

# ***1- INTRODUCCIÓN***



## INTRODUCCIÓN

### 1.1 Ritmos en la naturaleza

Los ritmos pueden definirse como la repetición de eventos y/o fenómenos en intervalos regulares o períodos de tiempo. La ritmicidad es una regla en el universo, tanto en sus dimensiones microcósmicas como macrocósmicas: los átomos y moléculas oscilan con frecuencias características, el universo se contrae y expande con un período del orden de millones de años. Según el mito griego del génesis, nuestro planeta fue creado por la danza de la diosa *Gaia*, una nebulosa de remolinos turbulentos envuelta entre velos blancos que giraba a través de una oscuridad a la que llamaban *Caos* (Sahtouris, 1994). La diosa permitió a la vida auto-organizarse al ritmo de su danza, y diariamente nos encontramos interpretando uno de sus compases.

La naturaleza cíclica del universo impone variaciones ambientales periódicas sobre la Tierra conocidas como ciclos geofísicos. Los cambios anuales en la duración del día, son consecuencia de la traslación del planeta en una órbita elíptica alrededor del sol, y estos cambios estacionales se alternan en los hemisferios debido a la inclinación del eje del planeta respecto al plano de la órbita. Los cambios diarios en la exposición de la superficie terrestre al campo electromagnético generado por el sol, son consecuencia de la rotación de la Tierra sobre su eje, esto último ya establecido en el siglo IV por Heráclides del Ponto (Russell, 1992). El período medio de revolución del planeta en la actualidad es de aproximadamente 24 horas y define al día solar, que se halla caracterizado entonces por fluctuaciones periódicas de luz y oscuridad (LO). Otro ciclo geofísico importante es el de mareas, cuyo mecanismo celeste es complejo, pero es producido básicamente por la influencia gravitacional de la luna en su órbita alrededor del planeta (Morgan, 1991).

Con la excepción de determinados ambientes cuyas características temporales son poco conocidas, como las cavernas, regiones abisales y orillas de fuentes calientes, las variaciones en la intensidad lumínica sobre la superficie terrestre son evidentes. Si bien la presencia relativamente constante de factores abióticos puede operar como una fuerte presión de selección, como es el caso de las bajas temperaturas en zonas polares, se ha propuesto que los

cambios ambientales periódicos son los que han tenido mayor influencia en el modelado evolutivo (Anhokin, 1974, Pittendrigh, 1981b). Es de esperar entonces que la fisiología y el comportamiento de la inmensa mayoría de las especies se haya adaptado y muestre periodicidades acorde con los ciclos geofísicos más relevantes para su biología. Actualmente se sabe que los ritmos son una propiedad conservada en todos los niveles de la organización de la vida, desde organismos unicelulares procariontes hasta mamíferos y plantas superiores, desde el nivel celular hasta el organismo como un todo.

### 1.1.1. ¿Ritmos exógenos o endógenos?

En el año 325 a.C., Andróstenes de Thasos da una de las primeras descripciones de ritmos biológicos, detallando el movimiento periódico de las hojas de *Tamarindus indicus* (Rotenberg y col., 1997). 2.000 años más tarde en el 1729, el astrónomo francés Jean Jacques De Mairan publica sus observaciones sobre la actividad foliar de *Mimosa* sp., en plantas aisladas del ciclo LO, lo cual constituyó la primera descripción formal de un ritmo en ausencia de variaciones ambientales, sugiriendo su posible naturaleza endógena. Al considerar las respuestas adaptativas de los organismos a un ambiente cíclico, surge una dicotomía sobre el origen de las variaciones biológicas rítmicas con correlatos geofísicos: ¿son simplemente una respuesta al ambiente de tipo "causa-efecto", o poseen una raíz orgánica producto de elementos periódicos impresos por el ambiente en el curso de la evolución? Esta controversia se mantuvo durante muchos años, pero comenzó a ceder a favor de la hipótesis de la naturaleza endógena con el hallazgo de ritmos con períodos diferentes a 24 h, con la demostración de la naturaleza hereditaria de la periodicidad, y con la exclusión de posibles fuerzas sutiles (como las geomagnéticas) que podrían "filtrarse" en el laboratorio y conducir la ritmicidad (Rotenberg y col., 1997).

Para determinar las causas endógenas de los ritmos, se los estudia en ausencia de variaciones ambientales, o sea en condiciones constantes de exposición a la luz (LL), oscuridad (OO), temperatura, humedad, etc. En esta situación experimental, se dice que el organismo se encuentra en curso libre, y se define el período del ritmo observado como  $\tau$  = período de curso libre. Generalmente, se manifiestan ritmos con  $\tau$ s aproximados a las 24 horas, por lo que se los ha denominado ritmos circadianos (del latín *circa*, cercano; *diem*, día).

Una amplia evidencia experimental, sostenida en la hipótesis acerca del origen endógeno de los ritmos, fue extendiéndose más allá de los primeros estudios en plantas hacia una gran variedad de especies animales. Del estudio de estos "circarritmos", surgen sus características fundamentales (Aschoff, 1969; Aschoff, 1981):

- 1- Son ubicuos en la inmensa mayoría de las especies biológicas.
- 2- Se mantienen por períodos prolongados de aislamiento ambiental: de tratarse de un mecanismo pasivo, al suprimir la influencia externa la ritmicidad debería desaparecer, como si se tratase de una oscilación amortiguada.
- 3- Se observa una gran variabilidad intraespecífica de  $\tau$ , y es siempre constante para los distintos ritmos del mismo individuo, por lo tanto habiéndose eliminado la fuente de variación ambiental, aquella variabilidad sólo puede explicarse por diferencias genéticas.
- 4- El período de libre curso exhibe poca variación a lo largo de series de tiempo prolongadas, como consecuencia de un proceso que cuenta con mecanismos de regulación.

En este contexto, los ritmos biológicos pueden haber surgido en el curso de la evolución en respuesta a determinadas variables ambientales cíclicas (exposición a la luz, temperatura, humedad, salinidad, etc), que actúan como claves temporales o *zeitgebers* (del alemán *Zeit*, tiempo; *geber*, dador) modelando en los organismos una representación endógena del tiempo externo. Colin Pittendrigh plantea el problema de la naturaleza exógena vs. endógena de los ritmos biológicos desde la perspectiