentan un claro comportamiento de tipo nocturno. En estas mismas condiciones, la mayoría de los animales presentan escasos episodios de actividad diurna de muy baja amplitud y en general los episodios de actividad nocturna fueron de mayor amplitud al principio o al final de la noche. En concordancia con los resultados de otros laboratorios, en condiciones de oscuridad constante los animales mantuvieron el ritmo de actividad locomotora sin diferencias significativas en la amplitud con respecto a las condiciones de L:O y con un período de libre curso de $23,6 \pm 0,06$ horas (tabla 5.1, figura 5.1b y c) (Ebihara *et al.* 1978; Welsh *et al.* 1986; Possidente y Stephan 1988; Schwartz y Zimmerman 1990).

El ritmo de temperatura en condiciones L:O mostró también máximos nocturnos coincidentes con los episodios de actividad, una amplitud de $0,88 \pm 0,055$ °C y un mesor promedio de $36,38 \pm 0,03$ °C (figura 5.2a y b). En O:O, la amplitud no presentó variaciones apreciables con respecto a L:O ($0,768 \pm 0,05$) y el período en libre curso fue similar al obtenido para la actividad locomotora en rueda ($23,68 \pm 0,09$ horas) (figura 5.2c y d). Tanto en condiciones de L:O como O:O, la actividad general de los animales implantados con sensores intraperitoneales presentó más episodios de

aumentos diurnos que la actividad locomotora en rueda y el inicio de la actividad no fue tan marcado.

La respuesta a la luz también fue la esperada, obteniendo retrasos de fase al administrar pulsos de luz saturante (10 min., 400 Lux) a CT15 y adelantos al administrar pulsos de la misma intensidad y duración a CT 21 (figura 5.3a y b). En conjunto, estos resultados indican que el sistema circadiano de los ratones utilizados en este trabajo tiene un comportamiento compatible a lo publicado previamente para ratones C57BL/6.

Tabla 5.1. Períodos en libre curso de C57BL/6 y otras cepas endocriadas.

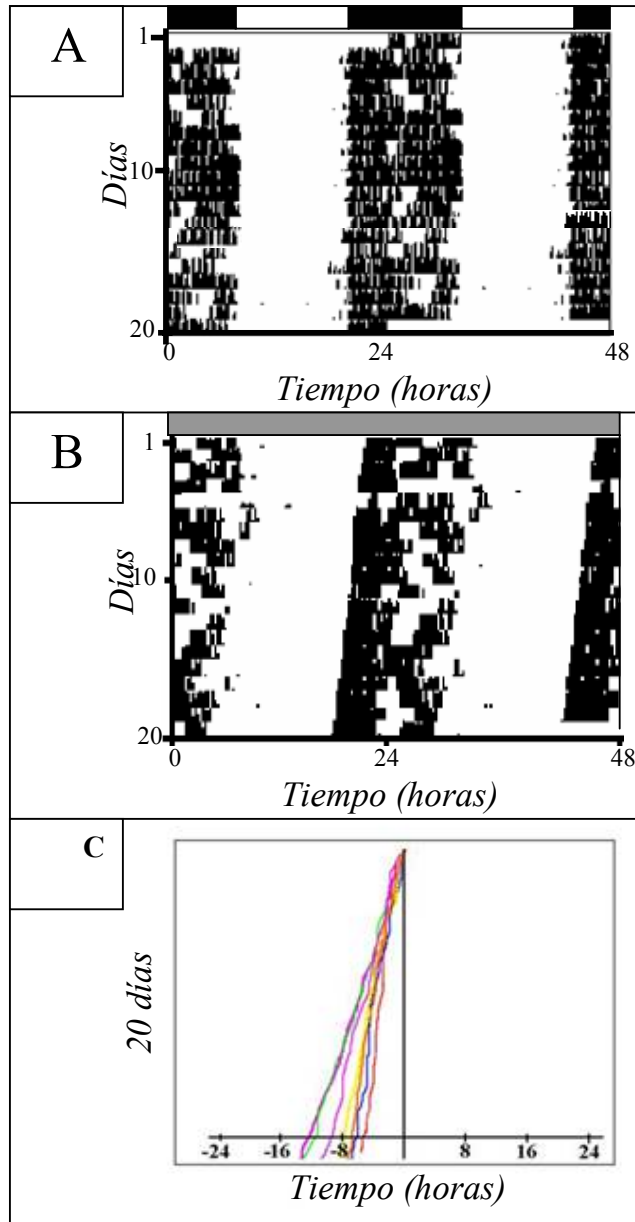
Cepa	τ (horas) (esta tesis)	τ publicado (horas)	Referencia
C57BL/6	23,6 ^a	23,77	Schwartz y Zimmerman, 1990
	23,68 ^b	23,59 23,73	Ebihara <i>et al.</i> , 1978 Possidente y Stephan, 1988
C57BL/10		23,43	Schwartz y Zimmerman, 1990
Balb/C		23,5	Welsh <i>et al.</i> , 1986
		22,94	Schwartz y Zimmerman, 1990
		22,9	Possidente y Stephan, 1988

a: Actividad locomotora en rueda

b: Actividad general registrada por telemetría

Figura 5.1. Caracterización del sistema circadiano de ratones C57BL/6.

Caracterización básica del sistema circadiano de los ratones C57BL/6. **A)** Actograma doble de la actividad locomotora en rueda de un ratón mantenido en un ciclo L:O con 12 horas de luz (barras blancas arriba del actograma) y 12 horas de oscuridad (barras negras arriba del actograma). Nótese como el inicio de la actividad se sincroniza con el apagado de las luces a las 20 horas (ZT 12). **B)** Actograma doble de la actividad locomotora en rueda de un ratón mantenido en un ciclo O:O. Nótese como la fase determinada por el inicio de la actividad (CT 12) se va adelantando aproximadamente 25 minutos por día dado que el período endógeno de estos animales es menor a 24 horas. **C)** Diagrama que representa las fases de inicio de la actividad locomotora en rueda de 7 ratones mantenidos en jaulas individuales. El período promedio para estos animales fue de $23,6 \pm 0,11$ horas y las diferencias entre distintos individuos es realmente baja como se puede apreciar por la baja dispersión observada en la figura.



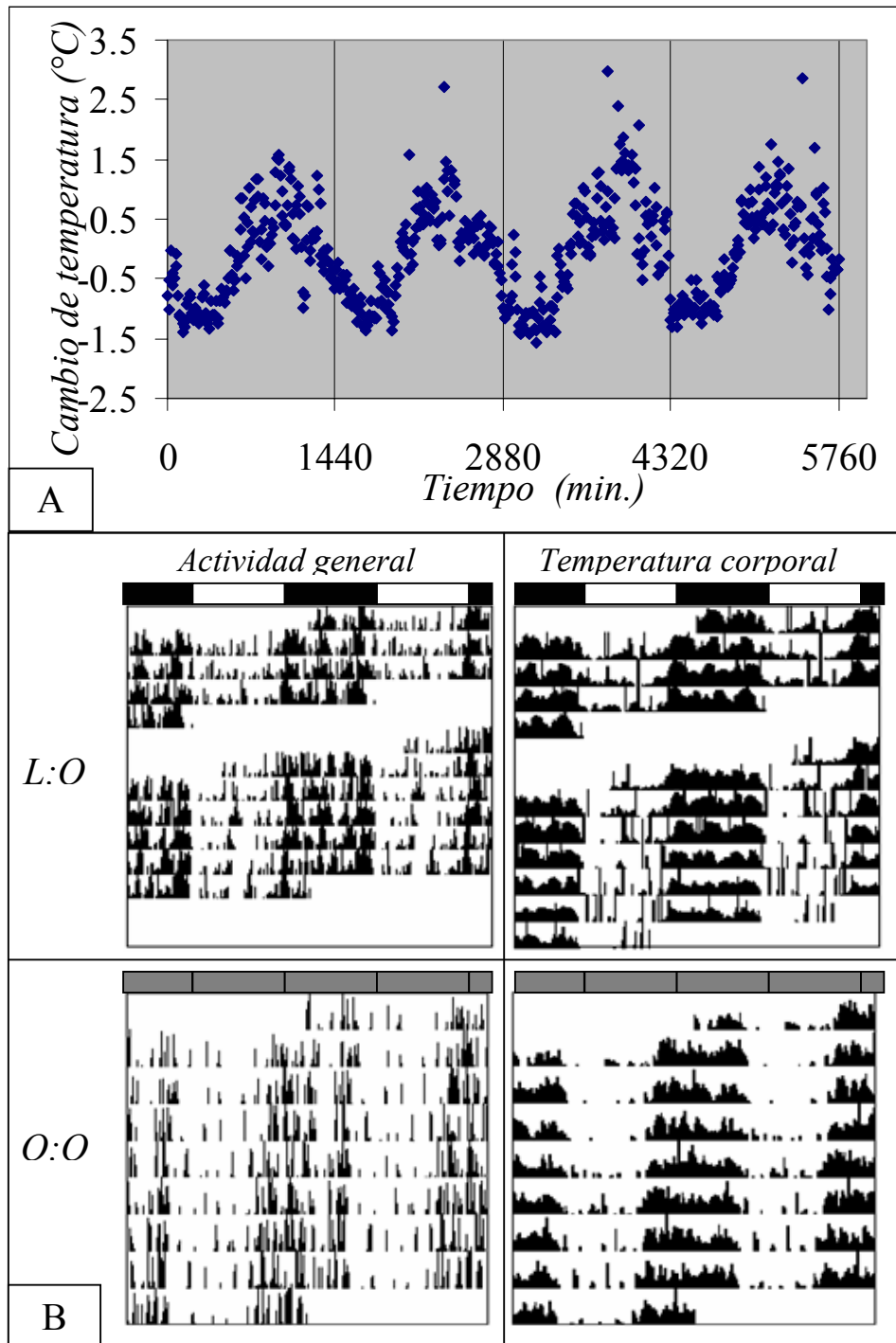


Figura 5.2. Registro de temperatura corporal y actividad general por telemetría. **A)** Termograma representativo de un animal en L:O. **B)** Actogramas dobles representativos de animales en L:O (arriba) y O:O (abajo). Los actogramas de la izquierda son de actividad general y los de la derecha de temperatura corporal. Las barras superiores de los actogramas representan el ciclo de luz (blanco) y oscuridad (negro) u oscuridad constante (gris).

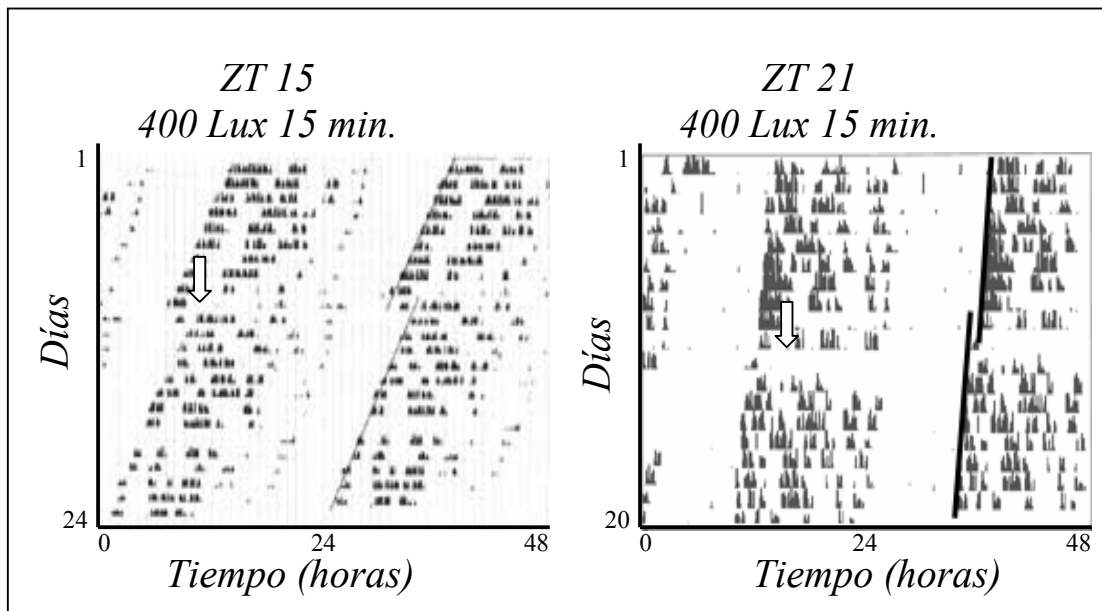


Figura 5.3. *Los pulsos de luz durante la noche inducen cambios de fase.*

Actogramas dobles de actividad locomotora en rueda en los que se puede observar los cambios de fase inducidos por pulsos de luz saturantes durante la noche subjetiva. Los pulsos durante las primeras horas de la noche subjetiva (CT15) produjeron retrasos de fase (actograma de la izquierda) y los pulsos aplicados al final de la noche subjetiva produjeron adelantos (actograma de la derecha). El momento de los tratamientos esta indicado con flechas blancas. (n=4 para cada tratamiento).

5.2. LPS:

5.2.1. Curva de respuesta de fase.

Objetivo: Analizar el efecto de la administración de una dosis subpirogénica de LPS sobre el sistema circadiano del ratón.

Con el objeto de caracterizar la respuesta del sistema circadiano a la administración intraperitoneal de LPS, estudiamos en primer término el efecto de dicho tratamiento sobre el ritmo de actividad locomotora en rueda. Es necesario tener en cuenta que el efecto de cualquier estímulo puede variar de acuerdo con el horario en que se realice, por lo que se hace indispensable tratar animales en diversos horarios. Por lo tanto separamos los animales en 6 grupos, cada uno de los cuales fue tratado en un horario

circadiano diferente (CT 3, 7, 11, 15, 19 y 23). En cada grupo los animales fueron tratados con 100 μ l de solución fisiológica o de LPS (25 μ g/kg) y su actividad locomotora en rueda se registró por los siguientes 15 días. En los grupos inyectados durante la noche subjetiva (CT15, 19 y 23) ambos tratamientos produjeron un período de inactividad (enmascaramiento) comprendido entre los 15 y los 85 minutos en los animales tratados con vehículo y entre los 15 y los 540 minutos (9 horas) en los animales tratados con LPS (figura 5.4a.). El tiempo promedio de duración del enmascaramiento en los animales tratados con LPS fue de 375 ± 90 min. mientras que en los animales tratados con salina fue de 46 ± 26 min. El posterior análisis de los ritmos de actividad locomotora en rueda muestra que, además de la disminución transitoria en la amplitud, la administración intraperitoneal de LPS produce retrasos de fase de -43 ± 10 min. a CT 15 ($p < 0,05$ vs. solución fisiológica) pero no tiene efectos significativos cuando los ratones son tratados en otros horarios (figura 5.4b y c). Dentro de las 24 horas de tratados, todos los animales recuperaron su ritmo de actividad sin que hayamos podido encontrar diferencias ya sea en la amplitud, período o mesor. Estos resultados permiten postular que la administración intraperitoneal de LPS es capaz de sincronizar al sistema circadiano y sugieren que también podría modular la salida del mismo en forma aguda.

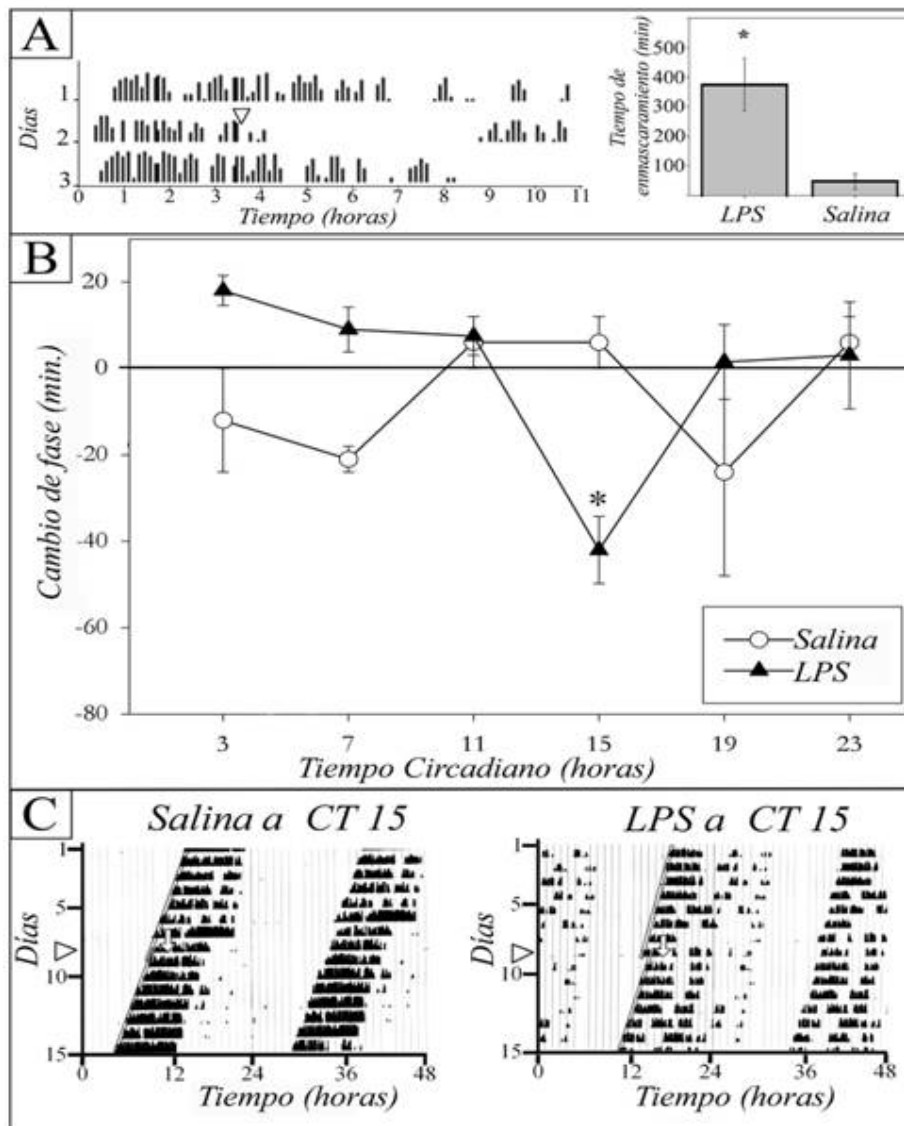


Figura 5.4. Efectos del LPS sobre el sistema circadiano del hámster.

A) La administración de LPS i.p. 25 μ g/kg produce un período de inactividad significativo cuando es administrado durante la noche subjetiva. El panel muestra a la izquierda un actograma ampliado en el que se ve únicamente el período de actividad. El triángulo vacío muestra el horario en el que se administró el LPS y cada barra representa aproximadamente 5 minutos. A la derecha del panel se muestra la cuantificación del efecto de enmascaramiento inducido por LPS a CT 15 con respecto al efecto de salina al mismo horario. B) CRF para LPS. Nótese los retrasos de tipo fóticos inducidos al administrar LPS 25 μ g/kg a CT 15. C) Actogramas dobles representativos de animales tratados con solución salina o LPS 25 μ g/kg a CT 15. El triángulo vacío a la izquierda de los actogramas muestra el día de la administración y la flecha blanca en los actogramas el horario del tratamiento. (n= 4-8 por tratamiento y horario).

5.2.2. Curva de dosis:

Objetivo Evaluar la dependencia de la dosis de endotoxina administrada a CT 15 en la respuesta de fase del ritmo de actividad locomotora

20 ratones fueron separados en cuatro grupos de individuos para evaluar si el retraso de fase inducido por LPS persiste en animales tratados con dosis menores y mayores a 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Los ratones recibieron vehículo o una de tres dosis diferentes de LPS a CT15. Las dosis de endotoxina utilizadas fueron 5, 25 y 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$. No observamos cambios de fase significativos en los animales tratados con vehículo o con LPS 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en tanto que los animales tratados con 25 y 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de LPS mostraron retrasos de fase de 45 ± 13 y 62 ± 19 minutos, respectivamente (figura 5.5.) ($p < 0,01$; ANOVA de una vía). La respuesta de los animales a las dosis de 25 y 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ no fueron significativamente diferentes entre sí (prueba de Bonferroni, $p > 0,05$).

5.2.3. Efectos sobre la temperatura corporal:

Objetivo Determinar el efecto de la administración de LPS a CT 15 sobre la temperatura corporal

Teniendo en cuenta que los ritmos de actividad locomotora en rueda pueden ser afectados por los cambios de temperatura corporal, analizamos mediante registros telemétricos el efecto de la administración de LPS i.p. sobre la temperatura corporal. Los ratones tratados con 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ mostraron una clara hipotermia (figura 5.6a.) que en algunos casos perduró por 7 horas y llegó a producir una disminución de $-3 \pm 0.5^\circ\text{C}$ grados con respecto a la temperatura normal ($p < 0.005$, ANOVA de una vía). Los ratones tratados con dosis más bajas de LPS (5 y 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$) no mostraron cambios significativos en su temperatura corporal (figura 5.6b.). Este resultado permite concluir que los cambios de fase observados en respuesta a la inyección de LPS a CT 15 no son consecuencia de la alteración de la temperatura corporal. Por otra parte este resultado nos llevó a descartar la utilización de concentraciones de LPS mayores a 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en los siguientes experimentos comportamentales, ya que resultaría difícil

poder discriminar entre los efectos vinculados a variables inmunológicas y aquellos causados simplemente por alteraciones de la temperatura corporal.

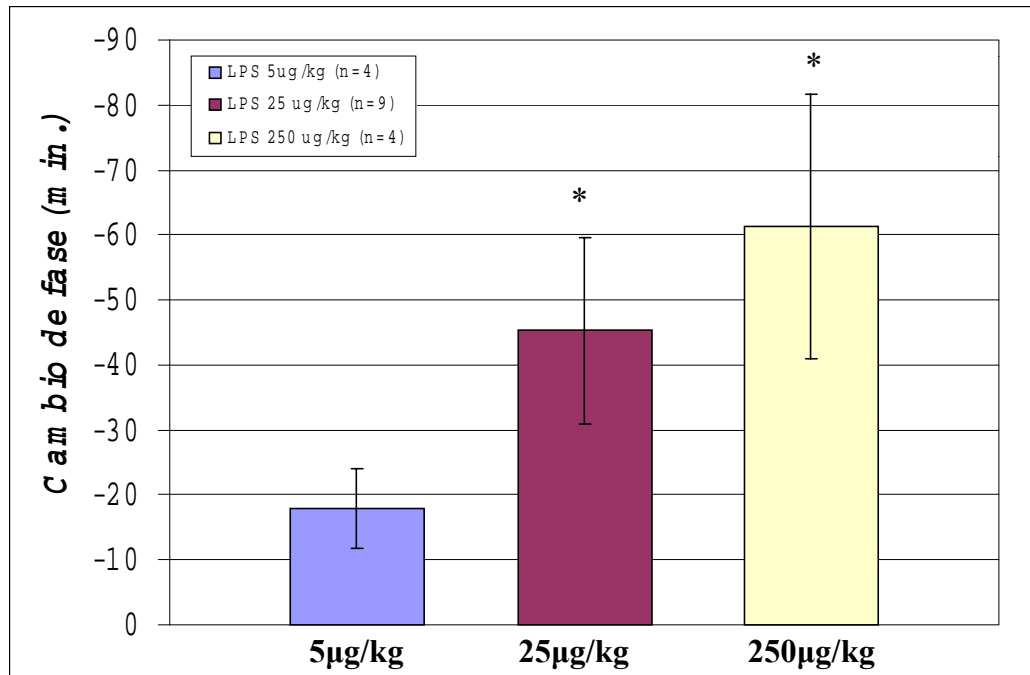


Figura 5.5. Curva de dosis-respuesta para la administración de LPS a CT 15.

Respuesta de cambio de fase inducido por la administración intraperitoneal de 3 dosis diferentes de LPS, (5, 25 y 250 µg/kg). Nótese el eje de las ordenadas que se encuentra invertido para facilitar la visualización. Los retrasos inducidos por la administración de LPS a CT 15 no presentaron una variación lineal en función de la dosis inyectada. Los asteriscos representan una diferencia significativa con respecto al valor 0. No se observaron diferencias significativas entre los grupos tratados con 25 y 250 µg/kg de LPS.

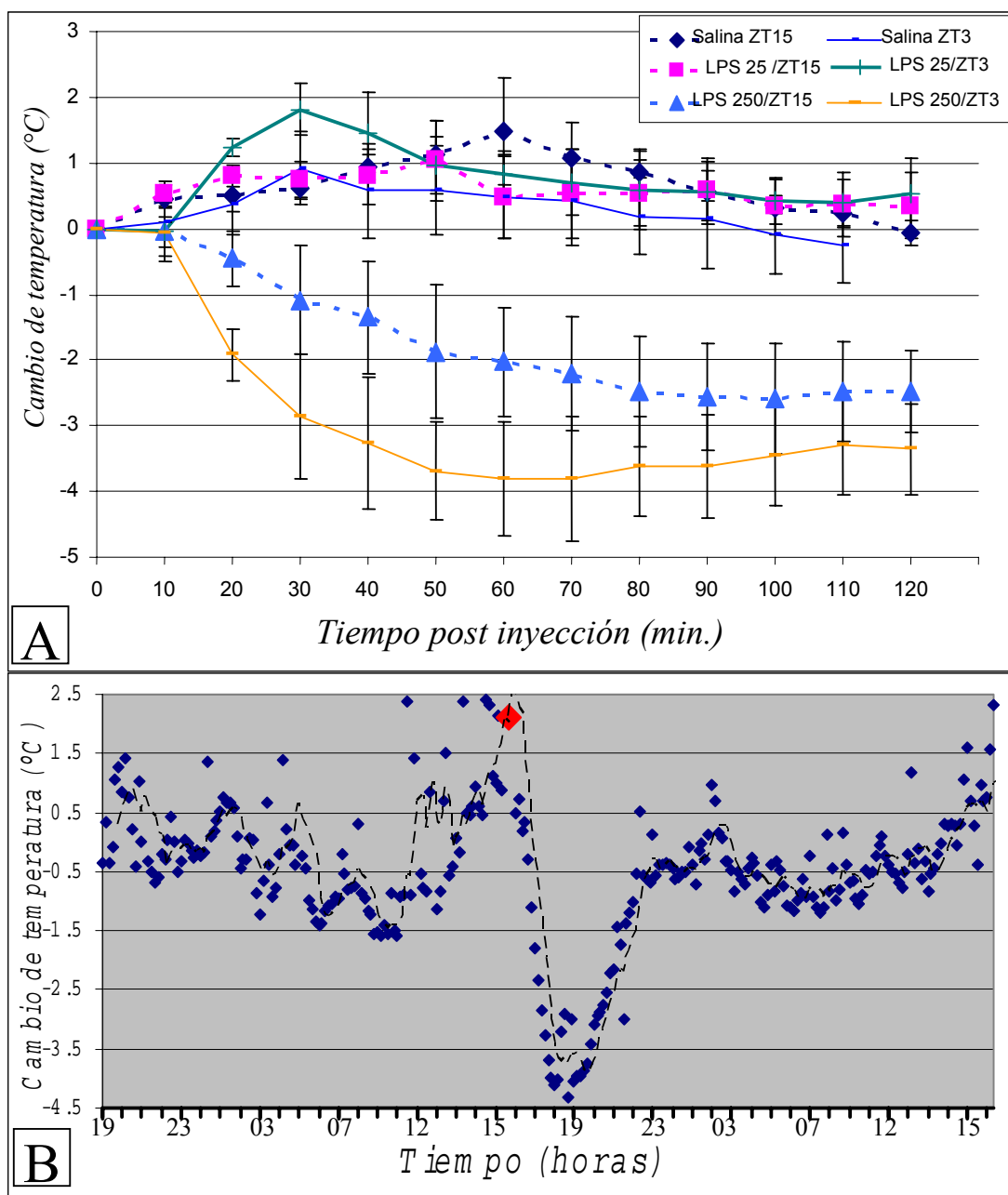


Figura 5.6. Efecto de la administración de LPS a distintas dosis y horarios.

A) Gráfica de los cambios temperatura corporal luego del tratamiento con salina, 25 o 250 µg/kg de LPS i.p. Los tratamientos fueron realizados a ZT 3 (líneas continuas) o a ZT15 (líneas punteadas). **B)** Cambios de la temperatura corporal de una animal tratado con LPS 250µg/kg i.p. Obsérvese la profunda hipotermia inducida en los primeros 20 min. luego del tratamiento y que persiste hasta aproximadamente 8 horas después. (n= 6 por tratamiento y horario)

5.2.4. Efectos sobre la barrera hematoencefálica:

Objetivo Analizar el efecto de la administración i.p. de LPS sobre la integridad de la barrera hematoencefálica.

El efecto de la administración de LPS i.p. sobre la integridad de la barrera hematoencefálica fue analizado en animales tratados con solución fisiológica, LPS 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ó LPS 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Mediante la técnica de tinción de Hanker-Yates es posible visualizar la presencia de peroxidasa (inyectada previamente por vía i.v.) por la aparición de un precipitado negro en el tejido. La aparición de precipitado marrón

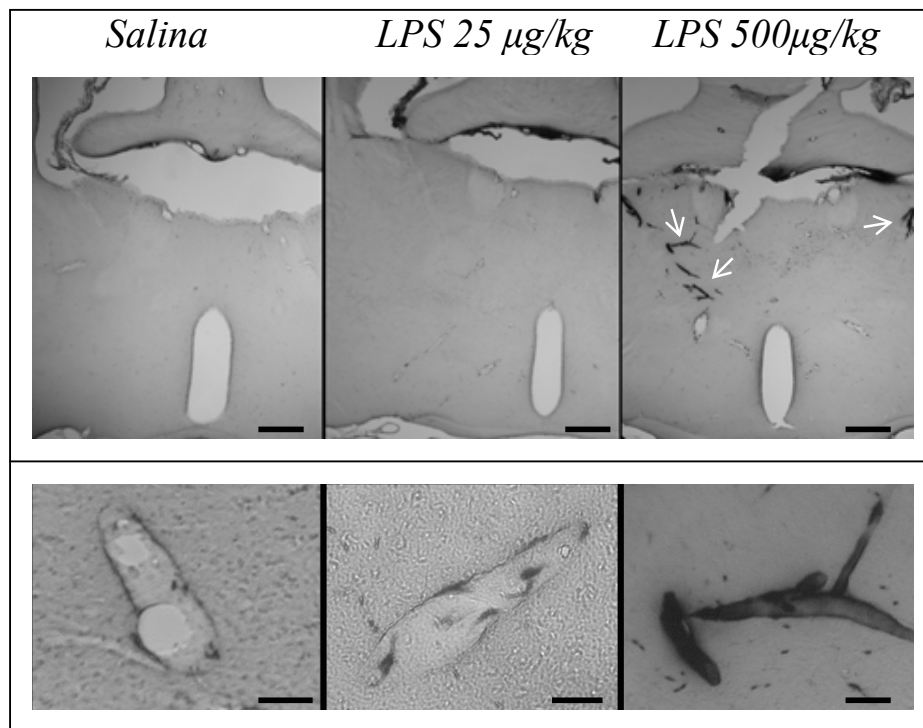


Figura 5.7. La administración de LPS (25 $\mu\text{g}/\text{kg}$) no produce alteraciones perceptibles en la barrera hematoencefálica.

La técnica de Hanker-Yates permite visualizar áreas en las que la integridad de la barrera hematoencefálica está afectada obteniendo un color marrón oscuro en las zonas en las que la peroxidasa administrada i.v. pudo ingresar al parénquima cerebral. En el panel superior se observan cortes coronales de animales tratados con salina, LPS 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$. En el panel inferior se observan detalles de los mismos cortes a mayor aumento donde se aprecia el estado normal de la vasculatura en los animales control o tratados con LPS en dosis bajas mientras que se ve claramente la difusión de la peroxidasa hacia el parénquima en los animales a los que se les administró una dosis alta de LPS. En animales tratados con salina o LPS 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ la barrera hematoencefálica no parece haber sido afectada. En contraste, en los animales tratados con una dosis alta de LPS se observan numerosas áreas en las que la barrera ha perdido su integridad (marcadas en las fotos con flechas blancas). En el panel superior la barra negra representa 500 μm y en el panel inferior 100 μm . (n=4 por tratamiento).

oscuro o negro por fuera de la vasculatura cerebral indica la existencia de fenestraciones en la barrera hematoencefálica.

Como se puede observar en la figura 5.7, en los cerebros de los animales tratados con solución salina ó LPS 25µg/kg no existen evidencias de trasvasación de la peroxidasa hacia el parénquima cerebral mientras que en los animales tratados con LPS 500 µg/kg existe una clara presencia de precipitados negros en amplias zonas del cerebro.

5.2.5. Administración endovenosa de LPS:

Objetivo Analizar si existen diferencias en la respuesta del sistema circadiano entre la administración de LPS i.p. e i.v.

Es de esperar que los resultados obtenidos tras el tratamiento con LPS difieran de acuerdo con la vía de administración empleada. Tanto los parámetros farmacocinéticos como farmacodinámicos del LPS varían entre la administración i.p. y la administración endovenosa, motivo por el cual estudiamos los efectos de una aplicación i.v. de LPS 25µg/kg (50µl) a CT 15. Los animales fueron separados en tres grupos que recibieron una inyección i.v. y otra i.p., ambas de 50µl. Un grupo (grupo i.v.) fue tratado con LPS i.v. y solución fisiológica i.p. Un segundo grupo (grupo i.p.) fue tratado con solución fisiológica i.v. y LPS i.p. y el tercer grupo (grupo control), fue tratado con solución fisiológica i.v. e i.p. El grupo control no mostró cambios de fase ($3,25 \pm 8,26$ min.) en tanto que los dos grupos tratados con LPS mostraron retrasos de fase que no fueron significativamente diferentes entre sí (ANOVA de una vía, $p < 0,001$; prueba de Dunnet ip. vs iv. $p > 0,5$). En el grupo i.p. observamos un cambio de fase de $-34 \pm 8,83$ min. (figura 5.8) similar al obtenido en experimentos anteriores para la misma dosis de LPS i.p., mientras que en el grupo i.v. el cambio de fase obtenido fue de $-32,5 \pm 4,57$ min. En ninguno de los grupos se observaron otros

cambios en los ritmos de actividad locomotora en rueda, a excepción de un período de inactividad luego del tratamiento que fue similar entre los grupos tratados con LPS y de menor duración en los animales control.

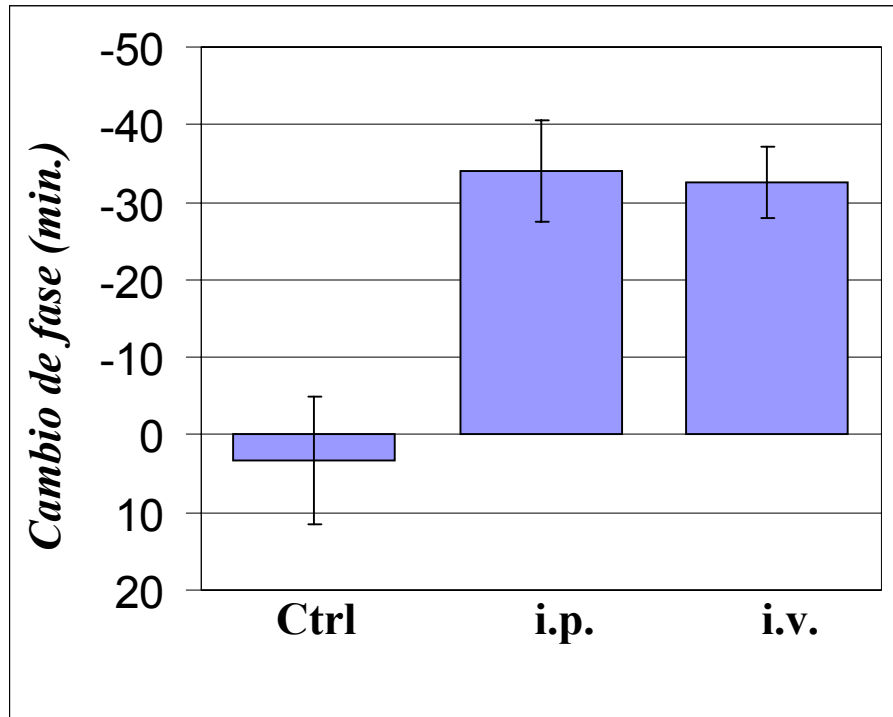


Figura 5.8. *La administración de LPS i.v. produce retrasos similares al LPS i.p.* La administración de LPS en un adosis de 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a CT 15 produce retrasos de fase similares del ritmo circadiano de actividad locomotora en rueda si es inyectada por vía endovenosa (grupo i.v.) o por intraperitoneal (grupo i.p.) . Los asteriscos muestran los grupos con cambios de fase significativos con respecto al grupo Ctrl. No se obtuvieron diferencias significativas entre ambos grupos tratados con LPS. (n= 4 por grupo)

5.2.6. *Coadministración con luz:*

Objetivo Determinar si existe interacción entre las vías activadas por luz y por LPS a CT15

Tanto la administración de LPS i.p. como la aplicación de pulsos de luz causan retrasos de fase del ritmo de actividad locomotora en rueda cuando son aplicados durante el comienzo de la noche subjetiva y tienen escaso o ningún efecto cuando son aplicados en otros horarios. Esto se traduce en curvas de respuesta de fase similares y posiblemente en vías de acción compartidas. Para evaluar si efectivamente la luz y el

LPS comparten vías de acción tratamos a los animales a CT 15 simultáneamente con luz y LPS i.p. (25µg/kg). En caso de existir interacción entre ambas vías el efecto tendría que ser no aditivo. Los animales fueron separados en 5 grupos de 5 animales cada uno y tratados con LPS (grupo LPS), un pulso de luz no saturante (grupo 50 Lux), un pulso de luz saturante (grupo 400 Lux), un pulso de luz no saturante y LPS (grupo LPS + 50 Lux) y un pulso de luz saturante junto a LPS (grupo LPS + 400 Lux). Los cambios de fase inducidos por LPS (-38 ± 7 min.), Luz 50 Lux (-39 ± 5 min.) y LPS + 50 Lux (-44 ± 12 min.) no mostraron diferencias significativas entre sí (figura 5.9). Tampoco observamos diferencias entre los grupos tratados con pulsos de luz de 400 Lux (-126 ± 24) y el grupo en el que LPS fue administrado conjuntamente con un pulso de luz de 400 Lux (-130 ± 32 min.). Por lo tanto no observamos aditividad en la respuesta de fase en los grupos en los que LPS y luz fueron coadministrados, lo que sugiere algún tipo de interacción entre las vías activadas por la luz y aquellas activadas por LPS i.p. Por otra parte, existen diferencias claras entre el efecto de la luz y el LPS ya que los pulsos de luz no producen el característico período de inactividad ni el *sickness behaviour* observado luego de la administración de LPS.

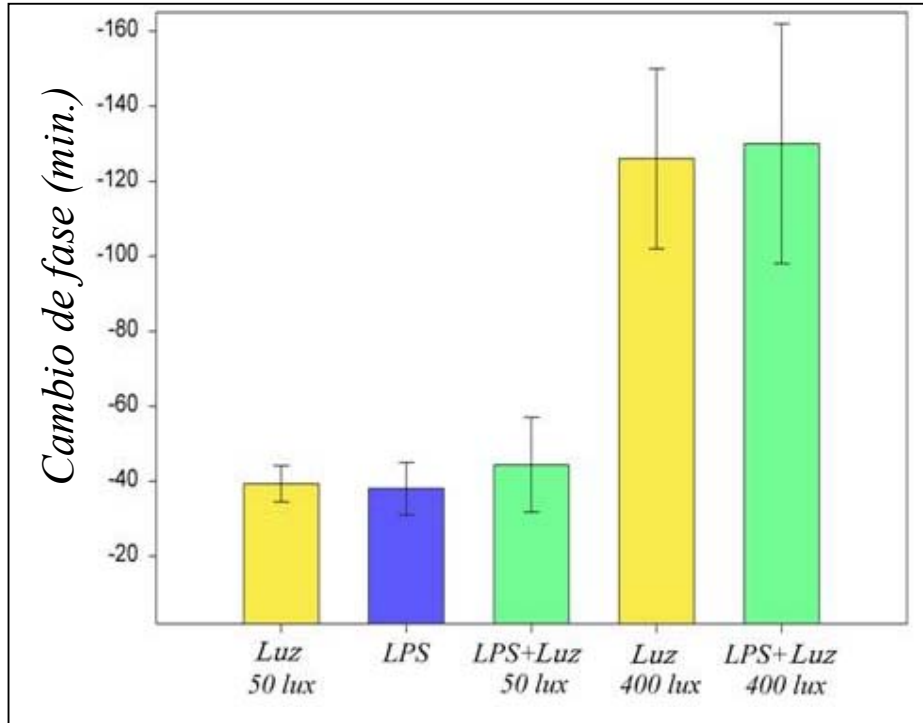


Figura 5.9. La coadministración de LPS con pulsos de luz tiene efectos no aditivos.

La administración de LPS (25µg/kg) en simultáneo con pulsos de luz no saturantes (50 Lux, 5 min.) o con pulsos saturantes (400 Lux, 15 min) no produce efectos aditivos evidentes. Esto sugiere la existencia de alguna interacción de ambas vías. (n=5 por grupo).

5.2.7. Activación de Fos en SCN y PVN en respuesta a LPS:

Objetivo: Determinar si el efecto del LPS sobre el sistema circadiano está vinculado a la activación de los NSQ.

Los pulsos de luz aplicados a CT 15 inducen la expresión de c-Fos en los NSQ (Colwell y Foster 1992; Castel *et al.* 1997; Yamazaki *et al.* 2002) y, dado que el LPS también induce retrasos de fase a CT 15 y parece interactuar con las vías activadas por la luz, estudiamos el efecto del LPS sobre la inducción de c-Fos en los NSQ. Para esto dividimos a los animales en tres grupos de 6 animales cada uno, que fueron tratados a ZT 15 con solución fisiológica (grupo salina), LPS ip. 25µg/kg (grupo LPS) y pulsos de luz de 50 Lux por 5 min. (grupo luz). 80 min. después del tratamiento los

animales fueron anestesiados y fijados con paraformaldehído por perfusión intracardiaca. Una vez disecados, los cerebros fueron congelados y cortados en secciones de 45 μm que fueron utilizadas para determinar la presencia de c-Fos por medio de técnicas inmunohistoquímicas. Las secciones obtenidas que contenían a los NSQ fueron divididas en tres grupos de acuerdo a su posición relativa en sentido anteroposterior. En las zonas anterior y posterior de los NSQ no se observaron diferencias significativas en número y distribución de células con inmunoreactividad positiva para c-Fos entre los diferentes tratamientos. En la zona medial, observamos una clara diferencia en la localización de células c-Fos positivas con una distribución predominantemente dorsal en los animales tratados con LPS y una distribución más amplia con predominancia ventral en los animales tratados con pulsos de luz no saturantes (figura 5.10). No encontramos diferencias significativas en el número de células c-Fos positivas entre los animales tratados con LPS y aquellos tratados con salina. Sin embargo las células positivas aparecen exclusivamente en la zona retinorecpiente en los animales tratados con salina mientras que aparecen en la zona dorsal en aquellos tratados con LPS.

Esta diferencia en la distribución de células c-Fos positivas sugiere que si bien existe una cierta interacción entre las vías activadas por la luz y por el LPS, ésta no se daría en un sustrato neuronal en común en la zona ventral de los NSQ, aunque abre la posibilidad de la existencia de una interacción entre ambas vías en la región dorsal de dichos núcleos.

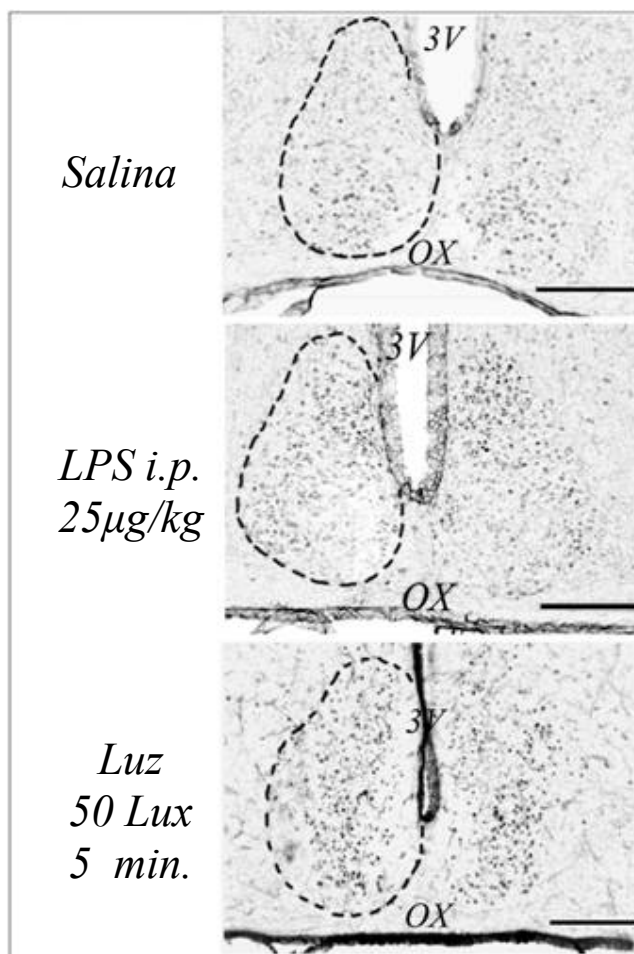


Figura 5.10. La administración de LPS *i.p.* a ZT15 activa *cFos* en la región dorsal de los NSQ.

Microfotografías de cortes coronales de animales a los que se le administró, a ZT15, solución salina, LPS (25µg/kg) o pulsos de luz no saturantes. Puede observarse que los animales tratados con salina presentan pocas células inmunoreactivas y con distribución predominantemente ventrolateral mientras que luego de inyectar LPS se observan células inmunoreactivas principalmente en la zona dorsal. La estimulación con pulsos de luz indujo inmunoreactividad en ambas zonas aunque con cierta predominancia de la ventrolateral.

La barra negra en cada fotografía representa 250µm, el área encerrada por la línea punteada corresponde a un NSQ, 3V muestra la posición del tercer ventrículo y OX del quiasma óptico. (n=6 por grupo).

De acuerdo con lo reportado previamente por otros grupos ((Lacroix y Rivest 1997; Matsunaga *et al.* 2000; Zhang *et al.* 2000), los animales tratados con LPS mostraron un mayor número de células inmunorreactivas en los núcleos paraventriculares (NPV) que aquellos tratados con luz o con salina (LPS, 340±22, salina 53±7,5, luz 46,3±12).

5.2.8. Expresión de genes reloj en respuesta al LPS sistémico:

Objetivo Determinar el efecto de la administración de LPS sobre la expresión de genes reloj en el SNC.

Como se mencionó anteriormente, los cambios de fase están asociados a modificaciones en la expresión de genes relojeros en los NSQ. Para analizar si la administración de LPS produce alteraciones a nivel transcripcional de genes relojeros, estudiamos, mediante hibridación *in situ*, la expresión de los genes *mper1* y *Bmal-1* en respuesta al LPS a ZT3 y a ZT 15.

La expresión de *perl* y *Bmal-1* a ZT 15 en respuesta a la luz fue analizada en animales sacrificados 90 minutos luego del pulso de luz mientras que los animales tratados con salina o LPS fueron sacrificados a 90 o a 180 min. post-tratamiento. Los animales tratados a ZT 3 fueron sacrificados 90 min. luego del tratamiento en todos los casos.

Al analizar la expresión de *mper1* en los NSQ, observamos mayores niveles de expresión a ZT 3 que a ZT 15 tanto en los grupos tratados con vehículo como en aquellos tratados con LPS (figura 5.11a.). La administración de pulsos de luz a ZT 15 causó un aumento significativo de la expresión de este gen con respecto a los animales tratados con salina o LPS. Sin embargo no vimos un efecto significativo al comparar los animales tratados con LPS con respecto a aquellos tratados con salina a ninguno de los dos horarios.

La expresión de *mper1* también fue evidente en otras áreas del cerebro como NPV, zona subparaventricular (SPV), corteza piriforme (CPi) y núcleos paraventriculares talámicos (NPVT) (figura 5.11b).

Al analizar la respuesta en los NPV (5.11c), observamos que el tratamiento con LPS induce la expresión de *mPer1* a ZT 15 pero no a ZT 3; esto se debe

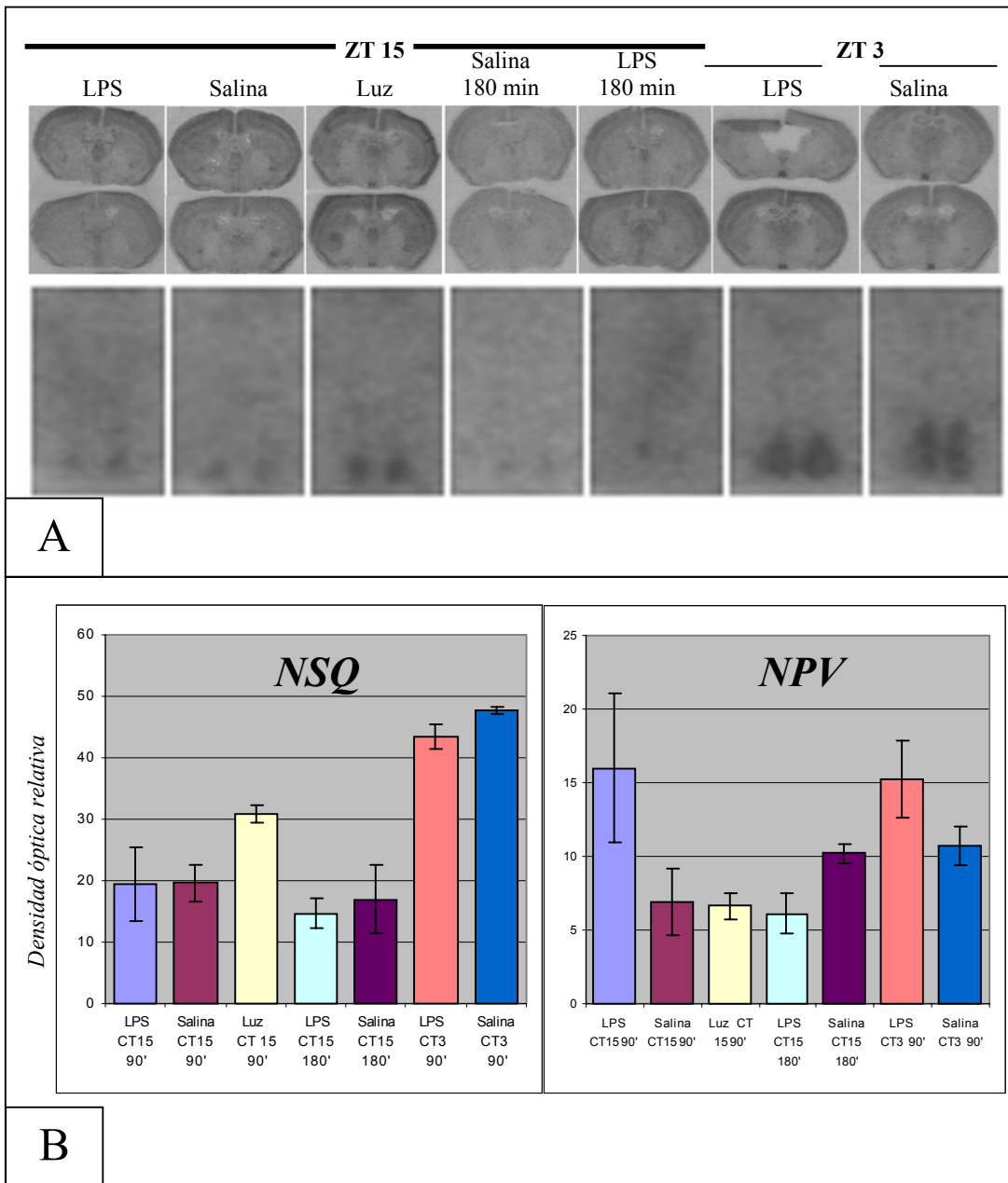


Figura 5.11. Expresión de *mPer1* en NSQ y NPV en respuesta a LPS. Hibridación *in situ* revelada con una sonda de *mPer1*. **A)** Autorradiografías de cortes de cerebros de animales tratados a ZT 15 con LPS (25µg/kg), salina ó luz saturante y de animales tratados a ZT 3 con LPS o salina. Todos los animales fueron sacrificados 90 min. luego del tratamiento a excepción de los grupos salina 180 y LPS 180 que fueron sacrificados 180 min. después del tratamiento. Se muestran cortes de dos animales representativos por tratamiento. En el panel inferior se observa con mayor aumento el área hipotalámica. Obsérvese que la administración de LPS no modifica la expresión de *mPer 1* en los NSQ. **B)** Cuantificación de los mismos cortes en el área de los NSQ y de los NPV. Los asteriscos representan una diferencia significativa con respecto al control de salina. (n= 3 - 4 por grupo).

probablemente a mayores niveles de expresión basal a ZT 3 que a ZT 15. El aumento en la expresión de *Per1* en respuesta a LPS a ZT 15 decae en los animales

sacrificados 3 horas luego del tratamiento. En los animales tratados con pulsos de luz o con salina en el mismo horario, la expresión de *Per1* en estos núcleos es detectable pero menor que en los animales tratados con LPS. Si bien los NPV muestran una elevada expresión de *mper1* en los animales tratados con LPS a ZT 3, la misma no difiere significativamente de la expresión en los animales tratados con solución salina en el mismo horario. Este resultado indica la posible existencia de una variación diaria de *mper1* en los NPV y su posible participación en la respuesta circadiana al LPS.

En los NPVT, encontramos que la expresión de *mper1* es muy elevada, pero no observamos ningún tipo de variación en respuesta a los tratamientos con LPS o con luz ni variaciones en los niveles basales de expresión en los dos horarios estudiados.

Es de interés destacar que no encontramos variaciones diarias ni en respuesta a la luz en la expresión de *mper1* en la corteza piriforme.

Al estudiar la expresión de *Bmal-1* (figura 5.12a.), encontramos una variación diaria con mayores niveles durante la noche (en antifase con *mper1*) y no observamos diferencias significativas en los animales tratados con pulsos de luz. Si bien no alcanzaron valores significativos, observamos en los animales tratados con LPS una tendencia a la disminución de *Bmal-1* tanto durante el día como durante la noche. La expresión de *Bmal1* fue detectada predominantemente en los NSQ y en menor medida en hipocampo (HC) y CPi (figura 5.12b).

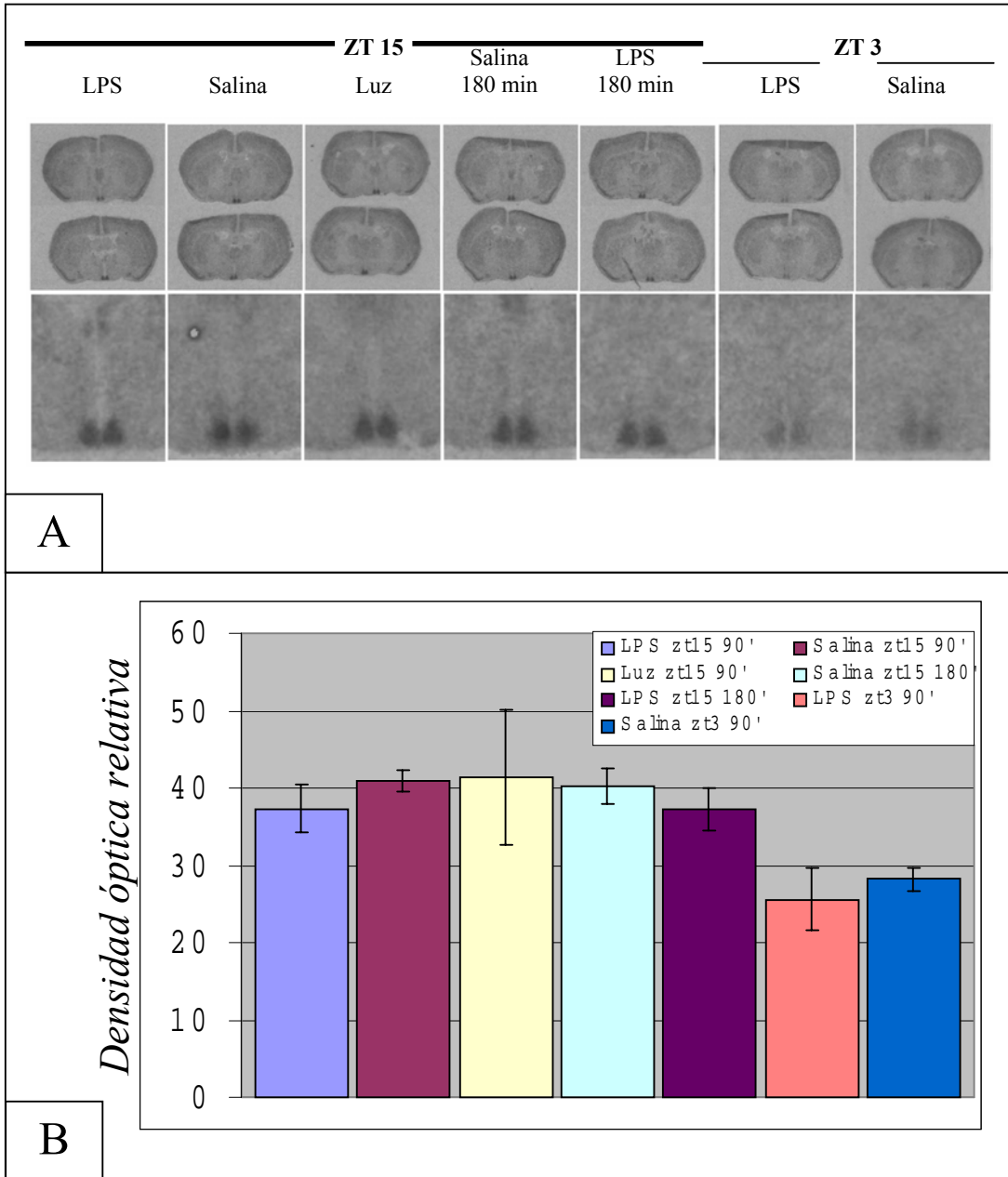


Figura 5.12. Expresión de *mBmal* en NSQ en respuesta a LPS.

Hibridación *in situ* revelada con una sonda de *mBmal1*. **A)** Autoradiografías de cortes de cerebros de animales tratados a ZT 15 con LPS (25µg/kg), salina ó luz saturante y de animales tratados a ZT 6 con LPS o salina. Todos los animales fueron sacrificados 90 min. luego del tratamiento a excepción de los grupos salina 180 y LPS 180 que fueron sacrificados 180 min. después del tratamiento. Se muestran cortes de dos animales representativos por tratamiento. En el panel inferior se observa con mayor aumento el área hipotalámica. Obsérvese que la administración de LPS no modifica la expresión de mPer 1 en los NSQ. **B)** Cuantificación de los mismos cortes en el área de los NSQ. (n = 3-4 por grupo)

5.3. Evidencias de la participación de NF-κB en los cambios de fase inducidos por LPS:

5.3.1. Inhibición del cambio de fase con sulfasalazina i.p.:

Objetivo Determinar el rol de la activación de NF-κB en los cambios de fase inducidos por LPS.

La vía de acción principal del LPS involucra la activación del factor de transcripción NF-κB. Sabemos también que este factor de transcripción participa de cambios de fase inducidos por luz en hámsteres por lo que resulta de interés analizar si está involucrado en los cambios de fase inducido por LPS. Para esto administramos sulfasalazina, un inhibidor de la activación de NF-κB, previamente al tratamiento con LPS a CT 15. Dos grupos control fueron tratados con salina antes de la inyección de LPS o con sulfasalazina antes de la aplicación de solución salina. El tratamiento con salina y LPS indujo un retraso de fase (-47 ± 13 min.) que fue inhibido en los animales tratados con sulfasalazina antes del LPS (-15 ± 13 min., $p < 0.05$, ANOVA de una vía) (figura 5.13.). Los animales tratados con sulfasalazina y salina no mostraron cambios de fase significativos (3 ± 5 min.). Estos resultados sugieren fuertemente que la activación de NF-κB es necesaria en los retrasos de fase inducidos por LPS a CT 15.

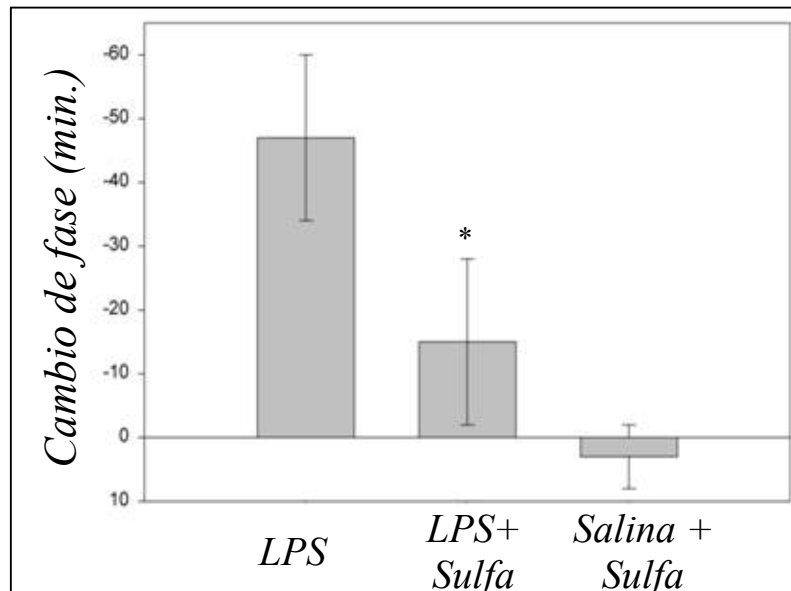


Figura 5.13. La administración previa de sulfasalazina reduce los cambios de fase inducidos por LPS.

La administración de sulfasalazina (Sulfa) en una dosis de (100 mg/kg) una hora antes de la inyección de LPS a CT15 redujo significativamente los cambios de fase. La administración de la misma dosis de sulfasalazina previamente a la inyección de solución salina no produjo ninguna alteración del ritmo de actividad locomotora en rueda. (n LPS= 4, nLPS+ Sulfa = 9, n Salina+ Sulfa= 4)

5.3.2. Expresión de NF- κ B en los NSQ:

Objetivo Determinar el rol de la presencia de NF- κ B en los NSQ de ratones C57BL/6.

Dado que la sulfasalazina es capaz de bloquear los cambios de fase inducidos por LPS a CT 15 y que la presencia de este factor de transcripción había sido demostrada previamente en los NSQ de hámster, analizamos su expresión NSQ de ratones por medio de técnicas inmunohistoquímicas.

Hallamos una elevada expresión de p50 tanto en los NSQ como en los NPV. La inmunomarcación no parece estar diferencialmente localizada dentro de los NSQ si no que es de distribución homogénea y no hallamos diferencias apreciables en su expresión a lo largo del día ni en respuesta al tratamiento con LPS. Esto concuerda con datos previos en los que tampoco se observó una variación diaria ni circadiana de p65 (ver figura 2.16).

Otras áreas de elevada inmunoreactividad fueron corteza piriforme PVT e hipocampo

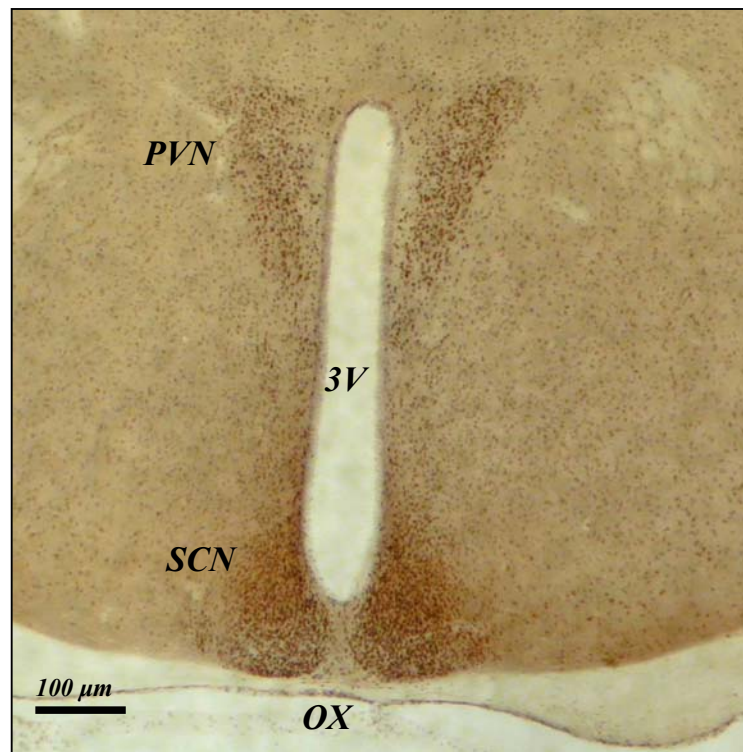


Figura 5.14. Expresión de NF- κ B en los NSQ de ratón.

Microfotografía que muestra el resultado de una tinción inmunohistoquímica para la subunidad p50 deNF- κ B en un corte coronal de cerebro a la altura de los NSQ y los NPV. Puede observarse claramente la expresión de p50 tanto en los NSQ como en los NPV con una distribución subcelular predominantemente nuclear. No se encontraron diferencias en la expresión de p50 en las distintas subregiones de los NSQ. (3V) tercer ventrículo, (OX) quiasma óptico, la barra negra corresponde a 100 μ m.

5.4. Rol de las citoquinas:

5.4.1. Inducción de TNF α en respuesta a LPS i.p.:

Objetivo: Determinar la inducción de TNF plasmático en respuesta a LPS.

La respuesta proinflamatoria inducida por LPS involucra la síntesis y liberación de citoquinas proinflamatorias, entre las cuales IL-1 β y TNF α son las de respuesta más rápida. Por lo tanto, es posible que estas citoquinas proinflamatorias participen de la respuesta del sistema circadiano al LPS. En caso de ser así es necesario evaluar si la

administración de LPS (25 µg/kg) durante la noche temprana produce un aumento en la síntesis de citoquinas proinflamatorias.

La actividad de TNF α se puede medir por su capacidad de inducir la mortalidad en cultivos de células L929, sensibles a esta citoquina. Un aumento en la mortalidad de células L929 inducida por el suero de animales tratados con LPS indica que este tratamiento aumenta los títulos de TNF α en plasma. Al agregar suero de animales tratados con LPS i.p. (25 o 500 µg/kg) a ZT 15 a cultivos de células L929 observamos que la mortalidad fue mayor que en las mismas células tratadas con suero de animales tratados con solución salina (figura 5.15.). Se observa un efecto protector del suero

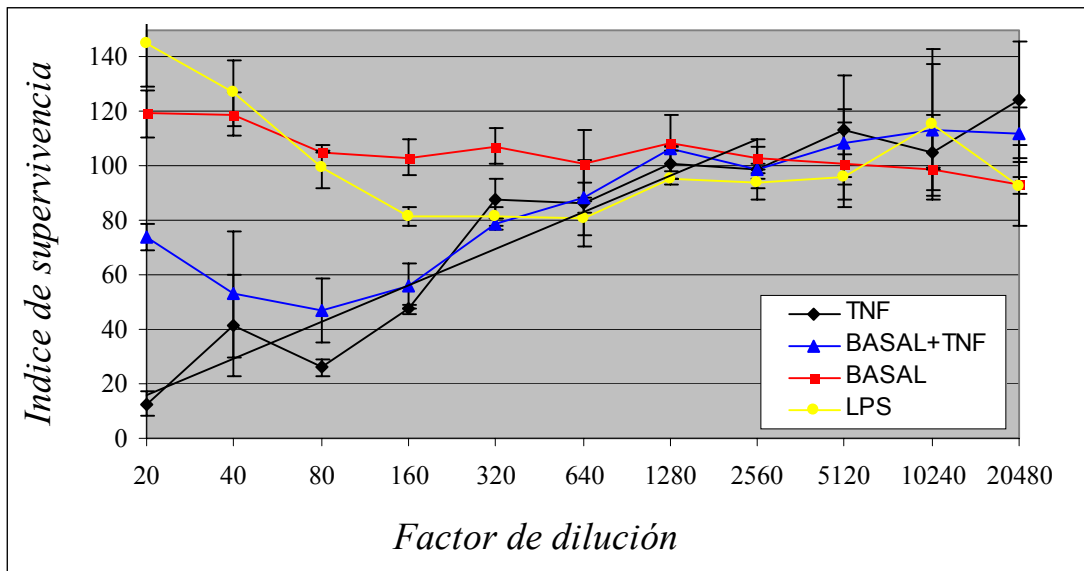


Figura 5.15. Ensayo biológico de TNF α .

Gráfica del índice de mortalidad de células L929 en función de concentraciones decrecientes de suero y/o TNF α . Las células se sensibilizaron con actinomicinaD, luego se les agregó el suero en una dilución inicial de 1:20 y de allí diluciones seriadas al medio. Se observa un efecto protector del suero ya que la mortalidad inicial de las células tratadas con suero basal +TNF α es menor que la de las células tratadas únicamente con TNF α y que es necesario diluir el suero de los animales tratados con LPS para observar el efecto de TNF α . La concentración inicial de TNF α fue de 1µg/kg y la del suero de animales tratados está entre 1 y 2 µg/ml dado que la curva se hace similar a la de TNF α en una dilución de entre 1/320 y 1/640.

que tiende a desaparecer al diluir las muestras. La unidad internacional para este ensayo biológico de la actividad biológica de TNF α es el título requerido para producir una mortalidad del 50% en las células L929. En el presente experimento

ninguna dilución de las muestras de suero produjo más del 20% de mortalidad por lo que la concentración de suero en plasma no supera una unidad internacional. Este resultado indica que existe liberación de TNF α en respuesta al LPS pero en niveles muy bajos. Sin duda, este hecho nos obliga a adoptar otro tipo de métodos para la determinación de los niveles de esta citoquina en experimentos futuros; sin embargo, la presente es evidencia de que, en el horario en que el LPS induce cambios en la fase de ritmos circadianos, es capaz de aumentar el nivel de TNF. Restan por determinar los efectos del LPS en otros horarios de administración.

5.4.2. LPS induce la expresión de IL-1 β en el bazo:

Objetivo: Determinar la inducción de IL-1 β en bazo en respuesta a LPS.

Para evaluar si además de TNF α la administración de LPS en dosis bajas es capaz de inducir la síntesis de IL-1 β , realizamos *Northern blots* para detectar la presencia de mRNA de IL-1 β en el bazo de animales tratados a CT 15 con salina o con LPS (250 y 25 μ g/kg). Detectamos la presencia de bandas correspondientes a IL-1 en los animales tratados con LPS pero no en animales tratados con solución salina (figura 5.16.). Sin embargo, dado que la señal obtenida es realmente baja consideramos que la sensibilidad de esta técnica no resulta adecuada para medir las concentraciones de IL-1 presentes en plasma en respuesta a la dosis de LPS administrada.

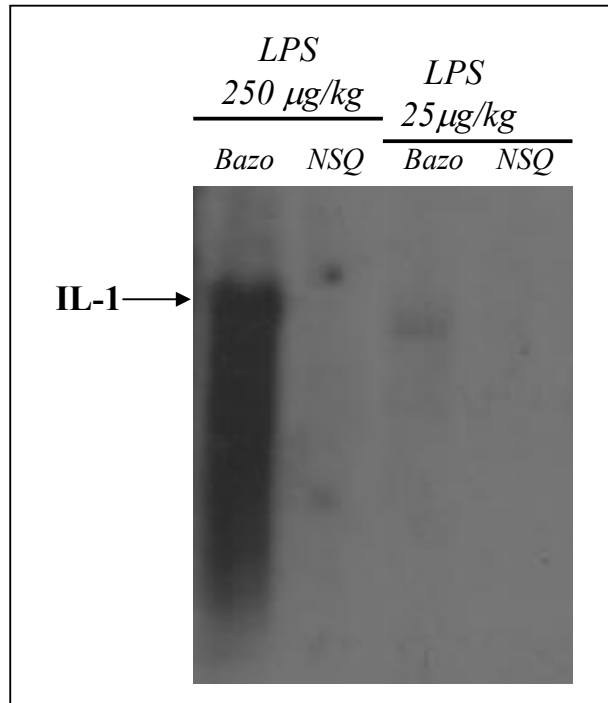


Figura 5.16. Northern blot de IL-1 en animales tratados con LPS a ZT 15.

Análisis de la expresión de IL-1 en bazo y NSQ en respuesta a la administración de LPS en dosis altas (250 $\mu\text{g}/\text{kg}$) y bajas (25 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Se pueden observar bandas correspondientes a IL-1 en los bazos de los animales tratados con ambas dosis de LPS. Sin embargo, la expresión de IL-1 en el bazo de animales tratados con 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de LPS es mucho mayor que en los bazos de animales tratados con LPS 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$., siendo en estos últimos casi indetectable. En los NSQ no obtuvimos bandas positivas.

5.4.3. Administración ip. de IL-1 β :

Objetivo Determinar el efecto de la citoquina IL-1 β periférica sobre el sistema circadiano

Como se mencionó anteriormente, la aplicación de LPS i.p. produce un aumento leve de la expresión de IL-1 β en el bazo y probablemente ocurra lo mismo en otros órganos tales como hígado, intestino y páncreas. Con el objeto de analizar si el aumento de IL-1 β en la cavidad peritoneal es capaz de inducir cambios de fase del ritmo de actividad locomotora en rueda, administramos IL-1 β i.p. en una dosis de 2

$\mu\text{g}/\text{kg}$ (aproximadamente 60 ng/ratón). Este tratamiento no indujo cambios de fase significativos (prueba t de Student, $p > 0,05$) (figura 5.17.).

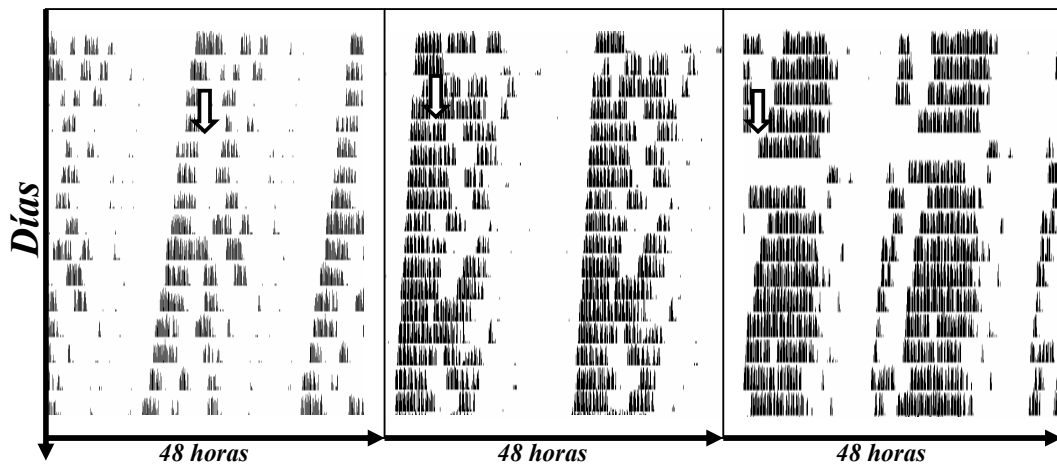


Figura 5.15. La administración i.p. de IL-1 β (2 $\mu\text{g}/\text{kg}$) a CT 15 no produce retrasos de fase. Actogramas dobles representativos de animales a los que se administró una dosis única de IL-1 β (2 $\mu\text{g}/\text{kg}$) i.p. a CT 15. Como puede observarse en los actogramass, la aplicación de IL-1 β no tuvo ningún efecto apreciable sobre el ritmo de actividad locomotora en rueda. (n= 3).

5.4.4. Administración i.c.v. de IL-1 y TNF α :

Objetivo Analizar el rol de la administración central de citoquinas sobre el sistema circadiano.

Para poner a prueba el rol de las citoquinas proinflamatorias en la interacción entre los sistemas inmune y circadiano aplicamos en forma i.c.v. TNF α (5ng/ratón) o IL-1 (1ng /ratón) a CT 15. Observamos un retraso de fase del ritmo de actividad locomotora en rueda tanto en los animales tratados con IL-1 β (-59 ± 6 min.) como en los tratados con TNF α (-52 ± 9 min.) (figura 5.18a.). Los animales tratados con solución salina no presentaron cambios de fase significativos. Ambas citoquinas causaron un período de inactividad que se prolongó hasta por 8 horas y, en algunos casos, el período de

actividad en los primeros días luego del tratamiento mostró mayor fragmentación y menor amplitud, recuperando sus parámetros normales en el término de una semana.

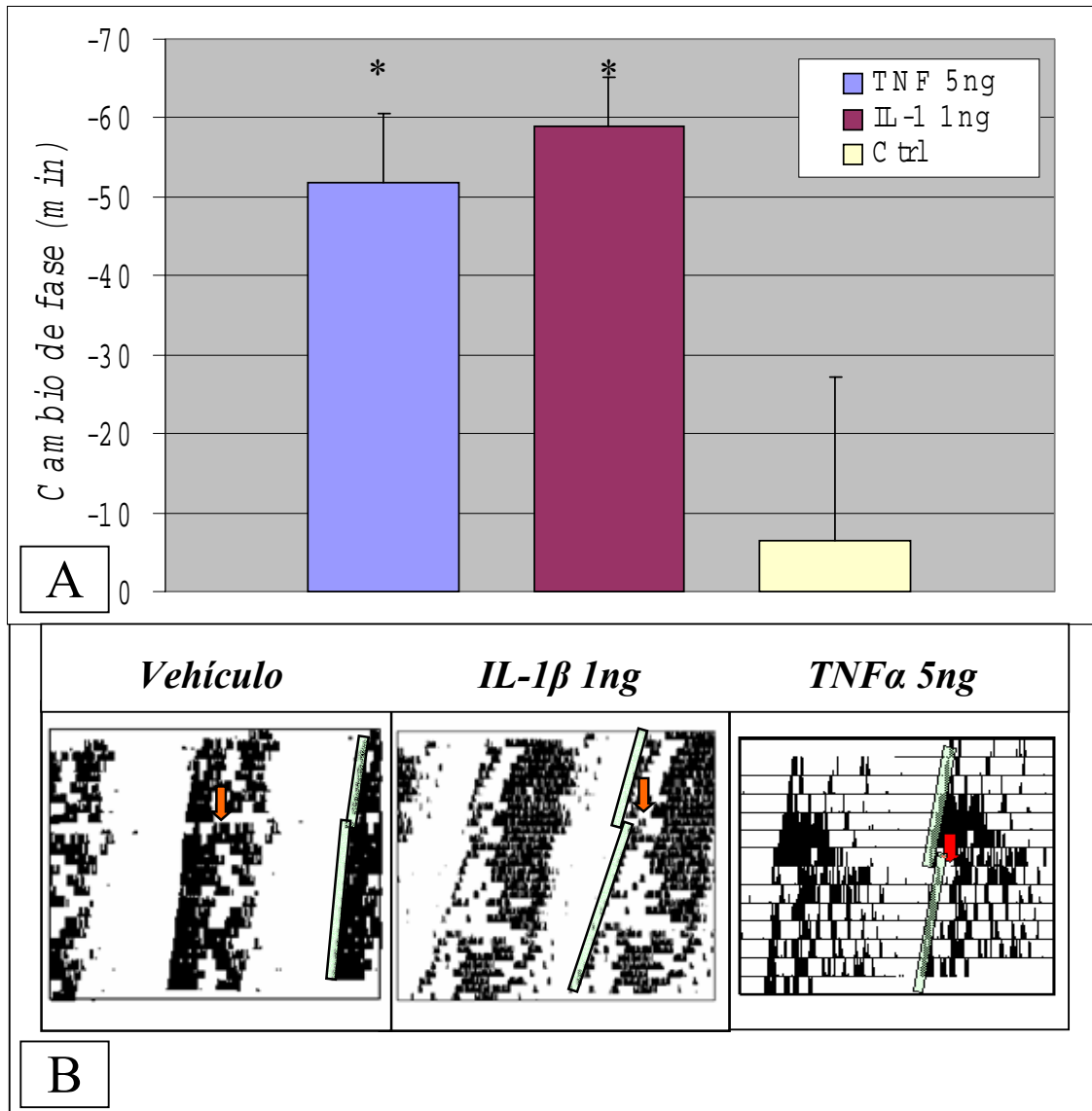


Figura 5.18. La administración i.c.v. de citoquinas a CT 15 produce retrasos de fase.

La administración i.c.v. de TNF α o IL-1 β a CT 15 producen retrasos de fase similares a los producidos por la administración periférica de LPS. Las drogas fueron administradas en un volumen total de 1 μ l a un flujo de 0,3 μ l/min. **A)** Cuantificación de los cambios de fase inducidos por IL-1 β (1ng), TNF α (5ng) y vehículo. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control. **B)** Actogramas dobles representativos de animales tratados con vehículo, IL-1 β o TNF α a CT 15. Las flechas rojas indican el momento del tratamiento y las barras verdes señalan las fases de inicio de actividad tenidas en cuenta para calcular los cambios de fase. (n= 4 por tratamiento).

5.5. Los astrocitos como posibles mediadores de las interacciones neuroinmunes:

5.5.1 .GFAP en los NSQ:

Si bien existen estudios que sugieren que los astrocitos de los NSQ cumplen alguna función en el sistema circadiano de mamíferos, no ha sido esclarecido aún cuál sería su rol. En particular, en referencia al sistema circadiano, los astrocitos han sido estudiados en hámsteres y en ratas pero escasamente en ratones.

Los astrocitos expresan normalmente receptores de citoquinas proinflamatorias y son capaces de sintetizarlas en respuesta a estímulos varios. Esto los hace fuertes candidatos como mediadores de las interacciones neuroinmunes en los NSQ.

Analizamos la expresión de GFAP en los NSQ de ratones en diferentes horarios observando que existe una tendencia a una mayor área cubierta por GFAPir durante el día que durante la noche (figura 5.19).

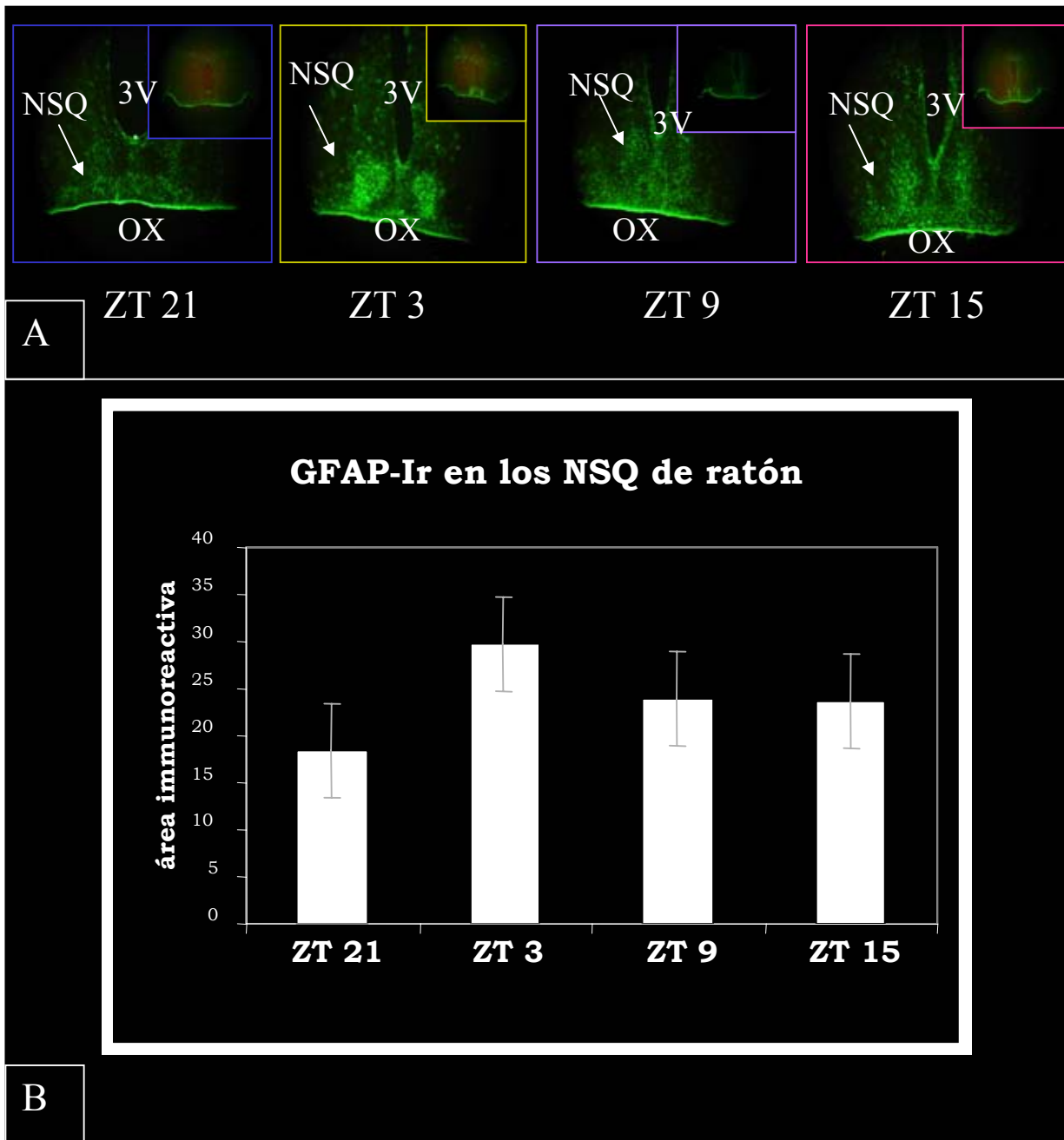


Figura 5.19. Análisis de la variación diaria de la GFAPir en los NSQ de ratón.

A) Microfotografías y **B)** cuantificación, de la inmunoreactividad de GFAP en los NSQ de ratones en condiciones L:O. El área abarcada por GFAPir parece tener una tendencia a ser mayor a ZT 3 que en otros horarios. Sin embargo esta tendencia no es estadísticamente significativa a como se puede observar en el panel B). (n= 6 por horario)

5.5.2. Colocalización de GFAP y NF- κ B en NSQ:

Dado que el factor de transcripción NF- κ B está involucrado en la respuesta a citoquinas proinflamatorias y en los cambios de fase inducidos por LPS, estudiamos la presencia de NF- κ B en los astrocitos de los NSQ. Para esto analizamos la colocalización de p65 y GFAP mediante inmunofluorescencia con microscopía confocal. Dentro del área de los NSQ encontramos células en las que GFAP y p65 colocalizan así como células que expresan una sola de estas proteínas (figura 5.20.). Esto sugiere que no todos los astrocitos expresan NF- κ B y que existen otros tipos celulares que expresan p65.

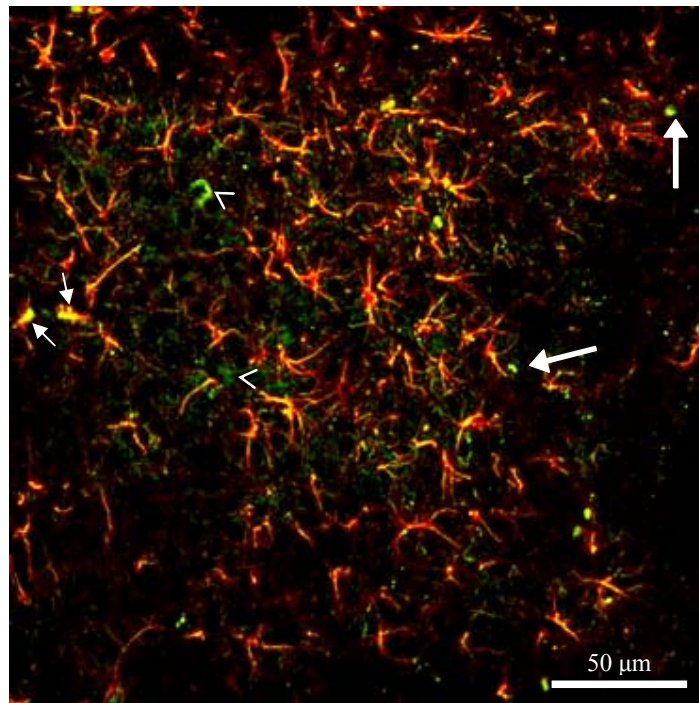


Figura 5.20. *NF- κ B y GFAP son coexpresadas en algunas células de los NSQ.*

Fotomicrografía de un NSQ en el que se observa la inmunoreactividad para p65 en verde (fluoresceína) y de GFAP en rojo (rodamina). Las puntas de flechas abiertas indican células con marca citoplasmática para p65 pero no para GFAP, las flechas blancas cortas indican células con marca nuclear de p65 y colocalización con GFAP y las flechas blancas grandes muestran núcleos marcados con p65 pero que no parecen estar asociados a la expresión de GFAP.

5.5.3. Colocalización de GFAP y NF- κ B *in vitro*:

Con el objeto de analizar en detalle las características de los astrocitos de NSQ desarrollamos cultivos primarios en los que se pueden realizar ciertos experimentos difícilmente realizables *in vivo*. Los astrocitos obtenidos de los NSQ de ratones neonatos fueron cultivados y analizamos si la expresión de NF- κ B se mantiene *in vitro* por medio de inmunofluorescencias para GFAP, p65 y p50. Un alto porcentaje de astrocitos (GFAP positivos) del cultivo primario coexpresan p65 o p50, con una distribución predominantemente nuclear y perinuclear (figura 5.21).

5.5.4. Activación de NF- κ B en los astrocitos en respuesta a citoquinas y LPS:

Con el fin de evaluar si los astrocitos provenientes de los NSQ son capaces de responder a citoquinas y en particular si su respuesta involucra la activación de NF- κ B, transfectamos los cultivos con un plásmido que contiene un promotor sensible a NF- κ B unido al gen de luciferasa. De esta forma la activación de NF- κ B se traduce en una mayor síntesis y, por lo tanto, mayor actividad de luciferasa.

Los astrocitos transfectados con el plásmido κ B-luc estimulados con IL-1 (1ng/ml), TNF α (20 ng/ml) o LPS 2 μ g/ml muestran actividad luciferasa elevada con respecto a aquellos transfectados con el mismo plásmido pero estimulados con medio de cultivo como control. El agregado de TNF α aumentó la actividad luc (3,4 \pm 1,1 URL/ctrl), IL-1 la aumentó casi dos veces (1,7 \pm 0,01) y el LPS elevó la actividad luciferasa a más del triple (3,1 \pm 0,3) (figura 5.22.). No se observó actividad luciferasa en astrocitos no transfectados o transfectados con un plásmido sin el gen de luciferasa. Este resultado pone en evidencia la presencia de receptores para TNF α , IL-1 β y LPS en astrocitos provenientes de los NSQ de ratón y además indica que la respuesta a estas sustancias involucra la activación del factor de transcripción NF- κ B.

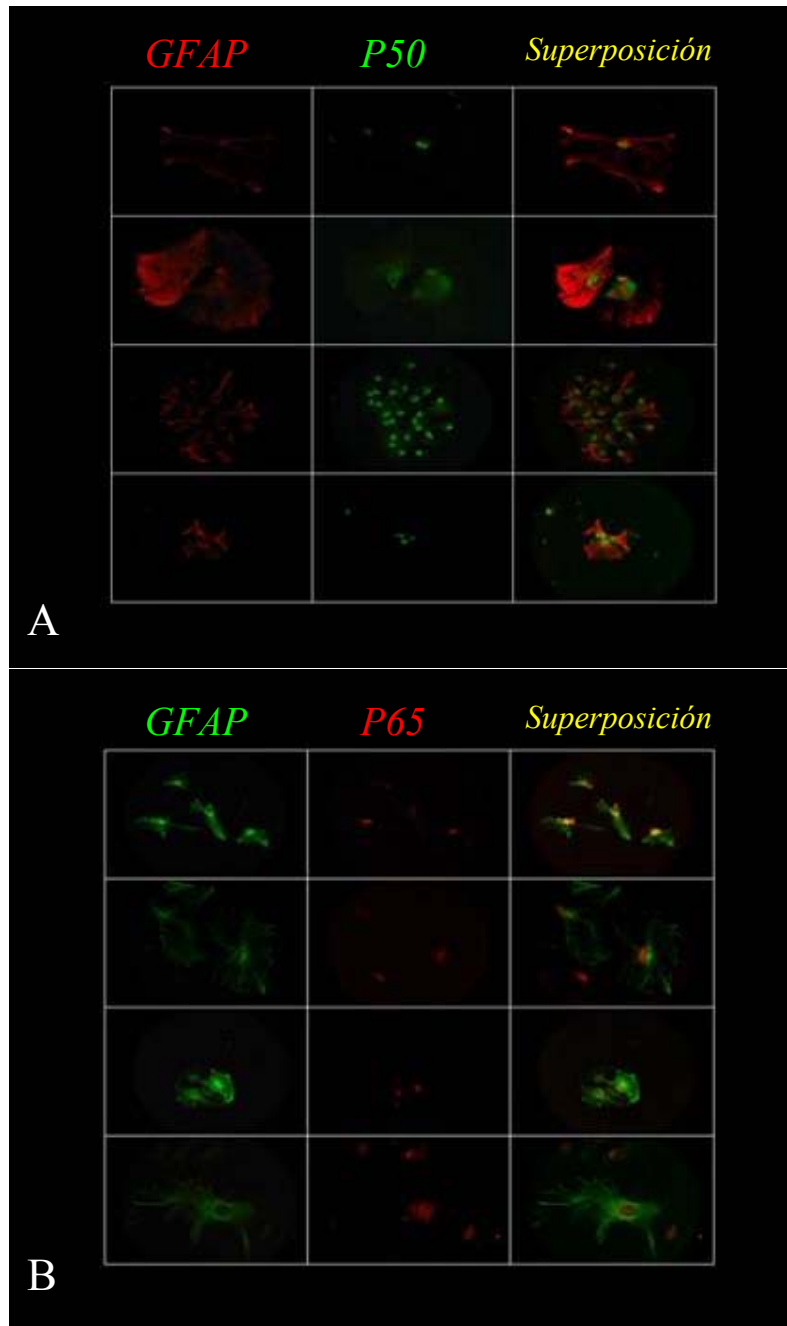


Figura 5.21. *NF- κ B* es expresado por astrocitos provenientes de los NSQ en cultivos primarios.

Fotomicrografías de inmunofluorescencias realizadas en cultivos primarios de astrocitos provenientes de NSQ. A) Inmunofluorescencia para GFAP (en rojo) y p50 (en verde), mostrando una clara distribución citoplasmática para GFAP y nuclear para p50. B) Inmunofluorescencia para GFAP (en verde) y p65 (en rojo) mostrando distribución nuclear y perinuclear para p65 y citoplasmática para GFAP. Se observa en ambos casos que los astrocitos expresan las subunidades de NF- κ B *in vitro*.

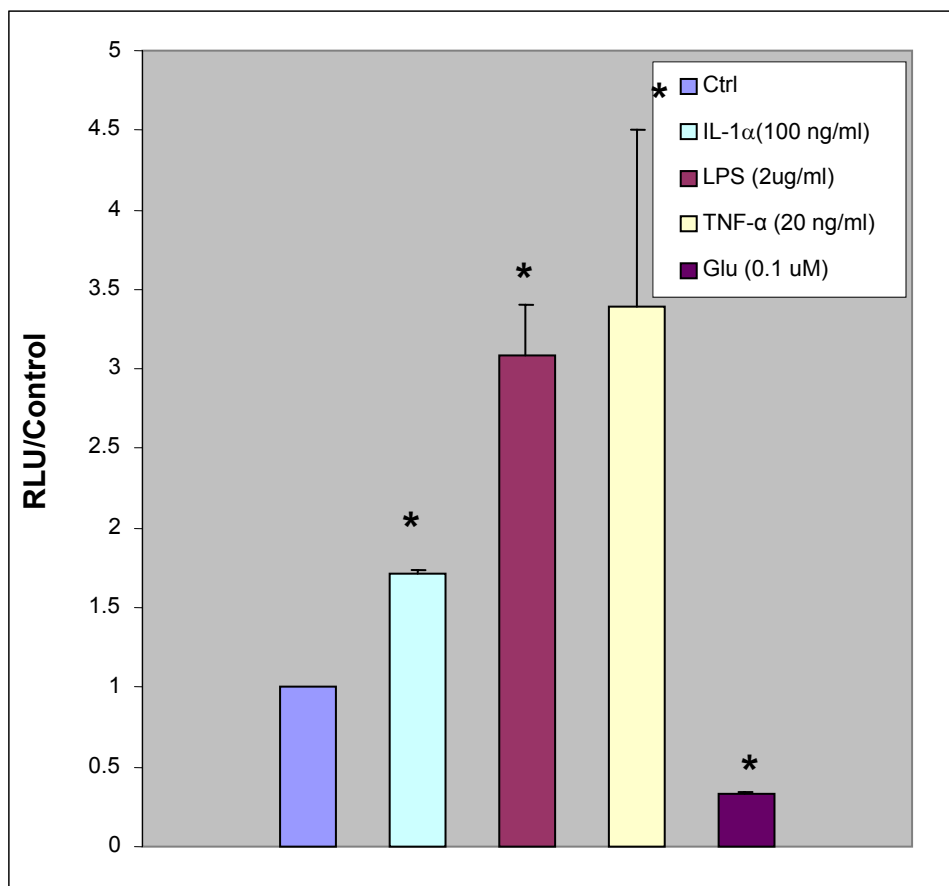


Figura 5.22. Los cultivos de astrocitos provenientes de los NSQ, responde a IL-1, TNF α y LPS mediante la activación de NF- κ B.

Astrocitos provenientes de los NSQ, previamente transfectados con un plásmido reportero de la actividad NF- κ B fueron estimulados con IL-1, LPS, TNF α o Glutamato. Luego de la estimulación se midió la actividad luciferasa inducida por la activación de NF- κ B. Un plásmido de expresión constitutiva para β -galactosidas fue utilizado como control interno de transfección. La figura muestra el resultado de un experimento representativo en el que cada estimulación fue hecha por triplicado.

5.6. Shock séptico y el sistema circadiano:

De acuerdo con los trabajos presentados por Halberg (1960), la mortalidad inducida por endotoxina de *E. coli* presenta una variación diaria alcanzando mayores valores durante el día que durante la noche. En ratones tratados con 400 μ g de LPS, encontramos una mayor mortalidad (80% vs 20%) cuando la droga fue administrada en la última hora del período de luz (ZT 11) que al ser administrada 7 horas luego del apagado de las luces (ZT19) (figura 5.23a). Asimismo, utilizando análisis de Kaplan-Meyer observamos que la tasa de mortalidad en función del tiempo fue menor en los

animales tratados durante el período de oscuridad (figura 5.23b). Al realizar el mismo experimento en animales mantenidos en oscuridad constante, observamos que no existen diferencias en la mortalidad inducida por LPS a CT11 y a CT19. En estas condiciones, los animales tratados en los dos horarios muestran una mortalidad elevada (80%) lo que indica un aumento de la sensibilidad al LPS en el grupo tratado en el período de actividad. Resultados preliminares en condiciones de L:O muestran que los animales inyectados con LPS muestran una clara hipotermia que puede durar hasta tres días y que correlaciona con un enmascaramiento de la actividad locomotora general. Aproximadamente a los tres días, los animales recuperan los ritmos de actividad y temperatura sin evidencias claras de alteraciones de sus parámetros (figura 5.24). En condiciones de oscuridad constante la misma dosis produjo la muerte del 100% de los animales con sensores implantados, los cuales nunca recuperaron su ritmicidad. Hasta el momento no encontramos diferencias en el valor absoluto de la hipotermia ni en la tasa de disminución de temperatura entre los animales que sobrevivieron al proceso de sepsis y aquellos que murieron. Tampoco encontramos variaciones de estos parámetros en animales tratados a ZT 11 y a ZT19.

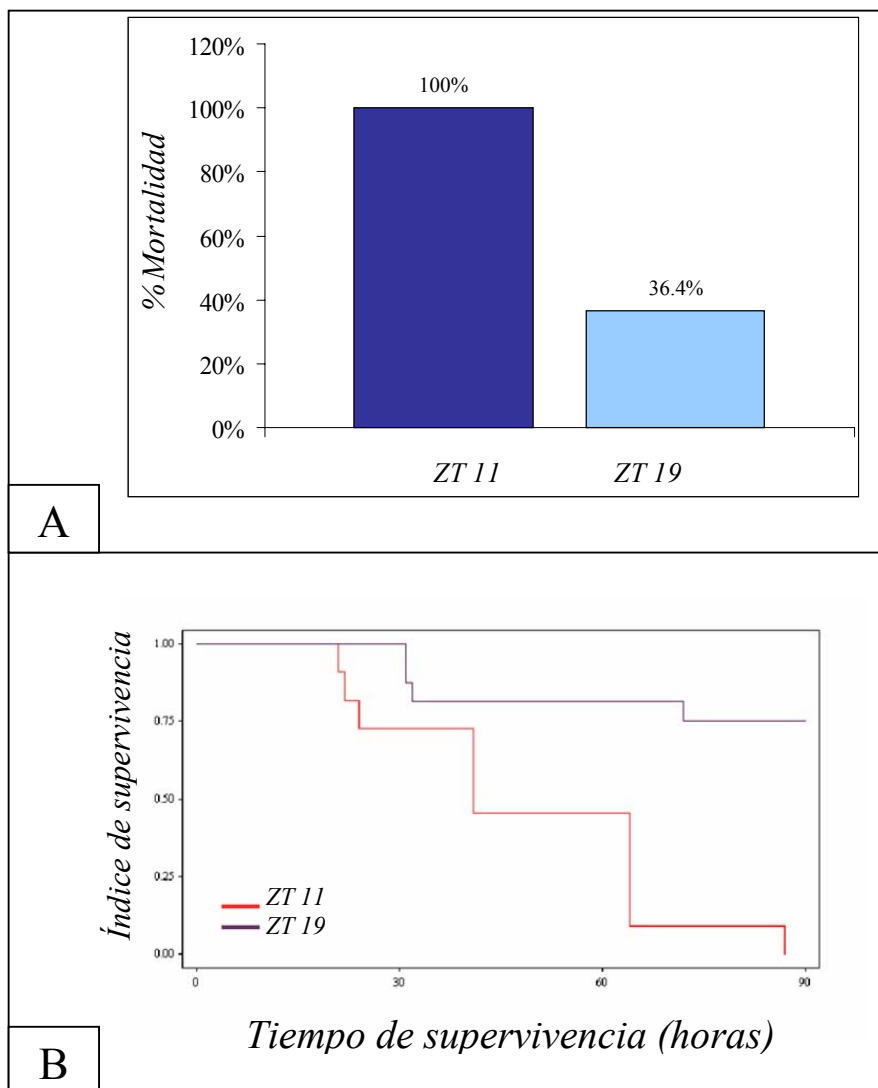


Figura 5.23. Mortalidad inducida por dosis letales de LPS a ZT 11 y ZT19.

A) La mortalidad inducida por la administración i.p. de LPS (20 mg./Kg.) a ZT 11 y ZT 19 presenta una variación diaria con mayor mortalidad inducida durante la tarde (100%) que durante la noche (36,4%). ($p < 0.01$, Fisher exact test). **B)** Gráfica en la que se representa el análisis estadístico de Kaplan-Meier que arrojó una variación significativa en el tiempo de supervivencia post-LPS mostrando una mayor tasa de mortalidad en el grupo de la tarde ($p < 0.01$, Cox-Mantel test). ($n = 10$ por horario).

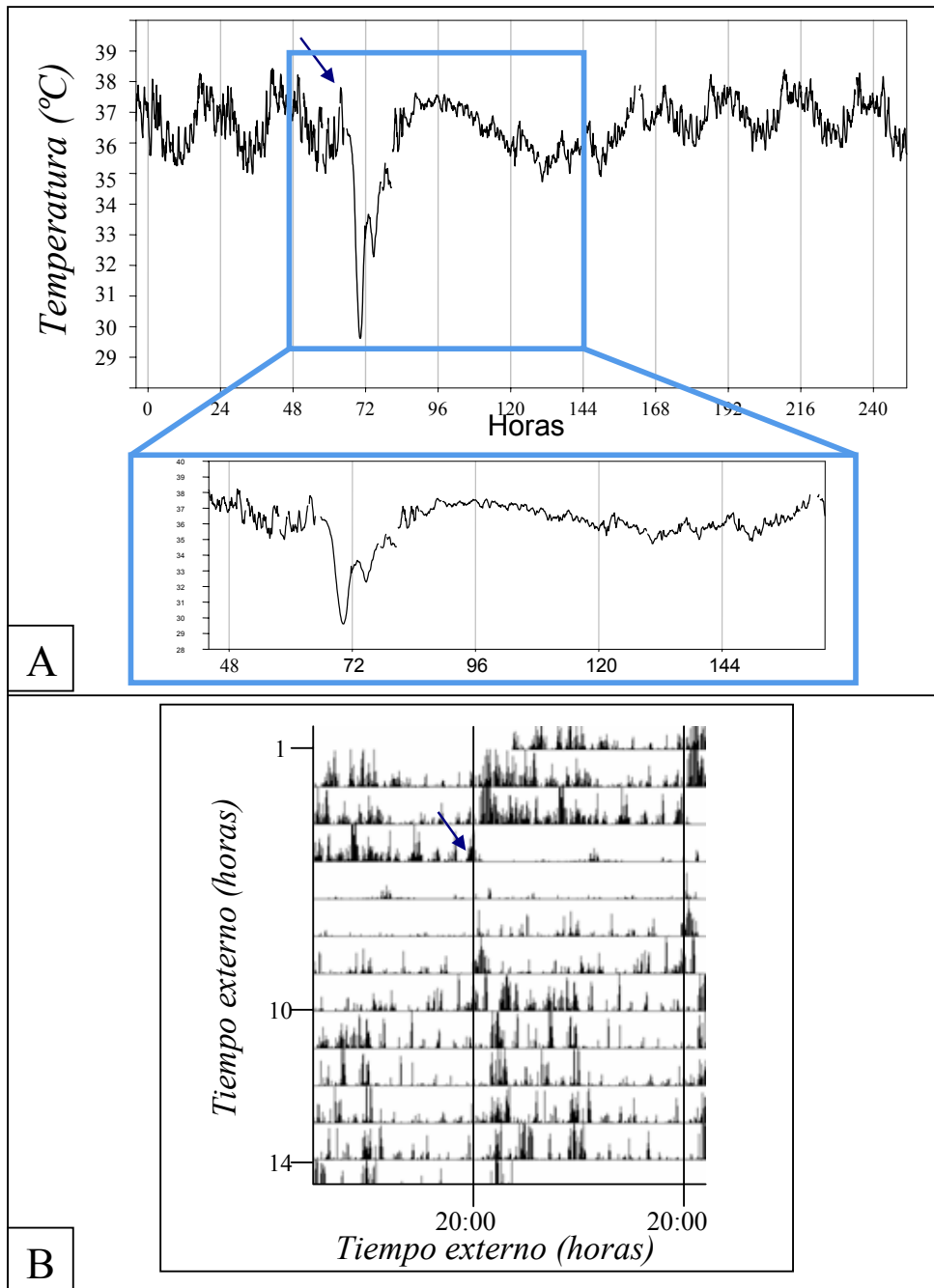


Figura 5.24. Efecto de la administración LPS (20 mg/kg) sobre los ritmos diarios de actividad y temperatura corporal.

A) Termograma y **B)** actograma doble (actividad general) de un mismo animal tratado con LPS 20mg/kg i.p. a ZT 11 (19:00 horas). En el termograma se puede ver claramente la hipotermia de más de 6 grados inducida por el tratamiento. Asimismo se observa la pérdida de ritmicidad por 48 horas aproximadamente. En el actograma también se hace evidente la pérdida de ritmo de actividad general por el mismo período. La flecha indica el momento aproximado del tratamiento.

Discusión

6. Discusión

En este trabajo de tesis doctoral intentamos demostrar la existencia de una interacción entre el sistema inmune y el sistema circadiano y planteamos un modelo que sugiere un mecanismo de acción y las posibles vías de comunicación entre ambos sistemas, poniendo énfasis en las citoquinas proinflamatorias IL-1 β y TNF α ., el factor de transcripción NF- κ B y los astrocitos, como posibles mediadores de la interacción.

Nuestra hipótesis principal plantea la posible existencia de una vía de interacción desde el sistema inmune hacia el circadiano, lo que nos llevó a plantear hipótesis secundarias de acuerdo a las cuales el tratamiento con LPS o con citoquinas proinflamatorias debería producir alteraciones cuantificables en algunos parámetros del sistema circadiano. Una vez caracterizados estos parámetros del sistema circadiano de los ratones C57BL/6 que empleamos como modelo en este trabajo, y habiendo confirmado que su sistema circadiano se comporta de acuerdo a lo descrito previamente para esta cepa (figuras 5.1,5.2 y 5.3), analizamos el efecto del LPS y de las citoquinas. En vista de los resultados obtenidos, que incluyen retrasos de tipo fótico tras la aplicación de LPS sistémico o de citoquinas i.c.v., nuestra conclusión principal es que existe una vía de comunicación desde el sistema inmune hacia el sistema circadiano y que ésta se pone en evidencia al administrar LPS en forma periférica o citoquinas dentro del SNC. Además, podemos agregar que en esta vía se encuentra involucrada probablemente la activación del factor de transcripción NF- κ B, que es posible que los astrocitos tengan también un rol importante y que participen otros núcleos hipotalámicos además de los NSQ, entre ellos los NPV.

Si bien al momento de comenzar este trabajo existían algunas evidencias de otros grupos que sugerían la posible interacción entre los sistemas inmune y circadiano la mayoría de estos estaban vinculados a condiciones patológicas o no

estaban enfocados desde un punto de vista cronobiológico, por lo que en general se trata de descripciones de ritmos diarios de variables inmunes o tratamientos con dosis altas de LPS y/o citoquinas que ponían a los animales en situaciones patológicas severas (Halberg *et al.* 1960; Wongwiwat *et al.* 1972; Bourin *et al.* 1993; Vagnucci y Winkelstein 1993; Bauhofer *et al.* 2002; Holzheimer *et al.* 2002). En el transcurso de los últimos tres años han surgido nuevos trabajos que se suman a éste y confirman la existencia de una interacción bidireccional entre los sistemas inmune y circadiano; (Koyanagi y Ohdo 2002; Lundkvist *et al.* 2002; Takata *et al.* 2002). Sin embargo, los mecanismos e implicancias fisiológicas de esta interacción están lejos de ser comprendidos en su totalidad y este trabajo es simplemente un comienzo en este intento por esclarecer el rol de las interacciones neuroinmunes en el sistema circadiano de mamíferos.

Respuestas del sistema circadiano al LPS

Al administrar LPS i.p. observamos alteraciones en el sistema circadiano, entre las cuales podemos destacar un efecto de enmascaramiento (con una disminución marcada de la actividad locomotora durante la noche) y la inducción de cambios de fase cuya CRF es similar a la obtenida para la luz en ratones C57BL/6J (figuras 5.4). La CRF para LPS se caracteriza por la presencia de retrasos de fase inducidos al administrar la droga en las primeras horas de la noche subjetiva y poco efecto al administrarla en otros horarios. Aunque la amplitud máxima de los cambios de fase inducidos por LPS es significativamente menor a la de los retrasos de fase inducidos por pulsos de luz saturante, la presencia de retrasos durante el inicio de la noche subjetiva y escaso efecto en otros horarios nos permite decir que el LPS estaría actuando como un estímulo fótico (Schwartz y Zimmerman 1990). Podemos descartar

que los retrasos de fase inducidos por LPS sean consecuencia de cambios en la temperatura corporal (figura 5.6) ya que los animales en los que se registró la temperatura corporal por telemetría no presentaron cambios apreciables en este parámetro tras la administración de 25 µg/kg de LPS a CT15. Sin embargo, observamos una clara y persistente hipotermia en los animales tratados con 250 µg/kg de LPS. En este punto es necesario recordar que las alteraciones de la regulación de la temperatura inducidas por LPS no se restringen exclusivamente a un proceso febril, sino que suelen ser respuestas bifásicas con una primera etapa de hipertermia y una segunda etapa de hipotermia (Blanke *et al.* 1996, 1999; Dogan *et al.* 2000, 2002). Sin embargo, esta respuesta puede variar notablemente dependiendo de la especie y cepa de animal tratado, su situación general, la temperatura ambiente y fundamentalmente del serotipo de endotoxina utilizada (Dogan *et al.* 2000; Saito *et al.* 2003).

Además, como se puede observar en la figura 5.7 y en concordancia con trabajos previos, es poco probable que, al administrarlo en dosis de 25 µg/kg, el LPS pueda penetrar en el parénquima cerebral ya que la barrera hematoencefálica se encuentra intacta. Por lo tanto es improbable que sus efectos estén vinculados a una interacción directa en el SNC. Una variable que no controlamos fue la presión arterial. Se sabe que la administración sistémica de LPS tiene un pronunciado efecto hipotensor, pero este efecto se da al emplear dosis altas de LPS y desaparece cuando los animales son tratados con dosis menores a 50µg/kg (Graham *et al.* 1995; Tkacs y Strack 1995). Es probable que la no linealidad en la relación dosis/respuesta que se puede observar en la figura 5.5 tenga que ver con la aparición de efectos secundarios a dosis altas de LPS. De hecho se ha reportado que el aumento de la temperatura cerebral produce avances de fase de tipo no fótico (Ruby *et al.* 1999) y en general los

estímulos fóticos y no fóticos se inhiben entre sí (Zatz 1992a; Ralph *et al.* 1996; Yannielli *et al.* 2004). Estas consideraciones indican fuertemente que el efecto del LPS sobre el sistema circadiano está vinculado al sistema inmune y no es consecuencia de efectos secundarios tales como cambios de temperatura e hipotensión.

Por otro lado, observamos que hay interacción entre los procesos desencadenados por la estimulación con luz y aquellos activados por la administración de LPS. Esto se hace evidente dado que la coadministración a CT 15 de LPS y pulsos de luz no presenta efectos aditivos (figura 5.9). La administración de un pulso de luz no saturante a CT 15 indujo la expresión de cFOS en todo el NSQ mientras que el LPS indujo la expresión de esta misma proteína exclusivamente en la región dorsal, lo cual permite proponer a esta región como el sustrato anatómico para los cambios de fase inducidos por LPS y para su interacción con la luz (figura 5.10).

Esto parece contradecirse con la idea generalizada que tenemos del sustrato anatómico de los cambios de fase de tipo fóticos, ya que en general se asocia a estos cambios de fase con la activación de la región ventrolateral de los NSQ y esto se debe principalmente a que, en la mayoría de los roedores estudiados, ésta es la región activada en respuesta a pulsos de luz. Sin embargo, la expresión de cFOS en los NSQ de ratones expuestos a pulsos de luz no tiene una distribución ventrolateral tan definida como en el caso de las ratas y los hámsteres sino que su inmunoreactividad aumenta también en la región dorsal (Castel *et al.* 1993). Por otro lado, la administración i.c.v. del péptido GRP, que es considerado un estímulo de tipo fótico ((Piggins *et al.* 1995; McArthur *et al.* 2000), produce cambios de fase asociados al aumento de la expresión de mPer1 y cFos exclusivamente en la región dorsal de los NSQ (Aida *et al.*, 2002). Esto coincide con otros trabajos en los que la región dorsal

de los NSQ fue propuesta como la región responsable de recibir la información desde los sistemas de interocepción (Moga y Moore 1997; Krout *et al.* 2002; Moore *et al.* 2002). El resultado obtenido al analizar la expresión de cFOS en los NSQ de animales tratados con LPS, luz o vehículo concuerda también con trabajos previos en los que se describió un ritmo circadiano con máximos diurnos en la región dorsal de los NSQ, tanto para la expresión de cFos como de mPer (Sumova *et al.* 1998; Guido *et al.* 1999a; Guido *et al.* 1999b; Schwartz *et al.* 2000; Yan y Okamura 2002). Como se puede observar en la figura 5.10, los animales tratados con vehículo durante la noche presentan células marcadas en la región ventrolateral pero un muy bajo número de células marcadas en la región dorsal. En los animales tratados con LPS esta relación se invierte, obteniendo un aumento en el número de células marcadas en la región dorsal y una disminución en la región ventrolateral con respecto a los animales tratados con salina. La expresión de cFOS también aumenta en los NPV en los animales tratados con LPS, pero no se observan cambios en la inmunoreactividad de estos núcleos en los animales tratados con pulsos de luz.

Para que un estímulo dado produzca un cambio de fase en el sistema circadiano, debe producir un cambio en alguna variable de estado del mecanismo de oscilación del reloj biológico. Por este motivo es de esperar que cualquier estímulo sincronizador (o *zeitgeber*) sea capaz de modificar la transcripción de uno o más genes relojeros. Analizamos por lo tanto la expresión de mPer1 y mBmal1 en animales tratados con LPS, pulsos de luz o solución salina. Observamos expresión de mPer1 en varias estructuras cerebrales incluyendo NSQ, NPVT, NPV, CP, SO y corteza, en tanto que la expresión de *mBmal1* se restringió a los NSQ, con baja expresión en tálamo y corteza. La expresión de estos genes en los NSQ no se vio significativamente afectada por el tratamiento con LPS, aunque pudimos observar una

tendencia a una disminución de la expresión de mBmal1 tanto en los animales tratados de noche como en aquellos tratados de día. De acuerdo con lo reportado previamente en un gran número de trabajos (Albrecht *et al.* 1997; Shearman *et al.* 1997; Shigeyoshi *et al.* 1997; Sun *et al.* 1997; Tei *et al.* 1997; Zylka *et al.* 1998b), la expresión de mPer1 fue mayor a CT 3 que a CT 15 y fue inducida por luz sólo a CT15, mientras que la expresión de mBmal1 fue mayor a CT15 que a CT3 y no se vio afectada por los pulsos de luz.

La expresión de mPer1 aumentó significativamente en los NPV de los animales tratados con LPS durante la noche (figura 5.11). Este resultado coincide con lo observado por Shibata y colaboradores quienes reportaron un aumento de la expresión de mPer1 en los NPV de ratones *ddY* luego de tratarlos con LPS a CT 22 (Takahashi *et al.* 2001). Resulta interesante notar que, al igual que en los NSQ, los niveles diurnos de mPer1 en los NPV parecen ser mayores que los niveles nocturnos lo cual sugiere la existencia de una variación circadiana en la expresión de mPer1 en éstos núcleos. La diferencia es que en los NSQ mPer1 es inducido por pulsos de luz mientras que en los NPV sería inducible por la administración de LPS. Es necesario tener en cuenta que la cuantificación de la señal proveniente de los NPV fue analizada *a posteriori* lo cual implica que los cortes no fueron seleccionados previamente de forma tal que contengan una determinada región sino que se realizó la cuantificación en aquellos cortes en los cuales se pudo determinar la presencia de NPV luego de realizadas las hibridaciones *in situ*. Por este motivo, si bien los resultados son interesantes y los incluimos en un modelo de interacción neuroinmune en el sistema circadiano, deben ser confirmados por otros experimentos.

Evidencias de la participación de NF- κ B en el sistema circadiano:

La sulfasalazina es un inhibidor de la activación de NF- κ B relativamente específico que inhibe a la IKK y evita de esta forma la fosforilación de I κ B (Wahl *et al.* 1998; Cronstein *et al.* 1999). Al no fosforilarse I κ B, NF- κ B no puede liberarse y ser traslocado al núcleo, lo que resulta en la inhibición de la actividad de este factor de transcripción. Dado que la sulfasalazina es capaz de disminuir la magnitud de los cambios de fase inducidos por LPS (Fig. 5.10), es altamente probable que esta respuesta requiera de la activación de NF- κ B. Si bien existen ya varios trabajos que aportan evidencias de la participación de NF- κ B en el sistema circadiano de mamíferos, el rol de este factor de transcripción en este contexto no es aún del todo comprendido. En los NSQ de roedores se ha reportado la presencia de p65 (Marpegan *et al.* 2004), mRNA de I κ B (Rivest *et al.* 2000) y de IKK (Hayashi *et al.* 2003). Además, Hayashi y colaboradores sugieren en el mismo trabajo que la deficiencia en la actividad de IKK sería la responsable de un fenotipo de período muy largo en ratones, mientras que en nuestro laboratorio demostramos que al inhibir la actividad de NF- κ B con PDTC se bloquean los avances de fase inducidos por luz en hámsteres. Evidencias más indirectas incluyen la descripción de ritmos diarios de la actividad de NF- κ B en corteza cerebral asociada a los efectos de citoquinas proinflamatorias en el ciclo sueño-vigilia (Krueger *et al.* 2003) y variaciones diarias de actividad y expresión en el bazo vinculadas al efecto inmunomodulador de la melatonina.

En conjunto, los resultados de este trabajo, sumados a los trabajos presentados por otros grupos, sugieren inequívocamente que los componentes de la vía de NF- κ B están involucrados en el sistema circadiano.

Participación de citoquinas en las interacciones neuroinmunes en el sistema circadiano:

Si bien hemos medido la producción de citoquinas en respuesta al LPS por diversos métodos, los resultados obtenidos reflejan una muy baja expresión en respuesta a una dosis de 25 µg/kg. Dado que además se trata de métodos muy sensibles, que detectan concentraciones de por lo menos un orden de magnitud menos que las mínimas concentraciones a las que se debe llegar para inducir procesos febriles, debemos concluir que la liberación de estas citoquinas al torrente sanguíneo no parece ser el mecanismo que interviene en la generación de los cambios de fase inducidos por LPS. Sin embargo, no podemos excluir la posibilidad de que un factor distinto a IL-1 o TNF α sea el mediador de esta respuesta.

Si bien se asocia en general la administración de LPS con el aumento de los niveles plasmáticos de citoquinas proinflamatorias, es necesario tener en cuenta que en términos generales éstas participan en procesos que involucran señalización de tipo parácrina y no como mensajeros endócrinos actuando sobre blancos a grandes distancias del sitio de inflamación. Por otro lado se ha observado que es posible inducir procesos febriles con dosis de LPS o citoquinas que no llegan a producir niveles detectables de citoquinas circulantes (Long *et al.* 1990; Maier *et al.* 1998). Si bien se podría postular un mediador distinto a IL-1 también en este caso, esto es poco probable ya que la administración de IL-1Ra es capaz de bloquear la fiebre.

En contraste con estos resultados, se ha reportado que la administración subcutánea de IFN produce una disminución de la expresión de mCry, mPer2 BMAL y CLOCK en los NSQ y también un cambio de fase y disminución de la expresión de mPER1 en estos núcleos (Koyanagi y Ohdo 2002). La vía por la cual llegaría el IFN hasta los NSQ no fue estudiada hasta el momento pero dado que se trata de una

administración subcutánea es altamente probable que la vía humoral sea importante, aunque no puede descartarse una vía neural.

Sea por vía humoral o nerviosa, una vez que la información llega al SNC es probable que induzca la liberación de moléculas de señalización entre las cuales las citoquinas son fuertes candidatos. Como se puede observar en la figura 5.18, tanto la administración i.c.v. de IL-1 β como la de TNF α producen retrasos de fase al ser administradas a CT 15. Esto abre la posibilidad de que estas citoquinas sean capaces de mediar la respuesta del sistema circadiano al LPS. Esta no es la primera evidencia de la acción directa de citoquinas o LPS sobre los NSQ. Nava y colaboradores mostraron que al aplicar LPS a explantos de NSQ en cultivo, se observan alteraciones en el ritmo de liberación de AVP (Nava *et al.* 2000) y el tratamiento de rebanadas coronales de cerebro conteniendo a los NSQ, con una mezcla de LPS, IFN y TNF produjo alteraciones del ritmo de actividad eléctrica en los NSQ (Lundkvist *et al.* 2002). Además, en este último trabajo se describió la presencia del receptor de IFN γ en los NSQ observando una variación diaria en su expresión dependiente de luz. No existe información de la expresión de receptores de otras citoquinas en los NSQ a excepción del p75 que es un receptor de baja afinidad para TNF (Beaule y Amir 2001).

Otras evidencias de la acción de citoquinas sobre el sistema circadiano incluyen un aumento de la expresión de mPer1 en respuesta a IL-6 en cultivos celulares transfectados con un plásmido con el gen de luciferasa controlado por el promotor de mPer1 efecto de IL-6 sobre la transcripción de mPer1 (Motzkus *et al.* 2002) y el efecto de enmascaramiento producido por la citoquina tipo cardiolipina al administrarla i.c.v. Además, (Alheim y Bartfai 1998) sugieren que IL-1 β estaría involucrada en el control de los ritmos diarios de temperatura ya que los ratones

transgénicos que no expresan esta citoquina presentan una clara hipertermia. Por último, es necesario destacar el trabajo del grupo de Krueger que demostró un importante rol de las citoquinas proinflamatorias centrales en la modulación del ciclo sueño-vigilia, ritmo estrechamente relacionado con el sistema circadianos (revisado en (Krueger *et al.* 2003).

Los astrocitos como posibles mediadores de las interacciones neuroinmunes:

Dentro de la compleja anatomía de los NSQ se encuentra un gran número de astrocitos cuya función dentro del sistema circadiano no ha sido determinada aún con claridad. Los astrocitos presentan en general receptores para IL-1 β y para TNF α , además de receptores para otras citoquinas. Por otro lado, son capaces de sintetizar citoquinas proinflamatorias y modular la actividad sináptica y la actividad eléctrica de las neuronas. Estas características sugieren que los astrocitos podrían estar involucrados en las interacciones neuroinmunes en el sistema circadiano de ratones.

Como se puede ver en la figura 5.19, existe tendencia de variación circadiana en la GFAPir en los NSQ de ratones C57Bl/6 con niveles máximos durante las primeras horas del día y mínimos durante las primeras horas de la noche. Este resultado coincide con trabajos previos presentados por otros grupos (Lavialle *et al.* 2001) y junto al hallazgo de una variación diaria en la distribución de la enzima glucógeno fosforilasa (presente en astrocitos pero no en neuronas) en los NSQ (Harley *et al.* 2001), sugiere que existen ritmos circadianos en la fisiología de los astrocitos de los NSQ. Recientemente Herzog y colaboradores mostraron que astrocitos provenientes de corteza cerebral también presentan ritmos circadianos aunque estos ritmos son amortiguados y desaparecen luego del tercer o cuarto ciclo a excepción de que se los exponga a explantos de NSQ (Prolo *et al.* 2005).

Por otro lado, nosotros observamos que astrocitos de los NSQ expresan NF- κ B y que esta expresión se mantiene en cultivos primarios de astrocitos provenientes de los NSQ de neonatos (figuras 5.20 y 5.21). Además, en estos cultivos observamos un aumento de la actividad de este factor de transcripción en respuesta a LPS, IL-1 y TNF α (figura 5.22). Los resultados obtenidos coinciden con trabajos previos en los que se observa una mayor activación por parte de estímulos del sistema inmune innato que mediante la aplicación directa de citoquinas proinflamatorias (Liu *et al.* 2000; Carpentier *et al.* 2005). En contraposición, se observa una disminución de la actividad transcripcional κ B en respuesta al glutamato, respuesta que es característica de astrocitos pero no es frecuente en otros tipos celulares en el SNC (Lin y Murphy 1997; Meffert *et al.* 2003).

El rol de los astrocitos en el SNC está siendo redefinido y el sistema circadiano no escapa a esto. En base a los resultados obtenidos en este trabajo podemos decir que los astrocitos de los NSQ tienen la capacidad de participar de las interacciones neuroinmunes *in vitro*, sin embargo es necesario tomar estos resultados con precaución dado que hasta el momento no pudimos encontrar evidencias *in vivo* que permitan asegurar que los astrocitos de los NSQ participan efectivamente de estos procesos. Como se mencionó en la introducción, el estudio de las funciones de los astrocitos *in vivo* no es sencillo. Aún si encontráramos que la administración de LPS o citoquinas producen modificaciones estructurales o metabólicas en los astrocitos de los NSQ, esto no implica inequívocamente que estas modificaciones sean necesarias para las alteraciones observadas en el sistema circadiano tras la administración de estas drogas.

Por otro lado, no podemos, bajo ningún punto de vista, descartar un efecto directo de variables inmunológicas sobre las neuronas de los NSQ; simplemente

podemos decir que los astrocitos de los NSQ podrían estar involucrados en la respuesta, así como es probable que participen de la respuesta de los NSQ frente a muy diversos estímulos.

El sistema circadiano en el proceso de sepsis

Hasta el momento hemos descrito el efecto sobre el sistema circadiano de la administración de LPS y citoquinas en muy bajas concentraciones. En los animales utilizados en este trabajo, la dosis de LPS administrada no produce cambios en la temperatura corporal e induce la producción de citoquinas periféricas, pero en niveles apenas detectables. Las dosis de IL-1 β y TNF α administradas i.c.v. son de las más bajas encontradas en la literatura. Sin embargo, sabemos que los efectos de las citoquinas y del LPS cambian mucho de acuerdo con las dosis utilizadas: a dosis altas se puede llegar a provocar un shock séptico en muchos casos letal. Dado que nuestra hipótesis propone una interacción bidireccional entre los sistemas inmune y circadiano decidimos estudiar el sistema en un estado claramente patológico.

De acuerdo con lo reportado por Halberg en 1960, la mortalidad inducida por endotoxina de *E. coli* en ratones BalbC depende dramáticamente de la hora del día en que ésta se administre. En particular, la mortalidad frente a una misma dosis de endotoxina resultó tener un máximo (aproximadamente 80% de mortalidad) durante la tarde y un mínimo (20% de mortalidad) durante la noche. Un resultado similar fue obtenido para el tratamiento con altas dosis de TNF α (Wongwiwat *et al.* 1972; Hrushesky *et al.* 1994).

Dado que los experimentos de Halberg no habían sido repetidos por otros laboratorios ni en otra cepa de ratones, analizamos en este trabajo la mortalidad inducida por altas dosis de LPS durante la tarde y durante la noche y el efecto de este

tratamiento sobre la actividad locomotora y la temperatura.. El resultado obtenido fue similar al obtenido por Halberg para BalbC con un 80-100% de mortalidad durante la tarde y 10-20% de mortalidad inducida por el tratamiento nocturno (figura 5.23.a). También pudimos observar una mayor tasa de mortalidad en los animales tratados durante la tarde con respecto a aquellos tratados por la noche (figura 5.23.b). El LPS indujo además una clara hipotermia y un enmascaramiento de los ritmos circadianos por un período de aproximadamente tres días (figura 5.24).

Esto sugiere fuertemente que el sistema circadiano estaría regulando la respuesta inducida por dosis altas de endotoxina y coincide notablemente con la disminución en la respuesta del eje HPA al LPS en animales con los NSQ lesionados (Givalois *et al.* 1999). Sin embargo, para poder concluir que el sistema circadiano endógeno es indispensable para la variación en la respuesta al LPS, es necesario que la respuesta se mantenga en condiciones de libre curso. Esto no es lo que parece ocurrir en función de nuestros resultados preliminares. En animales mantenidos en DD, no observamos diferencias en la mortalidad inducida por dosis letales de LPS a CT11 y a CT 19. De hecho, la mortalidad en los animales tratados en ambos horarios fue cercana al 100%, un resultado difícil de interpretar ya que sugiere que durante la noche existiría un mecanismo de protección de los animales frente al shock séptico pero solamente si están en un ciclo LD.

La melatonina sería un buen candidato a ser responsable de los resultados observados ya que tiene un conocido efecto inmunosupresor, aumenta durante la noche y su síntesis es inhibida en presencia de luz. Además, si bien no existen muchos datos referentes al ritmo de melatonina en condiciones de libre curso, es probable que sus niveles plasmáticos disminuyan en DD. Sin embargo, tanto los ratones BalbC como los ratones C57Bl/6 son animales que presentan niveles plasmáticos de

melatonina extremadamente bajos y la presencia de luz durante la noche - que disminuye normalmente los niveles de melatonina circulante - no aumentó la mortalidad en los animales tratados a ZT19.

Existen muchas explicaciones posibles para los resultados observados. Por un lado, podría ser que el sistema circadiano regule la respuesta aguda al LPS de forma tal que ésta sea mayor durante el día que durante la noche pero que no sea capaz de regular la respuesta a largo plazo. Una vez iniciada la respuesta aguda, otros factores podrían determinar la supervivencia del animal, siendo posible que la ausencia de un ciclo de luz- oscuridad sea deletérea para la salud de una animal que entró en estado de sepsis. En concordancia con esta idea existen trabajos en los que se ha planteado que la presencia de ciclos normales de actividad/reposo están vinculados a una mejora en la calidad de vida tanto en pacientes como en modelos animales (Mormont y Waterhouse 2002). En este contexto la presencia de ritmos circadianos ha sido considerada como un indicador de calidad de vida por Bauhofer y colaboradores (Bauhofer *et al.* 2001) (Bauhofer *et al.* 2002). Los experimentos necesarios para poner a prueba este tipo de hipótesis son complejos pero la gran incidencia de septicemia en la población, así como el alto índice de mortalidad que presenta, hace de éste un tema que merece ser investigado en profundidad. Las diferencias en la mortalidad inducida por LPS a distintos horarios es tan grande que sin duda debe ser tomada en cuenta dados los resultados de recuperación obtenida con tratamientos más caros y sofisticados que existen en la actualidad.

Hacia un modelo de la relación inmune-circadiana:

En base a lo dicho anteriormente y a los resultados presentados, podemos entonces plantear un modelo tentativo para explicar la interacción entre los sistemas

inmune y circadiano en ratones. No pretendemos en absoluto que este modelo sea definitivo sino que esperamos que sirva para plantear nuevos experimentos que lleven nuestra comprensión de estos sistemas un poco más allá de nuestros horizontes actuales.

Como se puede ver en la figura 6.1, la administración de LPS i.p. actuaría por dos vías posibles y no excluyentes. Una sería una vía neural mediada posiblemente por el nervio vago (X par craneal) y otra estaría mediada por un aumento en los niveles de citoquinas proinflamatorias en la periferia. En este último caso, las citoquinas llegarían eventualmente al endotelio vascular y, tras ser activadas, las células endoteliales podrían producir citoquinas proinflamatorias u otros factores capaces de transmitir la información del estímulo a diversas áreas del cerebro. Si bien desconocemos cuál es el factor que determinará en última instancia que se produzcan los cambios de fase o el enmascaramiento y dónde es que este factor actúa, el hecho de que la administración central de IL-1 β y TNF α produzca efectos similares al LPS periférico sugiere que la producción central de citoquinas podría estar involucrada en la respuesta al LPS.

Por lo tanto, siguiendo nuestra línea de pensamiento podemos pensar que las citoquinas periféricas activarían al endotelio cerebral y éste, a su vez, liberaría citoquinas o induciría a algún otro tipo celular del SNC a hacerlo. Los principales candidatos como células mediadoras son los astrocitos y las células de la microglia. Es posible que la liberación de citoquinas dentro del SNC lleve a la activación de los astrocitos y estos sean capaces a su vez de modular la actividad eléctrica de las neuronas en lugares como los NPV donde se induce la expresión de mPer1 y caos; estos núcleos podrían, a su vez, enviar una señal sincronizadora a los NSQ. Existe la posibilidad de que la activación de los NSQ y de los NPV sean eventos en paralelo y

no en serie, ya que el LPS activa muchos otros núcleos hipotalámicos como los núcleos hipotalámicos anteriores, los núcleos supraópticos, la zona retroquiasmática, el núcleo arcuato el núcleos dorsal del hipotálamo, y se sabe que estos proyectan tanto a los NPV como a los NSQ.

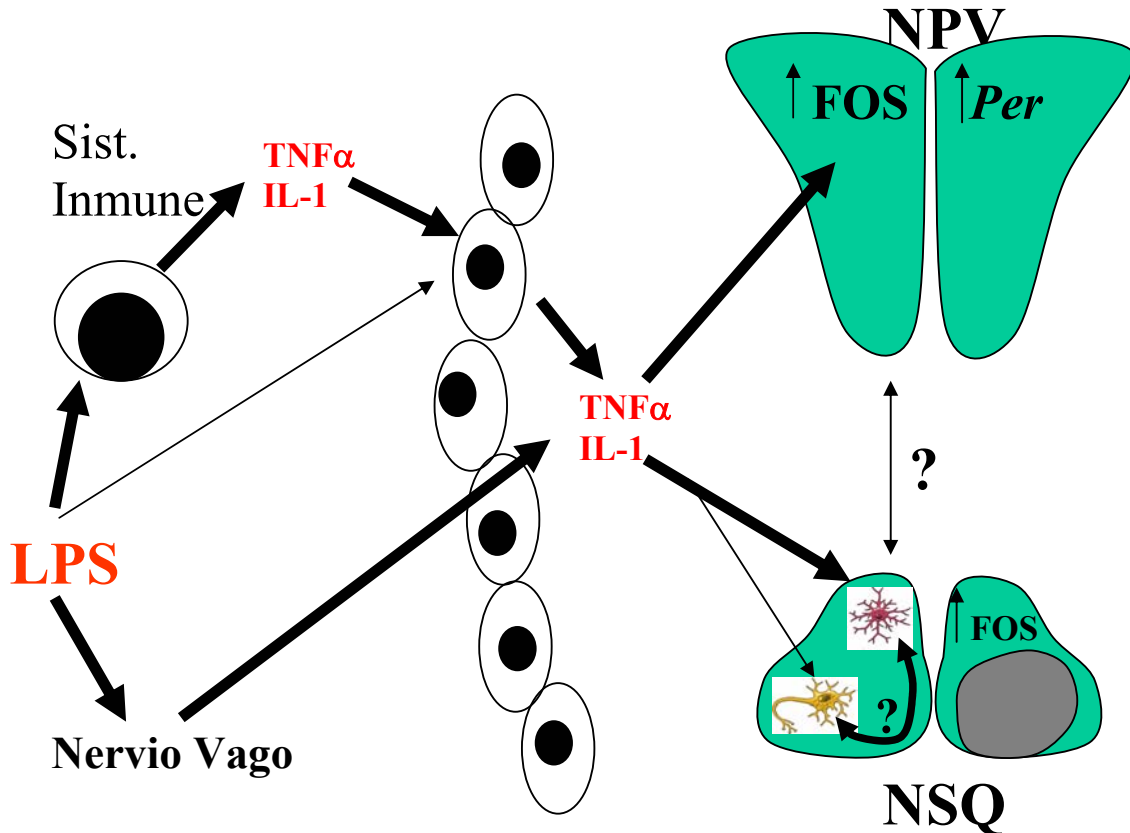


Figura 6.1. Esquema de las posibles vías de interacción entre los sistemas inmune y circadiano.

Una vez administrado el LPS se genera una respuesta compleja que incluye la activación de varios núcleos cerebrales incluyendo los NSQ y los NPV y generando alteraciones comportamentales entre las cuales se encuentran retrasos de fase de tipo fóticos. La activación de los NSQ se evidencia por el aumento de la inmunoreactividad de CFOS en la zona dorsal de los mismos.

En respuesta a dosis bajas, es probable que las vías por las cuales llega la información desde la periferia hacia el SNC sean a través del nervio vago o por medio de la liberación de citoquinas proinflamatorias. En cualquiera de estas dos situaciones se ha reportado que dentro del SNC aumentan las citoquinas TNF e IL-1 (entre otras) y en este trabajo demostramos que éstas son capaces de inducir retrasos de fase del ritmo de actividad locomotora en rueda. Hemos visto además que los astrocitos de los NSQ expresan NF-κB y son capaces de responder a citoquinas proinflamatorias mediante la activación de este factor de transcripción. Así es probable que estas células participen como mediadoras de la respuesta del sistema circadiano a las variables inmunológicas.

Si bien la activación de los NPV en respuesta al LPS se hace evidente por un aumento en la expresión de mPer y de cFOS desconocemos aún si esta respuesta está involucrada de alguna forma en los cambios observados en el sistema circadiano.

La información generada por la aplicación del LPS periférico llegaría rápidamente por vía nerviosa al SNC. Una vez en el SNC es probable que la secuencia

sea similar a la descrita anteriormente, con liberación de citoquinas centrales y/o algunos otros factores y la activación de varios núcleos hipotalámicos, entre ellos los NSQ y NPV. Existen evidencias a favor y en contra de cada una de las alternativas propuestas en nuestro modelo e intentaremos discutir las brevemente a continuación.

Nos encontramos con la primera disyuntiva al existir una vía nerviosa y una humoral para la llegada de la información generada por el LPS al SNC. Cabe destacar en este sentido que ambas vías han sido caracterizadas previamente por numerosos autores y la relevancia de cada una de ellas en la comunicación periferia-SNC es todavía tema controversial. El LPS produce un aumento de las citoquinas periféricas y fue demostrado que el endotelio vascular cerebral se activa en presencia de altos niveles de citoquinas circulantes (Quan *et al.* 2003; Singh y Jiang 2004). Sin embargo, es necesario destacar que los niveles de citoquinas inducidos por el tratamiento con LPS en este trabajo son realmente bajos, lo cual sugiere que esta vía de acción es la menos probable.

Se ha demostrado la presencia de receptores para varias citoquinas, incluidas IL-1 y TNF α en las células endoteliales del cerebro (Quan *et al.* 2003; Konsman *et al.* 2004; Cartier *et al.* 2005) y se sabe que, una vez activadas, pueden liberar numerosas moléculas señalizadoras, incluidas citoquinas proinflamatorias, prostaglandinas y NO (McCann *et al.* 1998, 2002). En este modelo, sin embargo, la penetración de las citoquinas en el parénquima cerebral no fue determinada con claridad y algunos autores proponen que es bastante baja. En particular es necesario resaltar las investigaciones de Ohdo y colaboradores con IFN α ; en sucesivos trabajos analizaron el efecto de la administración aguda o crónica sobre el sistema circadiano hallando que efectivamente se producen alteraciones tanto a nivel comportamental como a nivel de genes reloj en los NSQ y tejidos periféricos (Ohdo *et al.* 2001; Koyanagi y

Ohdo 2002). En estos trabajos la administración de la citoquina se realizó en forma subcutánea y es altamente probable que la vía de acción sea humoral.

Sin embargo existen algunas respuestas entre las que se destaca el aumento agudo de la temperatura corporal (inicio de la fiebre) que se dan extremadamente rápido y no parecen estar mediadas por citoquinas periféricas. Al administrar LPS en forma periférica, la temperatura corporal aumenta en menos de 5 minutos, lo cual resulta casi imposible por cualquier otra vía que no sea nerviosa (Kluger 1991). Asimismo, se ha reportado la inducción de fiebre en animales tratados con dosis de LPS que no llegan a estimular la expresión de niveles detectables de citoquinas circulantes. La respuesta de enmascaramiento de la actividad observada en este trabajo oscila alrededor de los 20 minutos, aunque en algunos casos fue menor, mientras que la aparición de citoquinas en sangre suele demorar por lo menos 30 minutos aun en tratamientos con dosis letales de LPS. Esto sugiere que el enmascaramiento inducido por LPS podría seguir una vía nerviosa directa; sin embargo, se trata de una evidencia circunstancial y no podemos asegurar que los cambios de fase vayan por la misma vía. La vía nerviosa mediada por el nervio vago que lleva la señal hasta el SNC está bien caracterizada. En primer término se observa la activación del núcleo del tracto solitario (NTS) y el área postrema, luego por una vía monosináptica estos activan a los NPV y al área preóptica del hipotálamo anterior, y finalmente en tercer orden se observa la activación de varios núcleos hipotalámicos entre los que se encuentran los NSQ (Fernandez-Galaz *et al.* 1994; Wan *et al.* 1994; Linthorst *et al.* 1995). Estudios realizados por marcación retrógrada con toxina colérica demostraron que existen conexiones multisinápticas tanto desde NTS como desde AP hacia los NSQ (Krout *et al.* 2002). También se hallaron conexiones mono y multisinápticas desde la mayoría de los núcleos hipotalámicos incluyendo los NPV

(Moga y Moore 1997); revisado en Morse y Sassone-Corsi, 2002). Dado que la estimulación con LPS puede llegar por vía vagal a los NSQ es posible que por esta misma vía se induzcan los cambios de fase. Experimentos en animales vagotomizados podrían contribuir a determinar la relevancia de cada una de estas vías en las interacciones neuroinmunes en el sistema circadiano.

Tanto por vía nerviosa como por vía humoral es probable que la señal conduzca finalmente a la síntesis de citoquinas centrales. Esto fue demostrado ya en numerosos modelos de inflamación aunque todavía estamos lejos de entender exactamente cuál es el rol de las citoquinas centrales y cuáles son los mecanismos que llevan a su liberación (Kakizaki *et al.* 1999). Si bien los experimentos presentados en este trabajo no son concluyentes respecto a este punto, el hecho de que la administración de IL-1 β o TNF α a CT 15 produzca retrasos de fase similares a los inducidos por LPS sugiere fuertemente que las citoquinas centrales juegan un rol importante en la respuesta del sistema circadiano a las señales provenientes del sistema inmune. Es importante en este sentido destacar que algunos de los trabajos que vinculan a los sistemas circadiano e inmune desde un enfoque cronobiológico se realizaron en rebanadas de cerebro que contenían a los NSQ o en explantos de NSQ mantenidos en cultivo. Analizando el ritmo de liberación de AVP como variable de salida de los NSQ, Nava y colaboradores observaron alteraciones en respuesta a la estimulación con LPS (Nava *et al.* 2000). Asimismo fue reportado que la electrofisiología de los NSQ se ve alterada por la aplicación de una mezcla de IFN γ , LPS y TNF α (Lundkvist *et al.* 2002). Esto sugiere un efecto directo de variables inmunológicas sobre el reloj biológico y concuerda en cierta forma con los resultados obtenidos en este trabajo. Si bien no fue descrita hasta el día de hoy la expresión de receptores de citoquinas en los NSQ, a excepción de los receptores de IFN (Lundkvist

et al. 1998), que presentan variaciones diarias en su expresión, es altamente probable que esto obedezca más a problemas de índole técnico que a la verdadera ausencia de estos receptores.

Hasta el momento tenemos entonces una activación periférica del sistema inmune que envía información probablemente vía nerviosa (aunque la vía humoral no queda descartada) y la consecuente producción de citoquinas centrales que conduce a la activación de varios núcleos hipotalámicos entre los que se encuentran los NSQ y los NPV. Estos núcleos probablemente interactúen de forma tal que el resultado final es la activación de la región dorsal de los NSQ y el aumento en la expresión de mPer1 en los NPV. Pero hasta el momento no mencionamos a los astrocitos en todo este proceso.

A pesar de la existencia de una decena de publicaciones que involucran a los astrocitos en el sistema circadiano, el rol de estas células en este contexto está lejos de ser comprendido. Esto no se debe a deficiencias en la calidad de los trabajos que se han realizado hasta la actualidad sino a las grandes dificultades que plantea el estudio del rol de los astrocitos *in vivo* o en sistemas *in vitro* complejos como las rebanadas de cerebro o los explantos de NSQ. Sin embargo, la comprensión del rol de los astrocitos en el SNC y de la glía en general avanzó en forma explosiva en la última década. Este gran avance en la comprensión de la fisiología de los astrocitos nos llevó a comprender que existe una interacción importante entre astrocitos y neuronas en la que estas últimas no son las únicas que cumplen un papel activo. Sabemos ahora que los astrocitos pueden modular prácticamente todas las actividades de las neuronas incluyendo su actividad eléctrica, la síntesis de neurotransmisores, el metabolismo general y el proceso sináptico. Este conocimiento nos permite especular acerca del rol

de los astrocitos en las interacciones neuroinmunes en el sistema circadiano y proponer un modelo que deberá ser puesto a prueba en trabajos futuros (figura 6.2).

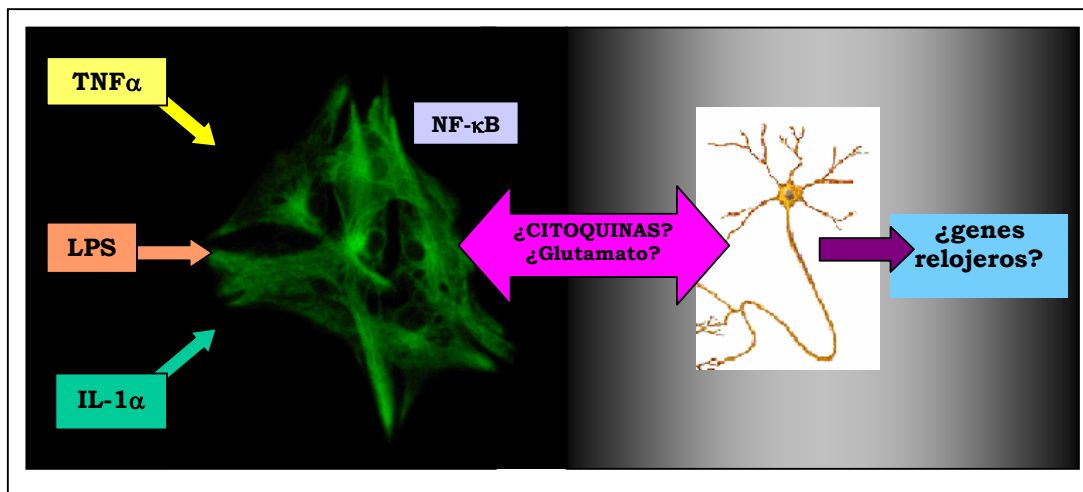


Figura 6.2. Modelo de interacción propuesto entre astrocitos y neuronas en los NSQ.

Los astrocitos de los NSQ son capaces de responder a LPS, IL-1 y TNF α activando al factor de transcripción NF- κ B. Una vez activado este factor de transcripción, los astrocitos podrían liberar mensajeros químicos capaces de modular la actividad neuronal de los NSQ. Las sustancias que los astrocitos pueden liberar en respuesta a citoquinas son muchas pero los candidatos más interesantes son las mismas citoquinas y el glutamato.

La identidad de estos mediadores podría ser develada estimulando cultivos neuronales de NSQ con medios condicionados de astrocitos tratados con citoquinas en presencia o ausencia de inhibidores o antagonistas específicos.

Sea que lleguen desde la periferia o sean producidas dentro mismo del SNC, la respuesta a la administración periférica de LPS lleva al aumento de los niveles de citoquinas en el SNC. De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, los astrocitos de los NSQ tienen la capacidad de responder tanto a IL-1 como a TNF α . Probablemente no sean capaces de responder a IL-6 ya que hasta el momento no se han descrito sus receptores en astrocitos (Wesemann y Benveniste, 2004). La respuesta de los astrocitos a IL-1 es sumamente compleja e involucra la liberación de un gran número de sustancias incluyendo componentes de matriz extracelular, citoquinas, quemoquinas, purinas, factores de crecimiento, metaloproteínas y otras enzimas (revisado en John *et al.*, 2005). Además modifica la expresión de proteínas del citoesqueleto y de proteínas de adhesión e induce la expresión de NF- κ B y otros

factores de transcripción, así como la expresión de la iNOS. Así, es posible que al ser estimulados por las citoquinas proinflamatorias, los astrocitos liberen moléculas como citoquinas, glutamato y otras, y modulen así la actividad neuronal de los NSQ y su respuesta a diversos estímulos entre los cuales pueden estar incluídas también las citoquinas.

La respuesta de los astrocitos presenta una curiosa particularidad: su gran complejidad. La activación de un único tipo de receptores (aun en baja cantidad), es capaz de producir la liberación de glutamato no solamente por sí mismo sino también aumentando la liberación de múltiples mediadores autócrinos/parácrinos que actúan en forma sinérgica como amplificadores espaciotemporales de la respuesta (Volterra y Meldolesi, 2004). Por ejemplo, en el caso de la respuesta a IL-1 (Figura 6.3) se observa que esta citoquina aumenta la liberación de TNF α y la expresión de varios receptores, entre ellos el de TNF α y receptores purinérgicos como los A_{2a} de adenosina y los P2X₇ activables por ATP (revisado en (John *et al.* 2005). El TNF α es capaz de inducir la liberación de glutamato por sí mismo pero además induce la liberación de adenosina y de ATP, que en forma autócrina y parácrina activan los receptores de purinas que habían sido inducidos por IL-1 (Liu *et al.* 2000; John *et al.* 2003). La activación de estos receptores produce la liberación de glutamato y aspartato por medio de variados mecanismos de liberación que incluyen mecanismos mediados por exocitosis vesicular (revisado en Nishizaki, 2004) o por medio de la activación de receptores purinérgicos de tipo P2X₇, que forman canales por los que pueden pasar glutamato y aspartato (Duan *et al.* 2003). La liberación de aminoácidos excitatorios es capaz de modificar la actividad sináptica, como se ha demostrado en numerosos trabajos (Parpura *et al.* 1994; Araque *et al.* 1998). Un ejemplo de esto es la facilitación sináptica observada en hipocampo tras la administración de adenosina, un

efecto que no esta mediado alteraciones en la liberación presináptica de GABA o glutamato ni cambios en las conductancias gabaérgicas y glutamatérgicas potsinápticas (Nishizaki *et al.* 2002).

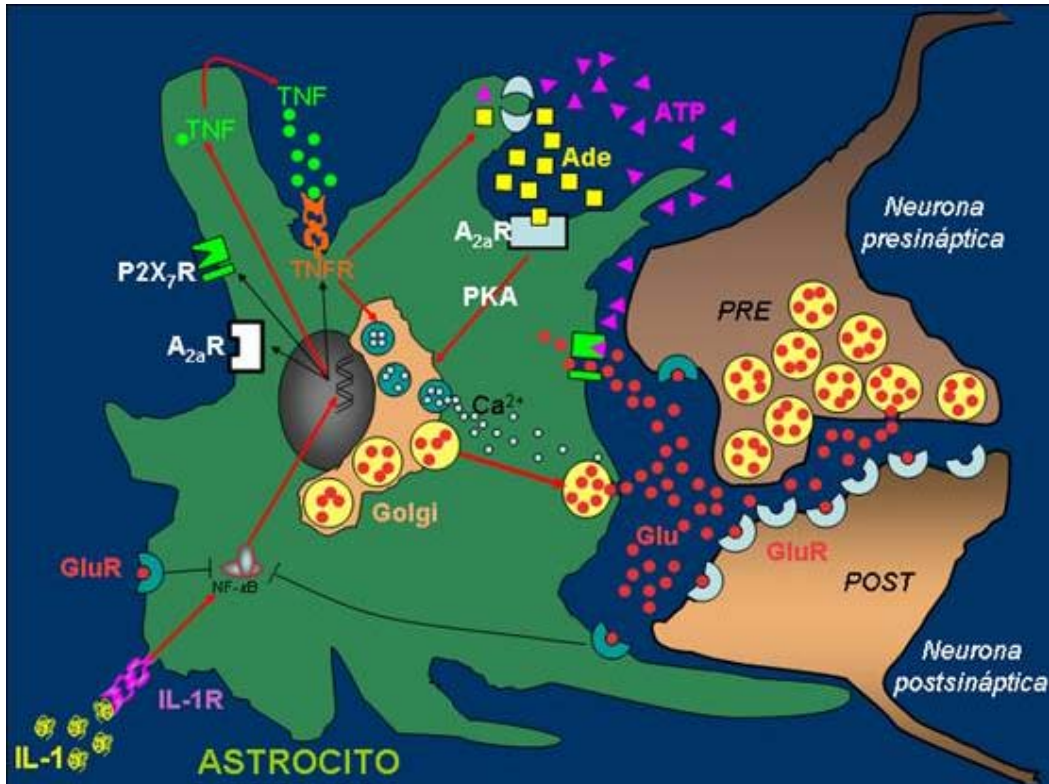


Figura 6.2. Posible vía de interacción entre astrocitos y neuronas en respuesta a $IL-1\beta$ y $TNF\alpha$.

En respuesta a $IL-1$ y $TNF\alpha$ los astrocitos son capaces de liberar una gran variedad de sustancias incluyendo glutamato. Estas sustancias pueden actuar en forma parácrina sobre sinapsis cercanas. Además de la liberación de glutamato se produce un aumento en la expresión y actividad de numerosos receptores incluyendo el de $TNF\alpha$, los de purinas y de quemoquinas. Todas estas acciones son mediadas por el factor de transcripción $NF-\kappa B$.

A la liberación de glutamato inducida por purinas se le suma un efecto inhibitorio de $IL-1$ sobre la actividad del transportador glial de glutamato $GLT-1$ y de la actividad de la enzima glutamina sintetasa, lo que contribuye al aumento de la concentración de glutamato en el espacio sináptico (Nishizaki *et al.* 2002). En conjunto todos estos factores hacen que en presencia de $IL-1$ o $TNF\alpha$ se produzca un cambio en la transmisión sináptica de las neuronas asociadas a los astrocitos activados por las citoquinas. Todos estos efectos inducidos por $IL-1$ en astrocitos dependen en

gran medida de la activación del factor de transcripción NF- κ B, el cual, de acuerdo con los resultados presentados en este trabajo, es expresado y es activable por IL-1 y TNF α en los astrocitos de los NSQ.

La observación de que la actividad de NF- κ B en respuesta a glutamato disminuye en los astrocitos de los NSQ resulta interesante ya que ayuda a plantear un posible mecanismo de acción para la interacción observada entre las vías activadas por luz y por LPS. La activación de los astrocitos de los NSQ por parte de las citoquinas proinflamatorias produciría la liberación de glutamato en la zona dorsal de los NSQ generando los cambios de fase observados en respuesta a la administración periférica de LPS. En el caso de la coadministración, el glutamato liberado en los NSQ podría producir un efecto inhibitorio sobre la actividad de NF- κ B en los astrocitos, inhibiendo así la liberación de glutamato inducida por IL-1. De esta forma al coadministrar luz y LPS se obtendría exclusivamente el efecto inducido por luz.

La interacción también podría explicarse mediante la acción de GABA en lugar de glutamato. Ambos neurotransmisores han sido descritos en los NSQ de ratón tanto en la región ventrolateral como en la región dorsal, aunque en otros roedores el glutamato parece estar localizado preferentemente en la zona ventrolateral. Se sabe que en respuesta a los pulsos de luz se activan sinapsis gabaérgicas (Cardinali y Golombek 1998) de forma tal que este neurotransmisor podría estar inhibiendo la liberación de glutamato por parte de los astrocitos de los NSQ en respuesta al LPS intraperitoneal.

Finalmente, si bien el modelo planteado puede ser considerado extremadamente simplista, resulta inevitable a esta altura asumir que existe una comunicación bidireccional entre los sistemas circadiano e inmune. Sin duda alguna se necesitan más experimentos que permitan demostrar inequívocamente cuál es el

sustrato anatómico vinculado a los cambios de fase inducidos por LPS y por citoquinas y cuál es el rol de los astrocitos en en estos procesos. Esto implicará también un avance en nuestro conocimiento acerca de la interacción entre diversos núcleos hipotalámicos y entre éstos y el resto del SNC, así como una mayor comprensión del rol de los astrocitos en el sistema circadiano y en el SNC en general. Los detalles de la interacción inmuno-circadiana merecen ser estudiados exhaustivamente como lo demuestra en este trabajo la posible vinculación entre el sistema circadiano y la mortalidad inducida por LPS, un tema de gran relevancia clínica.

El sistema circadiano es capaz de modular prácticamente todos los procesos fisiológicos y comportamentales. Esto hace que su estudio sea fundamental para entender estos procesos que, después de todo, son nuestra vida cotidiana o, en palabras de J.T.Fraser, nuestro presente orgánico.

Conclusiones

7. Conclusiones:

En base a los resultados obtenidos en este trabajo de tesis podemos concluir que existe una vía de interacción desde el sistema inmunológico hacia el sistema circadiano. La activación de dicha vía es capaz de sincronizar los ritmos de actividad locomotora en rueda por medio de retrasos de fase durante el comienzo de la noche subjetiva y alterar la salida del sistema circadiano en forma aguda enmascarando la expresión de los ritmos circadianos de actividad en forma transitoria. Esta vía (que, dado el control circadiano de muchas variables del sistema inmune podría ser considerada como de retroalimentación) involucra la activación de la zona dorsomedial de los NSQ, lo que pone en evidencia una vez más la notable complejidad anatómica y funcional de estos núcleos. La interacción neuroinmune en el sistema circadiano incluye también la participación de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β y TNF α) a nivel central y de la activación del factor de transcripción NF- κ B.

Esta interacción entre los sistemas inmune y circadiano es bidireccional: así como las variables inmunológicas proinflamatorias son capaces de modificar al sistema circadiano, éste es capaz de modular notablemente la respuesta inmunológica. Esto se hace evidente al observar la diferencia en la sensibilidad a la administración de endotoxina a distintos horarios tanto en dosis bajas como en dosis letales.

De acuerdo a los resultados obtenidos hasta el momento no habría activación de los genes relojeros mBmal y mPer1 en los NSQ en respuesta a la administración de LPS en una dosis de 25 μ g/kg. Sí observamos un aumento de mPer1 en los NPV en respuesta a LPS a ZT15 (pero no a ZT 3) lo cual sugiere que los PVN podrían estar vinculados a la interacción entre los sistemas inmune y circadiano.

En conjunto, de los resultados presentados en este trabajo surge un modelo de interacción que debe ser puesto a prueba y que genera un gran número de interrogantes y experimentos posibles para responderlos. Algunos de los interrogantes más importantes que han surgido y que se ven reflejados en experimentos que ya se están llevando a cabo son:

¿Cuál es el rol de los astrocitos en las interacciones neuroinmunes del sistema circadiano y cuál es su rol en el sistema circadiano en general?

¿Qué tipo de células de los NSQ son las que responden a la administración de LPS i.p.?

¿Cuál es el rol de otras citoquinas pro y antiinflamatorias en el sistema circadiano (y cuál es el rol de las prostaglandinas)?

¿Cuál es el rol de los NPV en la interacción neuroinmune en el sistema circadiano y en particular cuál es el rol de los genes reloj en estos núcleos?

¿Cuál es el rol del sistema circadiano en el proceso de sepsis?

¿Aporta el sistema circadiano alguna ventaja en cuanto a la sobrevida en el proceso de sepsis?

¿Cuál es la vía por la cual llega la información del sistema inmune al sistema circadiano?

Algunos de los experimentos para responder a estas preguntas se están desarrollando. Es interesante notar que estos experimentos apuntan a cuestiones que atañen no solamente a la cronobiología si no a muchas otras áreas de la ciencia, ya que estamos hablando de entender mejor los mecanismos de interacción entre astrocitos y neuronas, entre distintos núcleos cerebrales (los NSQ y los NPV) y entre la periferia y el SNC, la modulación de los procesos implicados en la sepsis y el rol fisiológico de las citoquinas en el SNC.

Bibliografía

- Abo, T., T. Kawate, K. Itoh y K. Kumagai (1981). "Studies on the bioperiodicity of the immune response. I. Circadian rhythms of human T, B, and K cell traffic in the peripheral blood." J Immunol **126**(4): 1360-3.
- Abrahamson, E. E. y R. Y. Moore (2001). "Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections." Brain Res **916**(1-2): 172-91.
- Aguilar-Roblero, R., L. P. Morin y R. Y. Moore (1994). "Morphological correlates of circadian rhythm restoration induced by transplantation of the suprachiasmatic nucleus in hamsters." Exp Neurol **130**(2): 250-60.
- Albrecht, U., Z. S. Sun, G. Eichele y C. C. Lee (1997). "A differential response of two putative mammalian circadian regulators, mper1 and mper2, to light." Cell **91**(7): 1055-64.
- Albrecht, U., B. Zheng, D. Larkin, Z. S. Sun y C. C. Lee (2001). "MPer1 and mper2 are essential for normal resetting of the circadian clock." J Biol Rhythms **16**(2): 100-4.
- Alheim, K. y T. Bartfai (1998). "The interleukin-1 system: receptors, ligands, and ICE in the brain and their involvement in the fever response." Ann N Y Acad Sci **840**: 51-8.
- Allan, S. M., D. C. Harrison, S. Read, B. Collins, A. A. Parsons, K. Philpott y N. J. Rothwell (2001). "Selective increases in cytokine expression in the rat brain in response to striatal injection of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate and interleukin-1." Brain Res Mol Brain Res **93**(2): 180-9.
- Allan, S. M. y N. J. Rothwell (2001). "Cytokines and acute neurodegeneration." Nat Rev Neurosci **2**(10): 734-44.

- Alt, J. A., F. Obal, Jr., T. R. Traynor, J. Gardi, J. A. Majde y J. M. Krueger (2003). "Alterations in EEG activity and sleep after influenza viral infection in GHRH receptor-deficient mice." J Appl Physiol **95**(2): 460-8.
- Antoch, M. P., E. J. Song, A. M. Chang, M. H. Vitaterna, Y. Zhao, L. D. Wilsbacher, A. M. Sangoram, D. P. King, L. H. Pinto y J. S. Takahashi (1997). "Functional identification of the mouse circadian Clock gene by transgenic BAC rescue." Cell **89**(4): 655-67.
- Araque, A., R. P. Sanzgiri, V. Parpura y P. G. Haydon (1998). "Calcium elevation in astrocytes causes an NMDA receptor-dependent increase in the frequency of miniature synaptic currents in cultured hippocampal neurons." J Neurosci **18**(17): 6822-9.
- Araque, A., R. P. Sanzgiri, V. Parpura y P. G. Haydon (1999). "Astrocyte-induced modulation of synaptic transmission." Can J Physiol Pharmacol **77**(9): 699-706.
- Arenzana-Seisdedos, F., P. Turpin, M. Rodriguez, D. Thomas, R. T. Hay, J. L. Virelizier y C. Dargemont (1997). "Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm." J Cell Sci **110 (Pt 3)**: 369-78.
- Aronin, N., S. M. Sagar, F. R. Sharp y W. J. Schwartz (1990). "Light regulates expression of a Fos-related protein in rat suprachiasmatic nuclei." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(15): 5959-62.
- Arzt, E. S., S. Fernandez-Castelo, L. M. Finocchiaro, M. E. Criscuolo, A. Diaz, S. Finkielman y V. E. Nahmod (1988). "Immunomodulation by indoleamines: serotonin and melatonin action on DNA and interferon-gamma synthesis by human peripheral blood mononuclear cells." J Clin Immunol **8**(6): 513-20.
- Aschner, M. (1998a). "Astrocytes as mediators of immune and inflammatory responses in the CNS." Neurotoxicology **19**(2): 269-81.

- Aschner, M. (1998b). "Immune and inflammatory responses in the CNS: modulation by astrocytes." Toxicol Lett **102-103**: 283-7.
- Aschoff, J. (1960). "Exogenous and endogenous components in circadian rhythms." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **25**: 11-28.
- Azmitia, E. C. y M. Segal (1978). "An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat." J Comp Neurol **179**(3): 641-67.
- Bae, K. y D. R. Weaver (2003). "Light-induced phase shifts in mice lacking mPER1 or mPER2." J Biol Rhythms **18**(2): 123-33.
- Balsalobre, A., F. Damiola y U. Schibler (1998). "A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells." Cell **93**(6): 929-37.
- Bauhofer, A., K. Witte, I. Celik, S. Pummer, B. Lemmer y W. Lorenz (2001). "Sickness behaviour, an animal equivalent to human quality of life, is improved in septic rats by G-CSF and antibiotic prophylaxis." Langenbecks Arch Surg **386**(2): 132-40.
- Bauhofer, A., K. Witte, B. Lemmer, M. Middeke, W. Lorenz y I. Celik (2002). "Quality of life in animals as a new outcome for surgical research: G-CSF as a quality of life improving factor." Eur Surg Res **34**(1-2): 22-9.
- Beaule, C. y S. Amir (2001). "Photic regulation of circadian rhythms and the expression of p75 neurotrophin receptor immunoreactivity in the suprachiasmatic nucleus in rats." Brain Res **894**(2): 301-6.
- Beaule, C., B. Robinson, E. W. Lamont y S. Amir (2003). "Melanopsin in the circadian timing system." J Mol Neurosci **21**(1): 73-89.
- Beisel, W. R. (1975). "Metabolic response to infection." Annu Rev Med **26**: 9-20.

- Ben-Neriah, Y. (2002). "Regulatory functions of ubiquitination in the immune system." Nat Immunol **3**(1): 20-6.
- Bennett, M. R. y W. J. Schwartz (1994). "Are glia among the cells that express immunoreactive c-Fos in the suprachiasmatic nucleus?" Neuroreport **5**(14): 1737-40.
- Bentivoglio, M., G. Grassi-Zucconi, Z. C. Peng y K. Kristensson (1994). "Sleep and timekeeping changes, and dysregulation of the biological clock in experimental trypanosomiasis." Bull Soc Pathol Exot **87**(5): 372-5.
- Berczi, I. (1986). Pituitary function and immunity. Boca Raton, Fla., C.R.C. Press.
- Berczi, I. (1998). "Neurohormonal host defense in endotoxin shock." Ann N Y Acad Sci **840**: 787-802.
- Berkenbosch, F., J. van Oers, A. del Rey, F. Tilders y H. Besedovsky (1987). "Corticotropin-releasing factor-producing neurons in the rat activated by interleukin-1." Science **238**(4826): 524-6.
- Bernton, E. W., J. E. Beach, J. W. Holaday, R. C. Smallridge y H. G. Fein (1987). "Release of multiple hormones by a direct action of interleukin-1 on pituitary cells." Science **238**(4826): 519-21.
- Berson, D. M., F. A. Dunn y M. Takao (2002). "Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock." Science **295**(5557): 1070-3.
- Besedovsky, H. O., A. del Rey y E. Sorkin (1981). "Lymphokine-containing supernatants from con A-stimulated cells increase corticosterone blood levels." J Immunol **126**(1): 385-7.
- Blanque, R., C. Meakin, S. Millet y C. R. Gardner (1996). "Hypothermia as an indicator of the acute effects of lipopolysaccharides: comparison with serum levels of IL1 beta, IL6 and TNF alpha." Gen Pharmacol **27**(6): 973-7.

- Blanque, R., C. Meakin, S. Millet y C. R. Gardner (1999). "Dual mechanisms of action of interferon-gamma in potentiating responses to LPS in mice: IL1, TNFalpha and IL6 production in serum and hypothermia." Gen Pharmacol **32**(4): 453-61.
- Blatteis, C. M. (1992). "Role of the OVLT in the febrile response to circulating pyrogens." Prog Brain Res **91**: 409-12.
- Bluthe, R. M., S. Laye, B. Michaud, C. Combe, R. Dantzer y P. Parnet (2000a). "Role of interleukin-1beta and tumour necrosis factor-alpha in lipopolysaccharide-induced sickness behaviour: a study with interleukin-1 type I receptor-deficient mice." Eur J Neurosci **12**(12): 4447-56.
- Bluthe, R. M., B. Michaud, V. Poli y R. Dantzer (2000b). "Role of IL-6 in cytokine-induced sickness behavior: a study with IL-6 deficient mice." Physiol Behav **70**(3-4): 367-73.
- Bongrand, P., G. Bouvenot, R. Bartolin, J. Tatossian y B. Bruguerolle (1988). "Are there circadian variations of polymorphonuclear phagocytosis in man?" Chronobiol Int **5**(1): 81-3.
- Born, J., T. Lange, K. Hansen, M. Molle y H. L. Fehm (1997). "Effects of sleep and circadian rhythm on human circulating immune cells." J Immunol **158**(9): 4454-64.
- Bourin, P., I. Mansour, C. Doinel, R. Roue, P. Rouger y F. Levi (1993). "Circadian rhythms of circulating NK cells in healthy and human immunodeficiency virus-infected men." Chronobiol Int **10**(4): 298-305.
- Breder, C. D., C. Hazuka, T. Ghayur, C. Klug, M. Huginin, K. Yasuda, M. Teng y C. B. Saper (1994). "Regional induction of tumor necrosis factor alpha expression in the mouse brain after systemic lipopolysaccharide administration." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(24): 11393-7.

- Bredow, S., N. Guha-Thakurta, P. Taishi, F. Obal, Jr. y J. M. Krueger (1997). "Diurnal variations of tumor necrosis factor alpha mRNA and alpha-tubulin mRNA in rat brain." Neuroimmunomodulation **4**(2): 84-90.
- Brett, J., H. Gerlach, P. Nawroth, S. Steinberg, G. Godman y D. Stern (1989). "Tumor necrosis factor/cachectin increases permeability of endothelial cell monolayers by a mechanism involving regulatory G proteins." J Exp Med **169**(6): 1977-91.
- Brown, H. E. y T. F. Dougherty (1956). "The diurnal variation of blood leucocytes in normal and adrenalectomized mice." Endocrinology **58**(3): 365-75.
- Card, J. P. y R. Y. Moore (1982). "Ventral lateral geniculate nucleus efferents to the rat suprachiasmatic nucleus exhibit avian pancreatic polypeptide-like immunoreactivity." J Comp Neurol **206**(4): 390-6.
- Cardinali, D. P., L. I. Brusco, R. A. Cutrera, P. Castrillon y A. I. Esquifino (1999). "Melatonin as a time-meaningful signal in circadian organization of immune response." Biol Signals Recept **8**(1-2): 41-8.
- Cardinali, D. P. y D. A. Golombek (1998). "The rhythmic GABAergic system." Neurochem Res **23**(5): 607-14.
- Carpentier, P. A., W. S. Begolka, J. K. Olson, A. Elhofy, W. J. Karpus y S. D. Miller (2005). "Differential activation of astrocytes by innate and adaptive immune stimuli." Glia **49**(3): 360-74.
- Carswell, E. A., L. J. Old, R. L. Kassel, S. Green, N. Fiore y B. Williamson (1975). "An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(9): 3666-70.
- Cartier, L., O. Hartley, M. Dubois-Dauphin y K. H. Krause (2005). "Chemokine receptors in the central nervous system: role in brain inflammation and neurodegenerative diseases." Brain Res Brain Res Rev **48**(1): 16-42.

- Castel, M., M. Belenky, S. Cohen, O. P. Ottersen y J. Storm-Mathisen (1993). "Glutamate-like immunoreactivity in retinal terminals of the mouse suprachiasmatic nucleus." Eur J Neurosci **5**(4): 368-81.
- Castel, M., M. Belenky, S. Cohen, S. Wagner y W. J. Schwartz (1997). "Light-induced c-Fos expression in the mouse suprachiasmatic nucleus: immunoelectron microscopy reveals co-localization in multiple cell types." Eur J Neurosci **9**(9): 1950-60.
- Cermakian, N., L. Monaco, M. P. Pando, A. Dierich y P. Sassone-Corsi (2001). "Altered behavioral rhythms and clock gene expression in mice with a targeted mutation in the *Period1* gene." Embo J **20**(15): 3967-74.
- Chen, G., P. Cao y D. V. Goeddel (2002). "TNF-induced recruitment and activation of the IKK complex require *Cdc37* and *Hsp90*." Mol Cell **9**(2): 401-10.
- Chen, G. y D. V. Goeddel (2002). "TNF-R1 signaling: a beautiful pathway." Science **296**(5573): 1634-5.
- Chen, Z., J. Gardi, T. Kushikata, J. Fang y J. M. Krueger (1999). "Nuclear factor-kappaB-like activity increases in murine cerebral cortex after sleep deprivation." Am J Physiol **276**(6 Pt 2): R1812-8.
- Chuang, J. I., N. Mohan, M. L. Meltz y R. J. Reiter (1996). "Effect of melatonin on NF-kappa-B DNA-binding activity in the rat spleen." Cell Biol Int **20**(10): 687-92.
- Cincotta, A. H., T. L. Knisely, R. J. Landry, W. R. Miers, P. J. Gutierrez, P. Esperanza y A. H. Meier (1995). "The immunoregulatory effects of prolactin in mice are time of day dependent." Endocrinology **136**(5): 2163-71.
- Colwell, C. S. y R. G. Foster (1992). "Photic regulation of Fos-like immunoreactivity in the suprachiasmatic nucleus of the mouse." J Comp Neurol **324**(2): 135-42.
- Conti, A. y G. J. Maestroni (1998). "Melatonin rhythms in mice: role in autoimmune and lymphoproliferative diseases." Ann N Y Acad Sci **840**: 395-410.

- Conti, B., I. Tabarean, C. Andrei y T. Bartfai (2004). "Cytokines and fever." Front Biosci **9**: 1433-49.
- Crofford, L. J., K. T. Kalogeras, G. Mastorakos, M. A. Magiakou, J. Wells, K. S. Kanik, P. W. Gold, G. P. Chrousos y R. L. Wilder (1997). "Circadian relationships between interleukin (IL)-6 and hypothalamic-pituitary-adrenal axis hormones: failure of IL-6 to cause sustained hypercortisolism in patients with early untreated rheumatoid arthritis." J Clin Endocrinol Metab **82**(4): 1279-83.
- Cronstein, B. N., M. C. Montesinos y G. Weissmann (1999). "Salicylates and sulfasalazine, but not glucocorticoids, inhibit leukocyte accumulation by an adenosine-dependent mechanism that is independent of inhibition of prostaglandin synthesis and p105 of NFkappaB." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(11): 6377-81.
- Dantzer, R. (2001). "Cytokine-induced sickness behavior: mechanisms and implications." Ann N Y Acad Sci **933**: 222-34.
- Dantzer, R., A. Aubert, R. M. Bluthé, G. Gheusi, S. Cremona, S. Laye, J. P. Konsman, P. Parnet y K. W. Kelley (1999). "Mechanisms of the behavioural effects of cytokines." Adv Exp Med Biol **461**: 83-105.
- Dantzer, R., R. M. Bluthé, G. Gheusi, S. Cremona, S. Laye, P. Parnet y K. W. Kelley (1998). "Molecular basis of sickness behavior." Ann N Y Acad Sci **856**: 132-8.
- Darlington, T. K., L. C. Lyons, P. E. Hardin y S. A. Kay (2000). "The period E-box is sufficient to drive circadian oscillation of transcription in vivo." J Biol Rhythms **15**(6): 462-71.
- Davis, M., A. Hatzubai, J. S. Andersen, E. Ben-Shushan, G. Z. Fisher, A. Yaron, A. Bauskin, F. Mercurio, M. Mann y Y. Ben-Neriah (2002). "Pseudosubstrate regulation of the SCF(beta-TrCP) ubiquitin ligase by hnRNP-U." Genes Dev **16**(4): 439-51.

- de la Iglesia, H. O., J. D. Blaustein y E. L. Bittman (1995). "The suprachiasmatic area in the female hamster projects to neurons containing estrogen receptors and GnRH." Neuroreport **6**(13): 1715-22.
- de la Iglesia, H. O., J. Meyer y W. J. Schwartz (2003). "Lateralization of circadian pacemaker output: Activation of left- and right-sided luteinizing hormone-releasing hormone neurons involves a neural rather than a humoral pathway." J Neurosci **23**(19): 7412-4.
- DeCoursey, P. J. y J. R. Krulas (1998). "Behavior of SCN-lesioned chipmunks in natural habitat: a pilot study." J Biol Rhythms **13**(3): 229-44.
- DeCoursey, P. J., J. R. Krulas, G. Mele y D. C. Holley (1997). "Circadian performance of suprachiasmatic nuclei (SCN)-lesioned antelope ground squirrels in a desert enclosure." Physiol Behav **62**(5): 1099-108.
- DeCoursey, P. J., J. K. Walker y S. A. Smith (2000). "A circadian pacemaker in free-living chipmunks: essential for survival?" J Comp Physiol [A] **186**(2): 169-80.
- Depres-Brummer, P., P. Bourin, N. Pages, G. Metzger y F. Levi (1997). "Persistent T lymphocyte rhythms despite suppressed circadian clock outputs in rats." Am J Physiol **273**(6 Pt 2): R1891-9.
- Dogan, M. D., H. Ataoglu y E. S. Akarsu (2000). "Effects of different serotypes of Escherichia coli lipopolysaccharides on body temperature in rats." Life Sci **67**(19): 2319-29.
- Dogan, M. D., H. Ataoglu y E. S. Akarsu (2002). "Characterization of the hypothermic component of LPS-induced dual thermoregulatory response in rats." Pharmacol Biochem Behav **72**(1-2): 143-50.
- Dong, Y. y E. N. Benveniste (2001). "Immune function of astrocytes." Glia **36**(2): 180-90.

- Drucker-Colin, R., R. Aguilar-Roblero, F. Garcia-Hernandez, F. Fernandez-Cancino y F. Bermudez Rattoni (1984). "Fetal suprachiasmatic nucleus transplants: diurnal rhythm recovery of lesioned rats." Brain Res **311**(2): 353-7.
- Duan, S., C. M. Anderson, E. C. Keung, Y. Chen y R. A. Swanson (2003). "P2X7 receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes." J Neurosci **23**(4): 1320-8.
- Dunlap, J. C. (1999). "Molecular bases for circadian clocks." Cell **96**(2): 271-90.
- Dyatlov, V. A., O. M. Dyatlova, P. J. Parsons, D. A. Lawrence y D. O. Carpenter (1998). "Lipopolysaccharide and interleukin-6 enhance lead entry into cerebellar neurons: application of a new and sensitive flow cytometric technique to measure intracellular lead and calcium concentrations." Neurotoxicology **19**(2): 293-302.
- Ebihara, S., T. Marks, D. J. Hudson y M. Menaker (1986). "Genetic control of melatonin synthesis in the pineal gland of the mouse." Science **231**(4737): 491-3.
- Ebihara, S., S. Miyazaki, H. Sakamaki y T. Yoshimura (2003). "Sleep properties of CS mice with spontaneous rhythm splitting in constant darkness." Brain Res **980**(1): 121-7.
- Ebihara, S., K. Tsuji y K. Kondo (1978). "Strain differences of the mouse's free-running circadian rhythm in continuous darkness." Physiol Behav **20**(6): 795-9.
- Ebling, F. J., E. S. Maywood, M. Mehta, D. C. Hancock, S. McNulty, J. De Bono, S. J. Bray y M. H. Hastings (1996). "FosB in the suprachiasmatic nucleus of the Syrian and Siberian hamster." Brain Res Bull **41**(5): 257-68.
- Entzian, P., K. Linnemann, M. Schlaak y P. Zabel (1996). "Obstructive sleep apnea syndrome and circadian rhythms of hormones and cytokines." Am J Respir Crit Care Med **153**(3): 1080-6.

- Fang, J., C. K. Sanborn, K. B. Renegar, J. A. Majde y J. M. Krueger (1995). "Influenza viral infections enhance sleep in mice." Proc Soc Exp Biol Med **210**(3): 242-52.
- Fernandez Alfonso, T., A. M. Celentano, S. M. Gonzalez Cappa y D. A. Golombek (2003). "The circadian system of Trypanosoma cruzi-infected mice." Chronobiol Int **20**(1): 49-64.
- Fernandez-Galaz, C., R. G. Dyer y A. E. Herbison (1994). "Analysis of brainstem A1 and A2 noradrenergic inputs to the preoptic area using microdialysis in the rat." Brain Res **636**(2): 227-32.
- Fernandez-Galaz, M. C., R. Martinez Munoz, M. A. Villanua y L. M. Garcia-Segura (1999). "Diurnal oscillation in glial fibrillary acidic protein in a perisuprachiasmatic area and its relationship to the luteinizing hormone surge in the female rat." Neuroendocrinology **70**(5): 368-76.
- Fields, R. D. y B. Stevens-Graham (2002). "New insights into neuron-glia communication." Science **298**(5593): 556-62.
- Filipski, E., V. M. King, M. C. Etienne, X. Li, B. Claustrat, T. G. Granda, G. Milano, M. H. Hastings y F. Levi (2004). "Persistent twenty-four hour changes in liver and bone marrow despite suprachiasmatic nuclei ablation in mice." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **287**(4): R844-51.
- Fontana, A., F. Kristensen, R. Dubs, D. Gemsa y E. Weber (1982). "Production of prostaglandin E and an interleukin-1 like factor by cultured astrocytes and C6 glioma cells." J Immunol **129**(6): 2413-9.
- Fraser, J. T. (1987). Time, the familiar stranger. Amherst, University of Massachusetts Press.
- Gahtan, E. y J. B. Overmier (2001). "Performance more than working memory disrupted by acute systemic inflammation in rats in appetitive tasks." Physiol Behav **73**(1-2): 201-10.

- Gekakis, N., D. Staknis, H. B. Nguyen, F. C. Davis, L. D. Wilsbacher, D. P. King, J. S. Takahashi y C. J. Weitz (1998). "Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism." Science **280**(5369): 1564-9.
- Gervais, P., A. Reinberg, C. Gervais, M. Smolensky y O. DeFrance (1977). "Twenty-four-hour rhythm in the bronchial hyperreactivity to house dust in asthmatics." J Allergy Clin Immunol **59**(3): 207-13.
- Ghosh, S., M. J. May y E. B. Kopp (1998). "NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses." Annu Rev Immunol **16**: 225-60.
- Givalois, L., H. Becq, P. Siaud, G. Ixart, I. Assenmacher y G. Barbanel (1999). "Serotonergic and suprachiasmatic nucleus involvement in the corticotropic response to systemic endotoxin challenge in rats." J Neuroendocrinol **11**(8): 629-36.
- Golombek, D. A., M. Katz y M. R. Ralph (1998). Calcineurin modulates circadian rhythms and circadian responses to light. Biological clocks - Mechanisms and applications. Y. Touitou. Amsterdam, Elsevier Science B. V.: 221-224.
- Goslin, K. y G. Banker (1991). Rat hippocampal neurons in Low-Density Culture. Culturing Nerve Cells. K. Goslin. London, MIT Press: 251-281.
- Goto, M., I. Oshima, T. Tomita y S. Ebihara (1989). "Melatonin content of the pineal gland in different mouse strains." J Pineal Res **7**(2): 195-204.
- Goujon, E., P. Parnet, S. Laye, C. Combe y R. Dantzer (1996). "Adrenalectomy enhances pro-inflammatory cytokines gene expression, in the spleen, pituitary and brain of mice in response to lipopolysaccharide." Brain Res Mol Brain Res **36**(1): 53-62.
- Graham, J. C., G. E. Hoffman y A. F. Sved (1995). "c-Fos expression in brain in response to hypotension and hypertension in conscious rats." J Auton Nerv Syst **55**(1-2): 92-104.

- Granados-Fuentes, D., L. M. Prolo, U. Abraham y E. D. Herzog (2004a). "The suprachiasmatic nucleus entrains, but does not sustain, circadian rhythmicity in the olfactory bulb." J Neurosci **24**(3): 615-9.
- Granados-Fuentes, D., M. T. Saxena, L. M. Prolo, S. J. Aton y E. D. Herzog (2004b). "Olfactory bulb neurons express functional, entrainable circadian rhythms." Eur J Neurosci **19**(4): 898-906.
- Griffin, A. C. y C. C. Whitacre (1991). "Sex and strain differences in the circadian rhythm fluctuation of endocrine and immune function in the rat: implications for rodent models of autoimmune disease." J Neuroimmunol **35**(1-3): 53-64.
- Guido, M. E., L. B. de Guido, D. Goguen, H. A. Robertson y B. Rusak (1999a). "Daily rhythm of spontaneous immediate-early gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus." J Biol Rhythms **14**(4): 275-80.
- Guido, M. E. y H. O. de la Iglesia (2002). Bases moleculares de la cronobiología. Cronobiología humana: ritmos y relojes biológicos en la salud y en la enfermedad. D. A. Golombek. Bernal, Universidad Nacional de Quilmes ediciones.: 43-66.
- Guido, M. E., D. Goguen, L. De Guido, H. A. Robertson y B. Rusak (1999b). "Circadian and photic regulation of immediate-early gene expression in the hamster suprachiasmatic nucleus." Neuroscience **90**(2): 555-71.
- Guido, M. E., D. Goguen, H. A. Robertson y B. Rusak (1996a). "Spontaneous and light-evoked expression of JunB-like protein in the hamster suprachiasmatic nucleus near subjective dawn." Neurosci Lett **217**(1): 9-12.
- Guido, M. E., B. Rusak y H. A. Robertson (1996b). "Expression of fosB mRNA in the hamster suprachiasmatic nucleus is induced at only selected circadian phases." Brain Res **739**(1-2): 132-8.
- Guido, M. E., B. Rusak y H. A. Robertson (1996c). "Spontaneous circadian and light-induced expression of junB mRNA in the hamster suprachiasmatic nucleus." Brain Res **732**(1-2): 215-22.

- Guldner, F. H. (1983). "Numbers of neurons and astroglial cells in the suprachiasmatic nucleus of male and female rats." Exp Brain Res **50**(2-3): 373-6.
- Hailman, E., J. J. Albers, G. Wolfbauer, A. Y. Tu y S. D. Wright (1996). "Neutralization and transfer of lipopolysaccharide by phospholipid transfer protein." J Biol Chem **271**(21): 12172-8.
- Halberg, F., E. Johnson, W. Brown y J. J. Bittner (1960). "Susceptibility rhythm to E. coli endotoxin and bioassay." Proc Soc Exp Biol Med **188**: 414-419.
- Hannibal, J., F. Jørgensen, H. S. Nielsen, L. Journot, P. Brabet y J. Fahrenkrug (2001). "Dissociation between light-induced phase shift of the circadian rhythm and clock gene expression in mice lacking the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide type 1 receptor." J Neurosci **21**(13): 4883-90.
- Hao, H., D. L. Allen y P. E. Hardin (1997). "A circadian enhancer mediates PER-dependent mRNA cycling in *Drosophila melanogaster*." Mol Cell Biol **17**(7): 3687-93.
- Harkness, J. A., M. B. Richter, G. S. Panayi, K. Van de Pette, A. Unger, R. Pownall y M. Geddawi (1982). "Circadian variation in disease activity in rheumatoid arthritis." Br Med J (Clin Res Ed) **284**(6315): 551-4.
- Harley, C. W., R. C. Farrell y B. Rusak (2001). "Daily variation in the distribution of glycogen phosphorylase in the suprachiasmatic nucleus of Syrian hamsters." J Comp Neurol **435**(2): 249-58.
- Hart, B. L. (1988). "Biological basis of the behavior of sick animals." Neurosci Biobehav Rev **12**(2): 123-37.
- Hattar, S., H. W. Liao, M. Takao, D. M. Berson y K. W. Yau (2002). "Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity." Science **295**(5557): 1065-70.

- Haus, E., D. J. Lakatua y L. Sackett-Lundeen (1997). "Circannual variation of cell proliferation in lymphoid organs and bone marrow of BDF1 male mice on three lighting regimens." Chronobiol Int **14**(4): 347-62.
- Haus-Wegrzyniak, B., P. Dobrzanski, J. D. Stoehr y G. L. Wenk (1998). "Chronic neuroinflammation in rats reproduces components of the neurobiology of Alzheimer's disease." Brain Res **780**(2): 294-303.
- Hayashi, N., S. Yasuo, S. Ebihara y T. Yoshimura (2003). "Expression of IKKalpha mRNA in the suprachiasmatic nucleus and circadian rhythms of mice lacking IKKalpha." Brain Res **993**(1-2): 217-21.
- Healy, D. L., G. D. Hodgen, H. M. Schulte, G. P. Chrousos, D. L. Loriaux, N. R. Hall y A. L. Goldstein (1983). "The thymus-adrenal connection: thymosin has corticotropin-releasing activity in primates." Science **222**(4630): 1353-5.
- Herzog, E. D., J. S. Takahashi y G. D. Block (1998). "Clock controls circadian period in isolated suprachiasmatic nucleus neurons." Nat Neurosci **1**(8): 708-13.
- Hogan, D., J. D. Morrow, E. M. Smith y M. R. Opp (2003). "Interleukin-6 alters sleep of rats." J Neuroimmunol **137**(1-2): 59-66.
- Hogenesch, J. B., Y. Z. Gu, S. Jain y C. A. Bradfield (1998). "The basic-helix-loop-helix-PAS orphan MOP3 forms transcriptionally active complexes with circadian and hypoxia factors." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(10): 5474-9.
- Holzheimer, R. G., P. Curley, I. B. Saporoschetz, J. M. Doherty, J. A. Mannick y M. L. Rodrick (2002). "Circadian rhythm of cytokine secretion following thermal injury in mice: implications for burn and trauma research." Shock **17**(6): 527-9.
- Honma, S., M. Ikeda, H. Abe, Y. Tanahashi, M. Namihira, K. Honma y M. Nomura (1998). "Circadian oscillation of BMAL1, a partner of a mammalian clock gene Clock, in rat suprachiasmatic nucleus." Biochem Biophys Res Commun **250**(1): 83-7.

- Hrushesky, W. J., T. Langevin, Y. J. Kim y P. A. Wood (1994). "Circadian dynamics of tumor necrosis factor alpha (cachectin) lethality." J Exp Med **180**(3): 1059-65.
- Inouye, S. T. y H. Kawamura (1979). "Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic "island" containing the suprachiasmatic nucleus." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(11): 5962-6.
- Inouye, S. T. y S. Shibata (1994). "Neurochemical organization of circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus." Neurosci Res **20**(2): 109-30.
- Janik, D. y N. Mrosovsky (1992). "Gene expression in the geniculate induced by a nonphotic circadian phase shifting stimulus." Neuroreport **3**(7): 575-8.
- Jin, X., L. P. Shearman, D. R. Weaver, M. J. Zylka, G. J. de Vries y S. M. Reppert (1999). "A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock." Cell **96**(1): 57-68.
- John, G. R., S. C. Lee y C. F. Brosnan (2003). "Cytokines: powerful regulators of glial cell activation." Neuroscientist **9**(1): 10-22.
- John, G. R., S. C. Lee, X. Song, M. Rivieccio y C. F. Brosnan (2005). "IL-1-regulated responses in astrocytes: relevance to injury and recovery." Glia **49**(2): 161-76.
- Kakizaki, Y., H. Watanobe, A. Kohsaka y T. Suda (1999). "Temporal profiles of interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in the plasma and hypothalamic paraventricular nucleus after intravenous or intraperitoneal administration of lipopolysaccharide in the rat: estimation by push-pull perfusion." Endocr J **46**(4): 487-96.
- Kako, K. y N. Ishida (1998). "The role of transcription factors in circadian gene expression." Neurosci Res **31**(4): 257-64.
- Kapas, L., M. K. Hansen, H. Y. Chang y J. M. Krueger (1998). "Vagotomy attenuates but does not prevent the somnogenic and febrile effects of lipopolysaccharide in rats." Am J Physiol **274**(2 Pt 2): R406-11.

- Karin, M. y Y. Ben-Neriah (2000). "Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity." Annu Rev Immunol **18**: 621-63.
- Karin, M., Y. Yamamoto y Q. M. Wang (2004). "The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development." Nat Rev Drug Discov **3**(1): 17-26.
- Kassed, C. A. y M. Herkenham (2004). "NF-kappaB p50-deficient mice show reduced anxiety-like behaviors in tests of exploratory drive and anxiety." Behav Brain Res **154**(2): 577-84.
- Katsuki, H., S. Nakai, Y. Hirai, K. Akaji, Y. Kiso y M. Satoh (1990). "Interleukin-1 beta inhibits long-term potentiation in the CA3 region of mouse hippocampal slices." Eur J Pharmacol **181**(3): 323-6.
- Kawate, T., T. Abo, S. Hinuma y K. Kumagai (1981). "Studies of the bioperiodicity of the immune response. II. Co-variations of murine T and B cells and a role of corticosteroid." J Immunol **126**(4): 1364-7.
- Kettenmann, H. y B. R. Ransom (2005). Neuroglia. New York, Oxford University Press.
- King, D. P., M. H. Vitaterna, A. M. Chang, W. F. Dove, L. H. Pinto, F. W. Turek y J. S. Takahashi (1997a). "The mouse Clock mutation behaves as an antimorph and maps within the W19H deletion, distal of Kit." Genetics **146**(3): 1049-60.
- King, D. P., Y. Zhao, A. M. Sangoram, L. D. Wilsbacher, M. Tanaka, M. P. Antoch, T. D. Steeves, M. H. Vitaterna, J. M. Kornhauser, P. L. Lowrey, F. W. Turek y J. S. Takahashi (1997b). "Positional cloning of the mouse circadian clock gene." Cell **89**(4): 641-53.
- Kluger, M. J. (1991). "Fever: role of pyrogens and cryogens." Physiol Rev **71**(1): 93-127.

- Koike, N., A. Hida, R. Numano, M. Hirose, Y. Sakaki y H. Tei (1998). "Identification of the mammalian homologues of the *Drosophila* timeless gene, Timeless1." FEBS Lett **441**(3): 427-31.
- Kondo, T. y M. Ishiura (2000). "The circadian clock of cyanobacteria." Bioessays **22**(1): 10-5.
- Kondo, T. y M. Raff (2000). "Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells." Science **289**(5485): 1754-7.
- Kondo, T., N. F. Tsinoremas, S. S. Golden, C. H. Johnson, S. Kutsuna y M. Ishiura (1994). "Circadian clock mutants of cyanobacteria." Science **266**(5188): 1233-6.
- Konopka, R. J. y S. Benzer (1971). "Clock mutants of *Drosophila melanogaster*." Proc Natl Acad Sci U S A **68**(9): 2112-6.
- Konsman, J. P., S. Vignes, L. Mackerlova, A. Bristow y A. Blomqvist (2004). "Rat brain vascular distribution of interleukin-1 type-1 receptor immunoreactivity: relationship to patterns of inducible cyclooxygenase expression by peripheral inflammatory stimuli." J Comp Neurol **472**(1): 113-29.
- Kornhauser, J. M., D. E. Nelson, K. E. Mayo y J. S. Takahashi (1990). "Photic and circadian regulation of c-fos gene expression in the hamster suprachiasmatic nucleus." Neuron **5**(2): 127-34.
- Koyanagi, S. y S. Ohdo (2002). "Alteration of intrinsic biological rhythms during interferon treatment and its possible mechanism." Mol Pharmacol **62**(6): 1393-9.
- Kozak, W., H. Zheng, C. A. Conn, D. Soszynski, L. H. van der Ploeg y M. J. Kluger (1995). "Thermal and behavioral effects of lipopolysaccharide and influenza in interleukin-1 beta-deficient mice." Am J Physiol **269**(5 Pt 2): R969-77.
- Kraft, M., R. Djukanovic, S. Wilson, S. T. Holgate y R. J. Martin (1996). "Alveolar tissue inflammation in asthma." Am J Respir Crit Care Med **154**(5): 1505-10.

- Kramer, A., F. C. Yang, P. Snodgrass, X. Li, T. E. Scammell, F. C. Davis y C. J. Weitz (2001). "Regulation of daily locomotor activity and sleep by hypothalamic EGF receptor signaling." Science **294**(5551): 2511-5.
- Kronfol, Z. y D. G. Remick (2000). "Cytokines and the brain: implications for clinical psychiatry." Am J Psychiatry **157**(5): 683-94.
- Krout, K. E., J. Kawano, T. C. Mettenleiter y A. D. Loewy (2002). "CNS inputs to the suprachiasmatic nucleus of the rat." Neuroscience **110**(1): 73-92.
- Krueger, J. M., J. Fang, P. Taishi, Z. Chen, T. Kushikata y J. Gardi (1998). "Sleep. A physiologic role for IL-1 beta and TNF-alpha." Ann N Y Acad Sci **856**: 148-59.
- Krueger, J. M., S. Kubillus, S. Shoham y D. Davenne (1986). "Enhancement of slow-wave sleep by endotoxin and lipid A." Am J Physiol **251**(3 Pt 2): R591-7.
- Krueger, J. M., J. A. Majde y F. Obal (2003). "Sleep in host defense." Brain Behav Immun **17 Suppl 1**: S41-7.
- Krueger, J. M., F. J. Obal, J. Fang, T. Kubota y P. Taishi (2001). "The role of cytokines in physiological sleep regulation." Ann N Y Acad Sci **933**: 211-21.
- Kume, K., M. J. Zylka, S. Sriram, L. P. Shearman, D. R. Weaver, X. Jin, E. S. Maywood, M. H. Hastings y S. M. Reppert (1999). "mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop." Cell **98**(2): 193-205.
- Lacroix, S. y S. Rivest (1997). "Functional circuitry in the brain of immune-challenged rats: partial involvement of prostaglandins." J Comp Neurol **387**(2): 307-24.
- Lancel, M., J. Cronlein, P. Muller-Preuss y F. Holsboer (1995). "Lipopolysaccharide increases EEG delta activity within non-REM sleep and disrupts sleep continuity in rats." Am J Physiol **268**(5 Pt 2): R1310-8.

- Lancel, M., S. Mathias, J. Faulhaber y T. Schiffelholz (1996). "Effect of interleukin-1 beta on EEG power density during sleep depends on circadian phase." Am J Physiol **270**(4 Pt 2): R830-7.
- Langlois, P. H., M. H. Smolensky, W. P. Glezen y W. A. Keitel (1995). "Diurnal variation in responses to influenza vaccine." Chronobiol Int **12**(1): 28-36.
- Lavialle, M., A. Begue, C. Papillon y J. Vilaplana (2001). "Modifications of retinal afferent activity induce changes in astroglial plasticity in the hamster circadian clock." Glia **34**(2): 88-100.
- Lavialle, M. y J. Serviere (1993). "Circadian fluctuations in GFAP distribution in the Syrian hamster suprachiasmatic nucleus." Neuroreport **4**(11): 1243-6.
- Lavialle, M. y J. Serviere (1995). "Developmental study in the circadian clock of the golden hamster: a putative role of astrocytes." Brain Res Dev Brain Res **86**(1-2): 275-82.
- Lee, H. S., J. L. Nelms, M. Nguyen, R. Silver y M. N. Lehman (2003). "The eye is necessary for a circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus." Nat Neurosci **6**(2): 111-2.
- Lehman, M. N., R. Silver, W. R. Gladstone, R. M. Kahn, M. Gibson y E. L. Bittman (1987). "Circadian rhythmicity restored by neural transplant. Immunocytochemical characterization of the graft and its integration with the host brain." J Neurosci **7**(6): 1626-38.
- Levi, F. A., C. Canon, Y. Touitou, J. Sulon, M. Mechkouri, E. D. Ponsart, J. P. Touboul, J. M. Vannetzel, I. Mowzowicz, A. Reinberg y et al. (1988). "Circadian rhythms in circulating T lymphocyte subtypes and plasma testosterone, total and free cortisol in five healthy men." Clin Exp Immunol **71**(2): 329-35.
- Li, X., N. Sankrithi y F. C. Davis (2002). "Transforming growth factor-alpha is expressed in astrocytes of the suprachiasmatic nucleus in hamster: role of glial cells in circadian clocks." Neuroreport **13**(16): 2143-7.

- Liang, F. Q., G. Allen y D. Earnest (2000). "Role of brain-derived neurotrophic factor in the circadian regulation of the suprachiasmatic pacemaker by light." J Neurosci **20**(8): 2978-87.
- Lin, H. L. y S. Murphy (1997). "Regulation of astrocyte nitric oxide synthase type II expression by ATP and glutamate involves loss of transcription factor binding to DNA." J Neurochem **69**(2): 612-6.
- Linthorst, A. C., C. Flachskamm, F. Holsboer y J. M. Reul (1995). "Intraperitoneal administration of bacterial endotoxin enhances noradrenergic neurotransmission in the rat preoptic area: relationship with body temperature and hypothalamic--pituitary--adrenocortical axis activity." Eur J Neurosci **7**(12): 2418-30.
- Linthorst, A. C. y J. M. Reul (1998). "Brain neurotransmission during peripheral inflammation." Ann N Y Acad Sci **840**: 139-52.
- Liu, C., D. R. Weaver, S. H. Strogatz y S. M. Reppert (1997). "Cellular construction of a circadian clock: period determination in the suprachiasmatic nuclei." Cell **91**(6): 855-60.
- Liu, J. S., G. R. John, A. Sikora, S. C. Lee y C. F. Brosnan (2000). "Modulation of interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha signaling by P2 purinergic receptors in human fetal astrocytes." J Neurosci **20**(14): 5292-9.
- Long, N. C., I. Otterness, S. L. Kunkel, A. J. Vander y M. J. Kluger (1990). "Roles of interleukin 1 beta and tumor necrosis factor in lipopolysaccharide fever in rats." Am J Physiol **259**(4 Pt 2): R724-8.
- Lowrey, P. L., K. Shimomura, M. P. Antoch, S. Yamazaki, P. D. Zemenides, M. R. Ralph, M. Menaker y J. S. Takahashi (2000). "Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau." Science **288**(5465): 483-92.

- Lundkvist, G. B., A. Andersson, B. Robertson, M. E. Rottenberg y K. Kristensson (1999). "Light-dependent regulation and postnatal development of the interferon-gamma receptor in the rat suprachiasmatic nuclei." Brain Res **849**(1-2): 231-4.
- Lundkvist, G. B., R. H. Hill y K. Kristensson (2002). "Disruption of circadian rhythms in synaptic activity of the suprachiasmatic nuclei by African trypanosomes and cytokines." Neurobiol Dis **11**(1): 20-7.
- Lundkvist, G. B., B. Robertson, J. D. Mhlanga, M. E. Rottenberg y K. Kristensson (1998). "Expression of an oscillating interferon-gamma receptor in the suprachiasmatic nuclei." Neuroreport **9**(6): 1059-63.
- Lustig, S., H. D. Danenberg, Y. Kafri, D. Kobiler y D. Ben-Nathan (1992). "Viral neuroinvasion and encephalitis induced by lipopolysaccharide and its mediators." J Exp Med **176**(3): 707-12.
- Mackay, T. W., W. A. Wallace, S. E. Howie, P. H. Brown, A. P. Greening, M. K. Church y N. J. Douglas (1994). "Role of inflammation in nocturnal asthma." Thorax **49**(3): 257-62.
- Magarinos, A. M., F. Estivariz, M. I. Morado y A. F. De Nicola (1988). "Regulation of the central nervous system-pituitary-adrenal axis in rats after neonatal treatment with monosodium glutamate." Neuroendocrinology **48**(2): 105-11.
- Maier, S. F., L. E. Goehler, M. Fleshner y L. R. Watkins (1998). "The role of the vagus nerve in cytokine-to-brain communication." Ann N Y Acad Sci **840**: 289-300.
- Malek, S., Y. Chen, T. Huxford y G. Ghosh (2001). "IkappaBbeta, but not IkappaBalpha, functions as a classical cytoplasmic inhibitor of NF-kappaB dimers by masking both NF-kappaB nuclear localization sequences in resting cells." J Biol Chem **276**(48): 45225-35.
- Marpegan, L., T. A. Bekinschtein, R. Freudenthal, M. F. Rubio, G. A. Ferreyra, A. Romano y D. A. Golombek (2004). "Participation of transcription factors from the

- Rel/NF-kappa B family in the circadian system in hamsters." Neurosci Lett **358**(1): 9-12.
- Matsunaga, W., S. Miyata, A. Takamata, H. Bun, T. Nakashima y T. Kiyohara (2000). "LPS-induced Fos expression in oxytocin and vasopressin neurons of the rat hypothalamus." Brain Res **858**(1): 9-18.
- Maywood, E. S., N. Mrosovsky, M. D. Field y M. H. Hastings (1999). "Rapid down-regulation of mammalian period genes during behavioral resetting of the circadian clock." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(26): 15211-6.
- McArthur, A. J., A. N. Coogan, S. Ajpru, D. Sugden, S. M. Biello y H. D. Piggins (2000). "Gastrin-releasing peptide phase-shifts suprachiasmatic nuclei neuronal rhythms in vitro." J Neurosci **20**(14): 5496-502.
- McCann, S. M., M. Kimura, S. Karanth, W. H. Yu y V. Rettori (1998). "Role of nitric oxide in the neuroendocrine responses to cytokines." Ann N Y Acad Sci **840**: 174-84.
- McCann, S. M., M. Kimura, S. Karanth, W. H. Yu y V. Rettori (2002). "Role of nitric oxide in the neuroendocrine response to cytokines." Front Horm Res **29**: 117-29.
- Mead, S., F. J. Ebling, E. S. Maywood, T. Humby, J. Herbert y M. H. Hastings (1992). "A nonphotic stimulus causes instantaneous phase advances of the light-entrainable circadian oscillator of the Syrian hamster but does not induce the expression of c-fos in the suprachiasmatic nuclei." J Neurosci **12**(7): 2516-22.
- Meffert, M. K., J. M. Chang, B. J. Wiltgen, M. S. Fanselow y D. Baltimore (2003). "NF-kappa B functions in synaptic signaling and behavior." Nat Neurosci **6**(10): 1072-8.
- Meijer, J. H. y W. J. Schwartz (2003). "In search of the pathways for light-induced pacemaker resetting in the suprachiasmatic nucleus." J Biol Rhythms **18**(3): 235-49.

- Mistlberger, R. E. (1994). "Circadian food-anticipatory activity: formal models and physiological mechanisms." Neurosci Biobehav Rev **18**(2): 171-95.
- Miyamoto, Y. y A. Sancar (1998). "Vitamin B2-based blue-light photoreceptors in the retinohypothalamic tract as the photoactive pigments for setting the circadian clock in mammals." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(11): 6097-102.
- Moga, M. M. y R. Y. Moore (1997). "Organization of neural inputs to the suprachiasmatic nucleus in the rat." J Comp Neurol **389**(3): 508-34.
- Moldofsky, H. (1995). "Sleep, neuroimmune and neuroendocrine functions in fibromyalgia and chronic fatigue syndrome." Adv Neuroimmunol **5**(1): 39-56.
- Moldofsky, H., F. A. Lue, J. R. Davidson y R. Gorczynski (1989). "Effects of sleep deprivation on human immune functions." Faseb J **3**(8): 1972-7.
- Moore, R. Y. y N. J. Lenn (1972). "A retinohypothalamic projection in the rat." J Comp Neurol **146**(1): 1-14.
- Moore, R. Y. y J. C. Speh (1993). "GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system." Neurosci Lett **150**(1): 112-6.
- Moore, R. Y., J. C. Speh y R. K. Leak (2002). "Suprachiasmatic nucleus organization." Cell Tissue Res **309**(1): 89-98.
- Morin, L. P., J. H. Blanchard y I. Provencio (2003). "Retinal ganglion cell projections to the hamster suprachiasmatic nucleus, intergeniculate leaflet, and visual midbrain: bifurcation and melanopsin immunoreactivity." J Comp Neurol **465**(3): 401-16.
- Morin, L. P., R. F. Johnson y R. Y. Moore (1989). "Two brain nuclei controlling circadian rhythms are identified by GFAP immunoreactivity in hamsters and rats." Neurosci Lett **99**(1-2): 55-60.

- Moriya, T., Y. Yoshinobu, Y. Kouzu, A. Katoh, H. Gomi, M. Ikeda, T. Yoshioka, S. Itohara y S. Shibata (2000). "Involvement of glial fibrillary acidic protein (GFAP) expressed in astroglial cells in circadian rhythm under constant lighting conditions in mice." J Neurosci Res **60**(2): 212-8.
- Mormont, M. C. y J. Waterhouse (2002). "Contribution of the rest-activity circadian rhythm to quality of life in cancer patients." Chronobiol Int **19**(1): 313-23.
- Morrow, J. D. y M. R. Opp (2005). "Diurnal variation of lipopolysaccharide-induced alterations in sleep and body temperature of interleukin-6-deficient mice." Brain Behav Immun **19**(1): 40-51.
- Mosialos, G. y T. D. Gilmore (1993). "v-Rel and c-Rel are differentially affected by mutations at a consensus protein kinase recognition sequence." Oncogene **8**(3): 721-30.
- Motzkus, D., U. Albrecht y E. Maronde (2002). "The human PER1 gene is inducible by interleukin-6." J Mol Neurosci **18**(1-2): 105-9.
- Munekawa, K., Y. Tamada, N. Iijima, S. Hayashi, A. Ishihara, K. Inoue, M. Tanaka y Y. Ibata (2000). "Development of astroglial elements in the suprachiasmatic nucleus of the rat: with special reference to the involvement of the optic nerve." Exp Neurol **166**(1): 44-51.
- Munoz, E., M. Brewer y R. Baler (2002). "Circadian Transcription. Thinking outside the E-Box." J Biol Chem **277**(39): 36009-17.
- Mustafa, M., A. Mustafa, F. Nyberg, H. Mangat, A. Elhassan, B. Winblad y A. Adem (1999). "Hypophysectomy enhances interleukin-1beta, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-10 mRNA expression in the rat brain." J Interferon Cytokine Res **19**(6): 583-7.
- Nadeau, S. y S. Rivest (1999). "Effects of circulating tumor necrosis factor on the neuronal activity and expression of the genes encoding the tumor necrosis factor

- receptors (p55 and p75) in the rat brain: a view from the blood-brain barrier." Neuroscience **93**(4): 1449-64.
- Nava, F., G. Carta y L. W. Haynes (2000). "Lipopolysaccharide increases arginine-vasopressin release from rat suprachiasmatic nucleus slice cultures." Neurosci Lett **288**(3): 228-30.
- Neumann, M., T. Grieshammer, S. Chuvpilo, B. Kneitz, M. Lohoff, A. Schimpl, B. R. Franza, Jr. y E. Serfling (1995). "RelA/p65 is a molecular target for the immunosuppressive action of protein kinase A." Embo J **14**(9): 1991-2004.
- Newman, G. C. (1991). SCN metabolic activity in vitro. Suprachiasmatic nucleus: The mind's clock. D. C. Klein, R. Y. Moore and S. M. Reppert. Oxford, Oxford University Press: 157-176.
- Nishizaki, T., K. Nagai, T. Nomura, H. Tada, T. Kanno, H. Tozaki, X. X. Li, T. Kondoh, N. Kodama, E. Takahashi, N. Sakai, K. Tanaka y N. Saito (2002). "A new neuromodulatory pathway with a glial contribution mediated via A(2a) adenosine receptors." Glia **39**(2): 133-47.
- Ohdo, S., S. Koyanagi, H. Suyama, S. Higuchi y H. Aramaki (2001). "Changing the dosing schedule minimizes the disruptive effects of interferon on clock function." Nat Med **7**(3): 356-60.
- Opp, M. R., F. Obal, Jr. y J. M. Krueger (1991). "Interleukin 1 alters rat sleep: temporal and dose-related effects." Am J Physiol **260**(1 Pt 2): R52-8.
- Opp, M. R. y L. A. Toth (1998). "Somnogenic and pyrogenic effects of interleukin-1beta and lipopolysaccharide in intact and vagotomized rats." Life Sci **62**(10): 923-36.
- Panda, S., J. B. Hogenesch y S. A. Kay (2002). "Circadian rhythms from flies to human." Nature **417**(6886): 329-35.

- Parpura, V., T. A. Basarsky, F. Liu, K. Jeftinija, S. Jeftinija y P. G. Haydon (1994). "Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling." Nature **369**(6483): 744-7.
- Persidsky, Y., M. Stins, D. Way, M. H. Witte, M. Weinand, K. S. Kim, P. Bock, H. E. Gendelman y M. Fiala (1997). "A model for monocyte migration through the blood-brain barrier during HIV-1 encephalitis." J Immunol **158**(7): 3499-510.
- Petrovsky, N. y L. C. Harrison (1997). "Diurnal rhythmicity of human cytokine production: a dynamic disequilibrium in T helper cell type 1/T helper cell type 2 balance?" J Immunol **158**(11): 5163-8.
- Pezeshki, G., T. Pohl y B. Schobitz (1996). "Corticosterone controls interleukin-1 beta expression and sickness behavior in the rat." J Neuroendocrinol **8**(2): 129-35.
- Pi, X. J. y D. R. Grattan (1998). "Differential expression of the two forms of prolactin receptor mRNA within microdissected hypothalamic nuclei of the rat." Brain Res Mol Brain Res **59**(1): 1-12.
- Piggins, H. D., M. C. Antle y B. Rusak (1995). "Neuropeptides phase shift the mammalian circadian pacemaker." J Neurosci **15**(8): 5612-22.
- Pittendrigh, C. S. y S. Daan (1976). "A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. IV Pacemaker as clock." Journal of comparative physiology **106**: 291-331.
- Possidente, B. y F. K. Stephan (1988). "Circadian period in mice: analysis of genetic and maternal contributions to inbred strain differences." Behav Genet **18**(1): 109-17.
- Preitner, N., F. Damiola, L. Lopez-Molina, J. Zakany, D. Duboule, U. Albrecht y U. Schibler (2002). "The orphan nuclear receptor REV-ERBalpha controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator." Cell **110**(2): 251-60.

- Prolo, L. M., J. S. Takahashi y E. D. Herzog (2005). "Circadian rhythm generation and entrainment in astrocytes." J Neurosci **25**(2): 404-8.
- Prosser, R. A., D. M. Edgar, H. C. Heller y J. D. Miller (1994). "A possible glial role in the mammalian circadian clock." Brain Res **643**(1-2): 296-301.
- Provencio, I., M. D. Rollag y A. M. Castrucci (2002). "Photoreceptive net in the mammalian retina. This mesh of cells may explain how some blind mice can still tell day from night." Nature **415**(6871): 493.
- Quan, N., L. He y W. Lai (2003). "Endothelial activation is an intermediate step for peripheral lipopolysaccharide induced activation of paraventricular nucleus." Brain Res Bull **59**(6): 447-52.
- Quan, N., M. Whiteside, L. Kim y M. Herkenham (1997). "Induction of inhibitory factor kappaBalpha mRNA in the central nervous system after peripheral lipopolysaccharide administration: an in situ hybridization histochemistry study in the rat." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(20): 10985-90.
- Ralph, M. R., R. G. Foster, F. C. Davis y M. Menaker (1990). "Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period." Science **247**(4945): 975-8.
- Ralph, M. R., M. W. Hurd, J. Takeuchi, L. Melo, A. Mathur y D. A. Golombek (1996). "Regulation and integration in the mammalian circadian system." Prog Brain Res **111**: 191-203.
- Rea, M. A. (1989). "Light increases Fos-related protein immunoreactivity in the rat suprachiasmatic nuclei." Brain Res Bull **23**(6): 577-81.
- Reppert, S. M. y D. R. Weaver (1997). "Forward genetic approach strikes gold: cloning of a mammalian clock gene." Cell **89**(4): 487-90.
- Richardson, G. S., M. C. Moore-Ede, C. A. Czeisler y W. C. Dement (1985). "Circadian rhythms of sleep and wakefulness in mice: analysis using long-term automated recording of sleep." Am J Physiol **248**(3 Pt 2): R320-30.

- Rivest, S., S. Lacroix, L. Vallieres, S. Nadeau, J. Zhang y N. Laflamme (2000). "How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular nucleus of the hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli." Proc Soc Exp Biol Med **223**(1): 22-38.
- Rodriguez, M. S., J. Thompson, R. T. Hay y C. Dargemont (1999). "Nuclear retention of IkappaBalpha protects it from signal-induced degradation and inhibits nuclear factor kappaB transcriptional activation." J Biol Chem **274**(13): 9108-15.
- Romanovskii, A. A. y V. A. Grigor'ev (1988). "[Changes in the bioelectrochemical activity of the neurosecretory hypothalamic nuclei in fever caused by endogenous pyrogen/interleukin-1]." Fiziol Zh SSSR Im I M Sechenova **74**(12): 1731-7.
- Romeo, H. E., D. L. Tio, S. U. Rahman, F. Chiappelli y A. N. Taylor (2001). "The glossopharyngeal nerve as a novel pathway in immune-to-brain communication: relevance to neuroimmune surveillance of the oral cavity." J Neuroimmunol **115**(1-2): 91-100.
- Ruby, N. F., D. E. Burns y H. C. Heller (1999). "Circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus are temperature-compensated and phase-shifted by heat pulses in vitro." J Neurosci **19**(19): 8630-6.
- Rusak, B., L. McNaughton, H. A. Robertson y S. P. Hunt (1992). "Circadian variation in photic regulation of immediate-early gene mRNAs in rat suprachiasmatic nucleus cells." Brain Res Mol Brain Res **14**(1-2): 124-30.
- Rusak, B., H. A. Robertson, W. Wisden y S. P. Hunt (1990). "Light pulses that shift rhythms induce gene expression in the suprachiasmatic nucleus." Science **248**(4960): 1237-40.
- Rusak, B. y I. Zucker (1979). "Neural regulation of circadian rhythms." Physiol Rev **59**(3): 449-526.

- Saito, H., E. R. Sherwood, T. K. Varma y B. M. Evers (2003). "Effects of aging on mortality, hypothermia, and cytokine induction in mice with endotoxemia or sepsis." Mech Ageing Dev **124**(10-12): 1047-58.
- Sangoram, A. M., L. Saez, M. P. Antoch, N. Gekakis, D. Staknis, A. Whiteley, E. M. Fruechte, M. H. Vitaterna, K. Shimomura, D. P. King, M. W. Young, C. J. Weitz y J. S. Takahashi (1998). "Mammalian circadian autoregulatory loop: a timeless ortholog and mPer1 interact and negatively regulate CLOCK-BMAL1-induced transcription." Neuron **21**(5): 1101-13.
- Sapolsky, R., C. Rivier, G. Yamamoto, P. Plotsky y W. Vale (1987). "Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin-releasing factor." Science **238**(4826): 522-4.
- Schiffelholz, T. y M. Lancel (2001). "Sleep changes induced by lipopolysaccharide in the rat are influenced by age." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **280**(2): R398-403.
- Schwartz, W. J., A. Carpino, Jr., H. O. de la Iglesia, R. Baler, D. C. Klein, Y. Nakabeppu y N. Aronin (2000). "Differential regulation of fos family genes in the ventrolateral and dorsomedial subdivisions of the rat suprachiasmatic nucleus." Neuroscience **98**(3): 535-47.
- Schwartz, W. J. y P. Zimmerman (1990). "Circadian timekeeping in BALB/c and C57BL/6 inbred mouse strains." J Neurosci **10**(11): 3685-94.
- Seri, B., J. M. Garcia-Verdugo, B. S. McEwen y A. Alvarez-Buylla (2001). "Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus." J Neurosci **21**(18): 7153-60.
- Shearman, L. P., X. Jin, C. Lee, S. M. Reppert y D. R. Weaver (2000a). "Targeted disruption of the mPer3 gene: subtle effects on circadian clock function." Mol Cell Biol **20**(17): 6269-75.

- Shearman, L. P., S. Sriram, D. R. Weaver, E. S. Maywood, I. Chaves, B. Zheng, K. Kume, C. C. Lee, G. T. van der Horst, M. H. Hastings y S. M. Reppert (2000b). "Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock." Science **288**(5468): 1013-9.
- Shearman, L. P., M. J. Zylka, D. R. Weaver, L. F. Kolakowski, Jr. y S. M. Reppert (1997). "Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei." Neuron **19**(6): 1261-9.
- Shigeyoshi, Y., K. Taguchi, S. Yamamoto, S. Takekida, L. Yan, H. Tei, T. Moriya, S. Shibata, J. J. Loros, J. C. Dunlap y H. Okamura (1997). "Light-induced resetting of a mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the mPer1 transcript." Cell **91**(7): 1043-53.
- Shinohara, K., T. Funabashi, D. Mitushima y F. Kimura (2000). "Effects of gap junction blocker on vasopressin and vasoactive intestinal polypeptide rhythms in the rat suprachiasmatic nucleus in vitro." Neurosci Res **38**(1): 43-7.
- Shinohara, K., S. Honma, Y. Katsuno, H. Abe y K. Honma (1995). "Two distinct oscillators in the rat suprachiasmatic nucleus in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(16): 7396-400.
- Shoham, S., D. Davenne, A. B. Cady, C. A. Dinarello y J. M. Krueger (1987). "Recombinant tumor necrosis factor and interleukin 1 enhance slow-wave sleep." Am J Physiol **253**(1 Pt 2): R142-9.
- Silver, R., J. LeSauter, P. A. Tresco y M. N. Lehman (1996). "A diffusible coupling signal from the transplanted suprachiasmatic nucleus controlling circadian locomotor rhythms." Nature **382**(6594): 810-3.
- Simons, C. T., V. A. Kulchitsky, N. Sugimoto, L. D. Homer, M. Szekely y A. A. Romanovsky (1998). "Signaling the brain in systemic inflammation: which vagal branch is involved in fever genesis?" Am J Physiol **275**(1 Pt 2): R63-8.

- Singh, A. K. y Y. Jiang (2004). "How does peripheral lipopolysaccharide induce gene expression in the brain of rats?" Toxicology **201**(1-3): 197-207.
- Stephan, F. K. (1984). "Phase shifts of circadian rhythms in activity entrained to food access." Physiol Behav **32**(4): 663-71.
- Stephan, F. K. (1992a). "Resetting of a circadian clock by food pulses." Physiol Behav **52**(5): 997-1008.
- Stephan, F. K. (1992b). "Resetting of a feeding-entrainable circadian clock in the rat." Physiol Behav **52**(5): 985-95.
- Stoll, G., S. Jander y M. Schroeter (2002). "Detrimental and beneficial effects of injury-induced inflammation and cytokine expression in the nervous system." Adv Exp Med Biol **513**: 87-113.
- Sumova, A., Z. Travnickova, J. D. Mikkelsen y H. Illnerova (1998). "Spontaneous rhythm in c-Fos immunoreactivity in the dorsomedial part of the rat suprachiasmatic nucleus." Brain Res **801**(1-2): 254-8.
- Sun, Z. S., U. Albrecht, O. Zhuchenko, J. Bailey, G. Eichele y C. C. Lee (1997). "RIGUI, a putative mammalian ortholog of the Drosophila period gene." Cell **90**(6): 1003-11.
- Suzuki, S., S. Toyabe, T. Moroda, T. Tada, A. Tsukahara, T. Iiai, M. Minagawa, S. Maruyama, K. Hatakeyama, K. Endoh y T. Abo (1997). "Circadian rhythm of leucocytes and lymphocytes subsets and its possible correlation with the function of the autonomic nervous system." Clin Exp Immunol **110**(3): 500-8.
- Szabo, I., T. G. Kovats y F. Halberg (1978). "Circadian rhythm in murine reticuloendothelial function." Chronobiologia **5**(2): 137-43.
- Taishi, P., S. Bredow, N. Guha-Thakurta, F. Obal, Jr. y J. M. Krueger (1997). "Diurnal variations of interleukin-1 beta mRNA and beta-actin mRNA in rat brain." J Neuroimmunol **75**(1-2): 69-74.

- Takahashi, S., L. Kapas, J. Fang y J. M. Krueger (1999). "Somnogenic relationships between tumor necrosis factor and interleukin-1." Am J Physiol **276**(4 Pt 2): R1132-40.
- Takahashi, S., S. Yokota, R. Hara, T. Kobayashi, M. Akiyama, T. Moriya y S. Shibata (2001). "Physical and inflammatory stressors elevate circadian clock gene mPer1 mRNA levels in the paraventricular nucleus of the mouse." Endocrinology **142**(11): 4910-7.
- Takata, M., N. Burioka, S. Ohdo, H. Takane, H. Terazono, M. Miyata, T. Sako, H. Suyama, Y. Fukuoka, K. Tomita y E. Shimizu (2002). "Daily expression of mRNAs for the mammalian Clock genes Per2 and clock in mouse suprachiasmatic nuclei and liver and human peripheral blood mononuclear cells." Jpn J Pharmacol **90**(3): 263-9.
- Tam, W. F., L. H. Lee, L. Davis y R. Sen (2000). "Cytoplasmic sequestration of rel proteins by IkappaBalpha requires CRM1-dependent nuclear export." Mol Cell Biol **20**(6): 2269-84.
- Tamada, Y., M. Tanaka, K. Munekawa, S. Hayashi, H. Okamura, T. Kubo, Y. Hisa y Y. Ibata (1998). "Neuron-glia interaction in the suprachiasmatic nucleus: a double labeling light and electron microscopic immunocytochemical study in the rat." Brain Res Bull **45**(3): 281-7.
- Tei, H., H. Okamura, Y. Shigeyoshi, C. Fukuhara, R. Ozawa, M. Hirose y Y. Sakaki (1997). "Circadian oscillation of a mammalian homologue of the Drosophila period gene." Nature **389**(6650): 512-6.
- Thresher, R. J., M. H. Vitaterna, Y. Miyamoto, A. Kazantsev, D. S. Hsu, C. Petit, C. P. Selby, L. Dawut, O. Smithies, J. S. Takahashi y A. Sancar (1998). "Role of mouse cryptochrome blue-light photoreceptor in circadian photoresponses." Science **282**(5393): 1490-4.

- Tkacs, N. C. y A. M. Strack (1995). "Systemic endotoxin induces Fos-like immunoreactivity in rat spinal sympathetic regions." J Auton Nerv Syst **51**(1): 1-7.
- Tollefson, L. y K. Bulloch (1990). "Dual-label retrograde transport: CNS innervation of the mouse thymus distinct from other mediastinum viscera." J Neurosci Res **25**(1): 20-8.
- Tosini, G. y M. Menaker (1996). "Circadian rhythms in cultured mammalian retina." Science **272**(5260): 419-21.
- Toth, L. A. y J. M. Krueger (1995). "Lighting conditions alter *Candida albicans*-induced sleep responses in rabbits." Am J Physiol **269**(6 Pt 2): R1441-7.
- Toth, L. A. y M. R. Opp (2001). "Cytokine- and microbially induced sleep responses of interleukin-10 deficient mice." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **280**(6): R1806-14.
- Toth, L. A., E. A. Tolley y J. M. Krueger (1993). "Sleep as a prognostic indicator during infectious disease in rabbits." Proc Soc Exp Biol Med **203**(2): 179-92.
- Ueda, H. R., W. Chen, A. Adachi, H. Wakamatsu, S. Hayashi, T. Takasugi, M. Nagano, K. Nakahama, Y. Suzuki, S. Sugano, M. Iino, Y. Shigeyoshi y S. Hashimoto (2002). "A transcription factor response element for gene expression during circadian night." Nature **418**(6897): 534-9.
- Uthgenannt, D., D. Schoolmann, R. Pietrowsky, H. L. Fehm y J. Born (1995). "Effects of sleep on the production of cytokines in humans." Psychosom Med **57**(2): 97-104.
- Vagnucci, A. H. y A. Winkelstein (1993). "Circadian rhythm of lymphocytes and their glucocorticoid receptors in HIV-infected homosexual men." J Acquir Immune Defic Syndr **6**(11): 1238-47.
- Vallieres, L. y S. Rivest (1997). "Regulation of the genes encoding interleukin-6, its receptor, and gp130 in the rat brain in response to the immune activator

- lipopolysaccharide and the proinflammatory cytokine interleukin-1beta." J Neurochem **69**(4): 1668-83.
- van den Pol, A. N. (1991). The suprachiasmatic nucleus: Morphological and cytochemical substrates for cellular interaction. Suprachiasmatic nucleus: The mind's clock. D. C. Klein, R. Y. Moore and S. M. Reppert. Oxford, Oxford University Press.: 17-50.
- van den Pol, A. N., S. M. Finkbeiner y A. H. Cornell-Bell (1992). "Calcium excitability and oscillations in suprachiasmatic nucleus neurons and glia in vitro." J Neurosci **12**(7): 2648-64.
- Van der Beek, E. M., T. L. Horvath, V. M. Wiegant, R. Van den Hurk y R. M. Buijs (1997). "Evidence for a direct neuronal pathway from the suprachiasmatic nucleus to the gonadotropin-releasing hormone system: combined tracing and light and electron microscopic immunocytochemical studies." J Comp Neurol **384**(4): 569-79.
- van der Horst, G. T., M. Muijtjens, K. Kobayashi, R. Takano, S. Kanno, M. Takao, J. de Wit, A. Verkerk, A. P. Eker, D. van Leenen, R. Buijs, D. Bootsma, J. H. Hoeijmakers y A. Yasui (1999). "Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms." Nature **398**(6728): 627-30.
- Vasselon, T., E. Hailman, R. Thieringer y P. A. Detmers (1999). "Internalization of monomeric lipopolysaccharide occurs after transfer out of cell surface CD14." J Exp Med **190**(4): 509-21.
- Vitaterna, M. H., D. P. King, A. M. Chang, J. M. Kornhauser, P. L. Lowrey, J. D. McDonald, W. F. Dove, L. H. Pinto, F. W. Turek y J. S. Takahashi (1994). "Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian behavior." Science **264**(5159): 719-25.
- Vitaterna, M. H., C. P. Selby, T. Todo, H. Niwa, C. Thompson, E. M. Fruechte, K. Hitomi, R. J. Thresher, T. Ishikawa, J. Miyazaki, J. S. Takahashi y A. Sancar

- (1999). "Differential regulation of mammalian period genes and circadian rhythmicity by cryptochromes 1 and 2." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(21): 12114-9.
- Vivien-Roels, B., A. Malan, M. C. Rettori, P. Delagrangé, J. P. Jeannot y P. Pevet (1998). "Daily variations in pineal melatonin concentrations in inbred and outbred mice." J Biol Rhythms **13**(5): 403-9.
- Wahl, C., S. Liptay, G. Adler y R. M. Schmid (1998). "Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of nuclear factor kappa B." J Clin Invest **101**(5): 1163-74.
- Wallach, D., E. E. Varfolomeev, N. L. Malinin, Y. V. Goltsev, A. V. Kovalenko y M. P. Boldin (1999). "Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms." Annu Rev Immunol **17**: 331-67.
- Wan, W., L. Wetmore, C. M. Sorensen, A. H. Greenberg y D. M. Nance (1994). "Neural and biochemical mediators of endotoxin and stress-induced c-fos expression in the rat brain." Brain Res Bull **34**(1): 7-14.
- Watts, A. G., W. J. Sheward, D. Whale y G. Fink (1989). "The effects of knife cuts in the sub-paraventricular zone of the female rat hypothalamus on oestrogen-induced diurnal surges of plasma prolactin and LH, and circadian wheel-running activity." J Endocrinol **122**(2): 593-604.
- Welsh, D. K., E. M. Engel, G. S. Richardson y W. C. Dement (1986). "Precision of circadian wake and activity onset timing in the mouse." J Comp Physiol [A] **158**(6): 827-34.
- Welsh, D. K., D. E. Logothetis, M. Meister y S. M. Reppert (1995). "Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms." Neuron **14**(4): 697-706.
- Welsh, D. K. y S. M. Reppert (1996). "Gap junctions couple astrocytes but not neurons in dissociated cultures of rat suprachiasmatic nucleus." Brain Res **706**(1): 30-6.

- Wise, S., N. T. Davis, E. Tyndale, J. Noveral, M. G. Folwell, V. Bedian, I. F. Emery y K. K. Siwicki (2002). "Neuroanatomical studies of period gene expression in the hawkmoth, *Manduca sexta*." J Comp Neurol **447**(4): 366-80.
- Wongwiwat, M., S. Sukapanit, C. Triyanond y W. D. Sawyer (1972). "Circadian rhythm of the resistance of mice to acute pneumococcal infection." Infect Immun **5**(4): 442-8.
- Wright, S. D., R. A. Ramos, P. S. Tobias, R. J. Ulevitch y J. C. Mathison (1990). "CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein." Science **249**(4975): 1431-3.
- Yamazaki, S., V. Alones y M. Menaker (2002). "Interaction of the retina with suprachiasmatic pacemakers in the control of circadian behavior." J Biol Rhythms **17**(4): 315-29.
- Yamazaki, S., R. Numano, M. Abe, A. Hida, R. Takahashi, M. Ueda, G. D. Block, Y. Sakaki, M. Menaker y H. Tei (2000). "Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats." Science **288**(5466): 682-5.
- Yan, L. y H. Okamura (2002). "Gradients in the circadian expression of Per1 and Per2 genes in the rat suprachiasmatic nucleus." Eur J Neurosci **15**(7): 1153-62.
- Yan, L., S. Takekida, Y. Shigeyoshi y H. Okamura (1999). "Per1 and Per2 gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus: circadian profile and the compartment-specific response to light." Neuroscience **94**(1): 141-50.
- Yannielli, P. C., J. M. Brewer y M. E. Harrington (2004). "Blockade of the NPY Y5 receptor potentiates circadian responses to light: complementary in vivo and in vitro studies." Eur J Neurosci **19**(4): 891-7.
- Yoo, S. H., S. Yamazaki, P. L. Lowrey, K. Shimomura, C. H. Ko, E. D. Buhr, S. M. Siepka, H. K. Hong, W. J. Oh, O. J. Yoo, M. Menaker y J. S. Takahashi (2004). "PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals

- persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(15): 5339-46.
- Young, M. W. (2000). "Circadian rhythms. Marking time for a kingdom." Science **288**(5465): 451-3.
- Young, M. W. y S. A. Kay (2001). "Time zones: a comparative genetics of circadian clocks." Nat Rev Genet **2**(9): 702-15.
- Zatz, M. (1992a). "Does the circadian pacemaker act through cyclic AMP to drive the melatonin rhythm in chick pineal cells?" J Biol Rhythms **7**(4): 301-11.
- Zatz, M. (1992b). Perturbing the pacemaker in the chick pineal. Circadian rhythms. M. Zatz. Amsterdam, Elsevier: 67-73.
- Zhang, Y. H., J. Lu, J. K. Elmquist y C. B. Saper (2000). "Lipopolysaccharide activates specific populations of hypothalamic and brainstem neurons that project to the spinal cord." J Neurosci **20**(17): 6578-86.
- Zhang, Z., P. F. Inerra, B. Liang, S. K. Ardestani, K. K. Elliott, M. Molitor y R. R. Watson (1997). "Melatonin, immune modulation and aging." Autoimmunity **26**(1): 43-53.
- Zhong, H., M. J. May, E. Jimi y S. Ghosh (2002). "The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1." Mol Cell **9**(3): 625-36.
- Zylka, M. J., L. P. Shearman, J. D. Levine, X. Jin, D. R. Weaver y S. M. Reppert (1998a). "Molecular analysis of mammalian timeless." Neuron **21**(5): 1115-22.
- Zylka, M. J., L. P. Shearman, D. R. Weaver y S. M. Reppert (1998b). "Three period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain." Neuron **20**(6): 1103-10.

Apendices

Apéndice A.1.

Consideraciones prácticas para el análisis de ritmos circadianos.

Teniendo en cuenta que en el estudio de los ritmos circadianos los cronobiólogos utilizamos no sólo una terminología propia del área si no que también usamos algunos métodos de análisis no del todo convencionales incluyo en este apéndice algunas generalidades prácticas para aquellos lectores no familiarizados con los ritmos circadianos. Estas generalidades no son de ninguna manera triviales si no que resultan claves para entender cabalmente el trabajo desarrollado en esta tesis. Sin embargo, el análisis de los ritmos circadianos es hoy en día un tema frecuente en la literatura científica de muy diversas áreas por lo que la exclusión de estos temas de la introducción evita hacerla aún más “pesada” para quienes ya tienen cronobiológicos básicos.

Parámetros generales de los ritmos circadianos.

Como todo ritmo, los ritmos biológicos en general y los circadianos en particular pueden ser caracterizados en función de cuatro parámetros principales, el período, el mesor, la amplitud y la fase (figura A.1). El período puede ser definido como el tiempo que transcurre entre dos puntos en los cuales la variable en estudio se encuentra en la misma situación (los más identificables son máximos y mínimos) y por definición es cercano a 24 horas en los ritmos circadianos. El mesor corresponde al valor medio de la variable, la amplitud corresponde al medio de la diferencia entre los máximos y los mínimos y la fase puede definirse como el valor que toma la variable en un momento determinado del ciclo.

De estas variables las dos más utilizadas en cronobiología son el período y la fase ya que en base a ellas es posible estudiar numerosas propiedades del sistema circadiano y

son las que suelen caracterizar al sistema de cada especie y/o cepa. Por ejemplo, los hámsteres tienen en general períodos muy cercanos a 24 horas o un poco mayores, las ratas tienen períodos de más de 24 horas y los ratones menores a 24 horas. Por otro lado el período de los ratones C57BL/6 es de 23,7 horas mientras que el de los ratones BALB/C es de 23 horas. O sea que al ver un actograma podemos tener alguna idea de qué animal se trata simplemente observando el período.

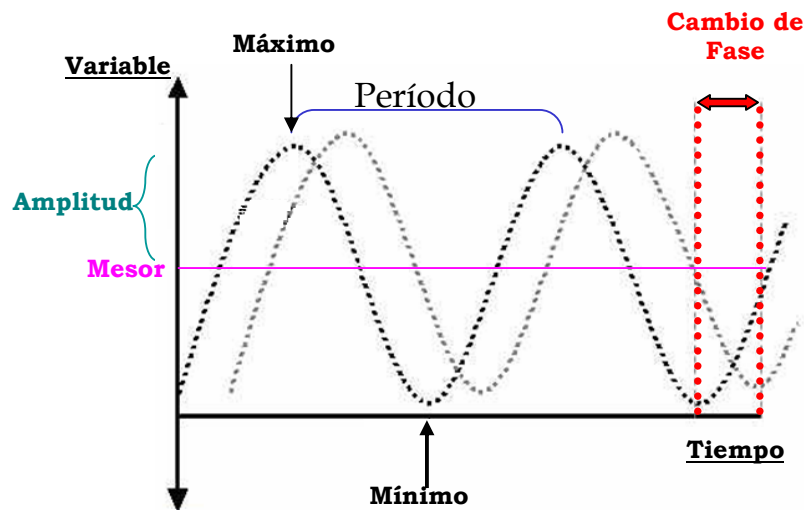


Figura A2.1. *Parámetros de características de un ritmo.*

El esquema representa una variable cualquiera cuyos valores cambian en forma rítmica en función del tiempo. Se pueden observar los parámetros característicos de un ritmo que son el período, la amplitud, el mesor y la fase. La curva oscura representa el ritmo original y la curva más clara representa el ritmo de la misma variable luego de un cambio de fase indicado por la flecha bidireccional de color rojo. El período es el tiempo que tarda en completarse un ciclo, la amplitud es la mitad de la diferencia entre máximos y mínimos y la fase corresponde al valor que toma la variable en un momento dado.

Tiempo circadiano (CT) y tiempo de *zeitgeber* (ZT).

Si bien la diferencia es simplemente de una letra, la implicancia de este cambio puede ser fundamental y es clave entender claramente de qué se trata. ZT se refiere al tiempo en condiciones en las que un estímulo externo aporta las claves temporales. Por ejemplo en un ciclo L:O, la alternancia entre luz y oscuridad aporta claves temporales que pueden sincronizar al sistema circadiano de un animal en estudio. Por este

motivo, se refiere el tiempo a la variable externa y se toma una fase arbitraria como referencia. En el caso de los ciclos L:O suele definirse como ZT 12 el apagado de las luces aunque al ser arbitrario esto es a veces modificado en función de la conveniencia del experimentador.

Sin embargo en muchos casos es conveniente referir el tiempo a los ritmos endógenos del individuo en estudio. Esto se da principalmente cuando se trabaja en condiciones O:O. Para hacer esto, se toma una fase de referencia que en ratones suele ser el inicio de la actividad. También se puede tomarse el máximo de la variable (acrofase) o el final de la actividad. La acrofase suele ser útil para variables como la temperatura corporal y el final de la actividad suele utilizarse cuando el inicio no es muy preciso como suele ocurrir en ratas. Esta fase suele ser definida arbitrariamente como CT 12 aunque puede asignársele cualquier otro valor.

Para un animal nocturno, si tomamos CT 12 como el inicio de actividad, la “noche subjetiva” o sea el momento que el animal considera como noche a pesar de estar en O:O, se dará a partir de CT12 y se extenderá aproximadamente hasta CT24 (esto puede variar) y el “día subjetivo” comienza al finalizar la noche subjetiva y termina a CT 12.

Actogramas.

Para entender cómo se genera un actograma es conveniente entenderlo como un apilamiento vertical de gráficos del valor de la variable en función del tiempo. Para entender esto un poco mejor imaginemos que graficamos el valor de la actividad locomotora de un animal a lo largo de 48 horas. Si el animal es nocturno vamos a ver mucha actividad durante la noche y poca o nada durante el día (figura A.2.A). Podemos graficar la actividad del segundo día y colocar este gráfico debajo del de la

actividad del primer día (figura A.2.B) y así sucesivamente tantos días como queramos. Para hacer la visualización más clara, suelen graficarse actogramas dobles, en los que la única diferencia es que en lugar de 24 horas en las abscisas se utilizan 48 horas. El único detalle que puede resultar complicado en los actogramas dobles es que la diferencia entre dos “líneas” sucesivas debe haber 24 horas de diferencia. Esto se hace graficando la variable a lo largo de 48 horas para un primer día y por debajo se grafica el valor de la variable pero comenzando por las últimas 24 horas del día anterior.

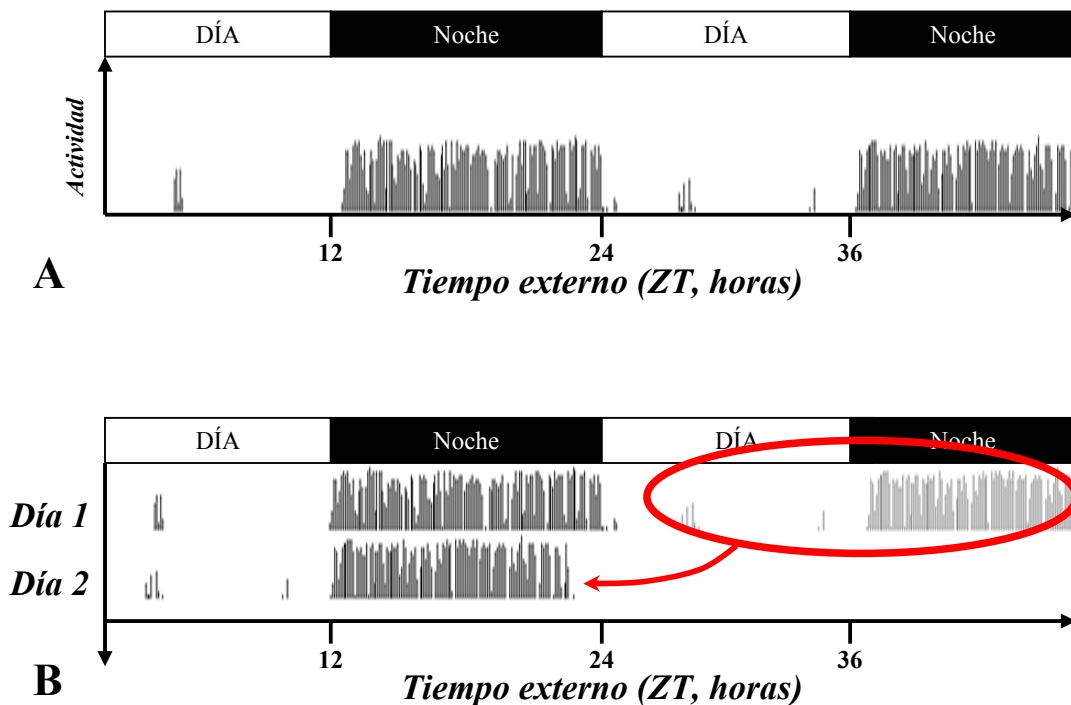


Figura A.2. Construcción de un actograma.

Este esquema muestra en forma simplificada la forma en que se construye una actograma simple. **(A)** En un primer paso se realiza un gráfico de la actividad en función del tiempo representando varios días. **(B)** Luego se fracciona ese gráfico a intervalos regulares que representan 24 horas y se apilan los fragmentos en forma descendente de forma tal que la primera “línea” del actograma corresponde al día 1, la segunda al día 2 y así sucesivamente.

Los actogramas dobles se construyen en forma similar pero las abscisas son de 48 horas en lugar de 24. El apilado se hace en este caso de forma tal de obtener en la primera línea los días 1 y 2, en la segunda el 2 y el 3, en la tercera el 3 y el 4 y así sucesivamente.

Si bien se puede extraer mucha información de un actograma, el parámetro más evidente es el período. Un ritmo con período mayor a 24 horas se correrá hacia la derecha, uno de 24 horas se mantendrá vertical y uno menor a 24 horas se correrá a la izquierda. Esto se ve a primera vista, pero además es posible tomar una fase de referencia, como por ejemplo el inicio de la actividad o el máximo de la variable (acrofase) para cada día y hacer una regresión lineal entre todos estos puntos. La pendiente de la recta de regresión corresponde a la diferencia que existe entre el período del ritmo y las 24 horas por lo que se puede obtener el valor numérico del período restando el valor de la pendiente a 24 horas.

Cálculo de los cambios de fase y la CRF.

Los actogramas son de gran utilidad para calcular cambios de fase. Para hacer esto se procede en forma similar a lo descrito para el cálculo del período. Se identifica una fase de referencia, se marca en los días sucesivos y se traza una recta de regresión entre los puntos marcados. Esto se hace para los días previos a la aplicación del estímulo cuyo efecto se está estudiando y se repite en forma independiente para los días posteriores a la estimulación. De esta forma tendrían que obtenerse dos rectas de regresión paralelas entre sí separadas por una cierta distancia en las abscisas. Esa distancia (o mejor dicho lo que representan en tiempo) corresponde al cambio de fase medido en tiempo (figura A.3). En general los retrasos de fase son inmediatos o sea que se pueden observar al día siguiente del tratamiento, pero los avances de fase suelen demorar alrededor de cinco días observándose una transición gradual que se conoce como “transiente”. Por este motivo es que en general se descartan los primeros cinco días luego del tratamiento para calcular los cambios de fase y esto suele hacerse tanto para retrasos como para avances.

Sabiendo cómo se calcula un cambio de fase es relativamente simple entender cómo se construye una CRF. Lo que se hace es aplicar un determinado estímulo a distintos horarios y determinar la magnitud del cambio de fase que ese estímulo causa a cada horario. Por ejemplo podríamos tener unos 25 animales a los que se le está registrando la actividad locomotora en condiciones O:O, subdividirlos en 5 grupos y darles un pulso de luz pero en un horario circadiano diferente a cada grupo. Esperamos alrededor de 15 días y analizamos el cambio de fase inducido en cada animal que debería ser diferente para cada grupo. Si los animales responden normalmente, aquellos tratados a principios de la noche subjetiva deberían tener retrasos, los tratados hacia el final de la noche subjetiva mostrarían avances y los que fueron tratados durante el día subjetivo no deberían mostrar cambios considerables en la fase. Por supuesto, esto dependería de la especie y cepa de animales que utilizemos.

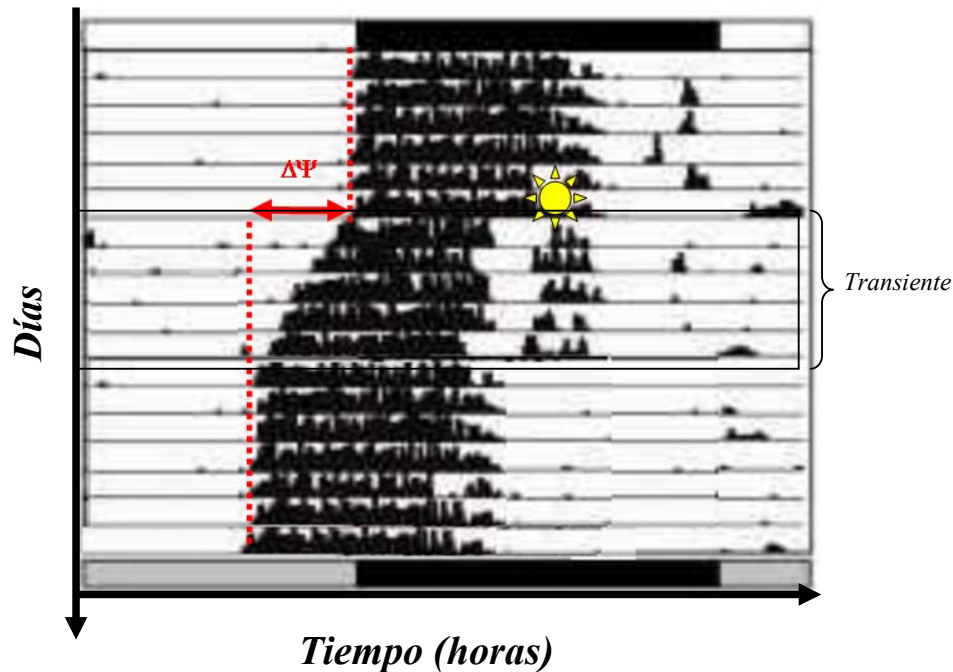


Figura A.3. *Medición de cambios de fase en actogramas.*

En el esquema se puede ver el actograma de un animal mantenido inicialmente en L:O y pasado a O:O luego de un pulso de luz al final de la noche (símbolo amarillo). Luego de 5 días de transiente (marcados en verde), el período se estabiliza y se puede medir un cambio de fase marcado con la flecha bidireccional roja. Por convención a los avances (como el de este ejemplo) se les asignan valores positivos y a los retrasos valores negativos. Se puede observar además como se trazan habitualmente las líneas de regresión para marcar la fase de inicio de actividad (líneas punteadas rojas) utilizadas también para estimar los períodos.

Graficando la magnitud del cambio de fase en función del horario estimulación se obtiene la CRF (figura A.4). La curva de respuesta de fase (CRF) es una característica propia de cada especie y/o cepa. En términos generales los animales con períodos mayores a 24 horas tienen curvas de respuesta de fase en las que los avances son de mayor magnitud que los retrasos mientras que los animales con períodos menores a 24 horas suelen tener mayores retrasos que avances. La CRF puede variar también entre diferentes cepas como se puede observar por ejemplo en la figura 2.8., que muestra las CRF para ratones BALB/C y C57BL/6J. Como se puede observar en la figura, los retrasos son similares para ambos y de mayor magnitud que los avances. Sin embargo la zona de avances es más temprana en los BALB/C que en los C57BL/6J y la diferencia entre el área bajo la curva en la zona de retrasos con

respecto al área bajo la curva en la zona de avances es mayor en los BALB/C. La diferencia en las áreas bajo la curva es un parámetro que se utiliza para definir y comparar las formas de las CRF.

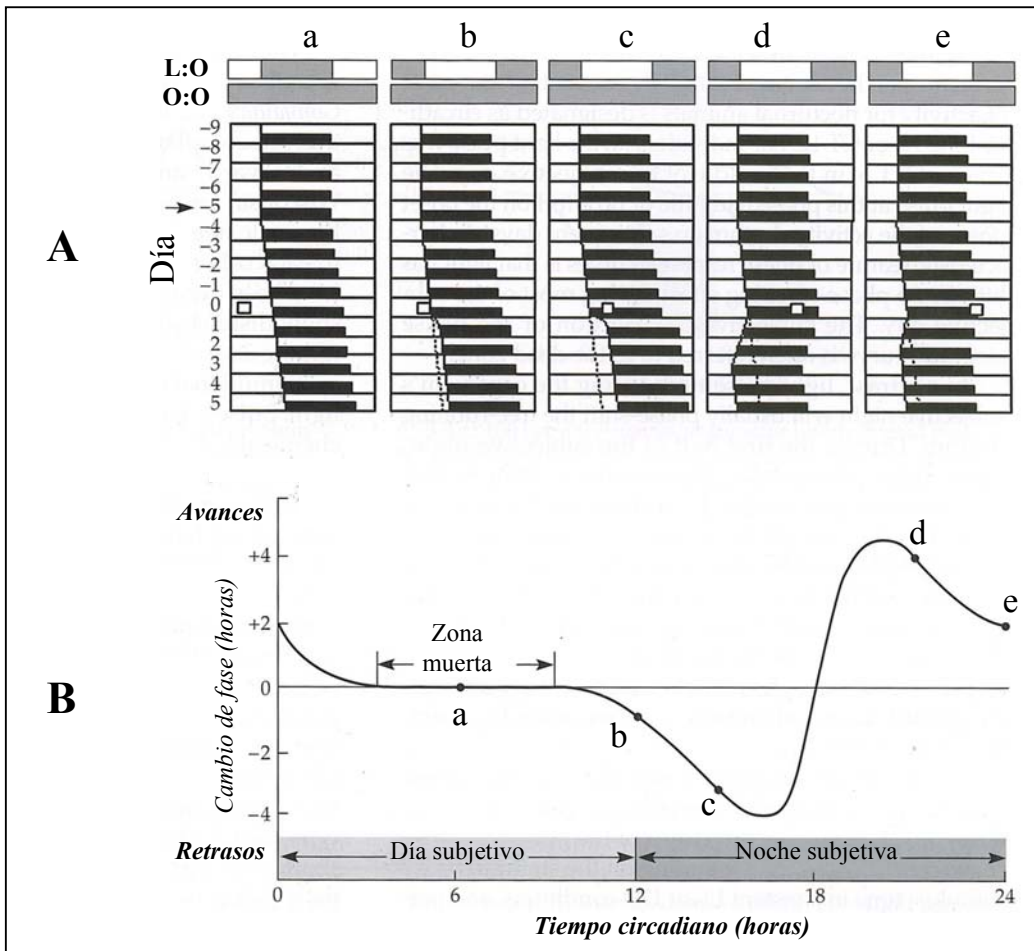


Figura A.4. Cómo se construye una curva de respuesta de fase.

Este esquema representa una forma de construir una PRC para un animal de hábitos nocturnos. **(A)** Los animales se mantienen en L:O hasta que se habitúan a las condiciones de registro. Luego se los pasa a O:O (día -5, marcado con una flecha a la izquierda de los actogramas) y transcurridos 5 días (día 0), se les administra un pulso de luz a distintos horarios (un solo horario para cada animal). En este caso los animales están representados por las letras **a,b,c,d** y **e** arriba de los actogramas y en cada actograma se puede ver el horario de administración representado por el cuadrado vacío. De acuerdo a este esquema el animal a fue tratado durante el día, b en la transición entre día y noche subjetivos, c en las primeras horas de la noche subjetiva, d en las últimas horas de la noche subjetiva y e en la transición entre noche y día subjetivos. **(B)** Al graficar la magnitud del cambio de fase inducido en cada uno de los animales en función del momento de administración se obtiene la CRF. Los puntos marcados con las letras a, b, c, d y e se corresponden con los animales denominados con las mismas letras. Nótese que los estímulos aplicados a principios de la noche subjetiva producen retrasos y aquellos aplicados al final de la misma producen adelantos. Durante el día subjetivo no se observan respuestas de cambio de fase por lo que se conoce a esta parte de la curva como zona muerta.

Apéndice A2.

Publicaciones vinculadas a este trabajo de tesis doctoral.

Abreviaturas.

3V	Tercer ventrículo
ATP	Adenosina trifosfato
Ade	Adenosina
AVP	Arginina vasopresina
CPi	Corteza piriforme
CRF	Curva de respuesta de fase
CT-1	Cardiotrofina 1
CT	Tiempo circadiano
Glu	Glutamato
GFAP	Proteína fibrilar ácida de glía
GFAPir	Inmunoreactividad de la proteína fibrilar ácida de glía
i.c.v.	Intra cerebro ventricular
IEGs	Genes de expresión inmediato temprana
IFN	Interferón
IGL	Hojuela intergeniculada lateral
IL-1	Interleuquina 1
i.p.	Intra peritoneal
i.v.	Intra venosa
LIF	Factor inhibitorio de leucemia
LPS	Lipopolisacárido
Min	Minutos
NF-κB	Factor nuclear de transcripción de la cadena liviana κ de inmunoglobulinas de linfocitos B.
NPV	Núcleos paraventriculares hipotalámicos
NSQ	Núcleos supraquiasmáticos
NTS	Núcleos del tracto solitario
OSM	Oncostatina M
OX	Quiasma óptico
PVT	Núcleos paraventriculares talámicos
SNC	Sistema nervioso central
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNFR	Receptor del factor de necrosis tumoral
TRH	Tracto retino hipotalámico
ZT	Tiempo externo o de zeitgeber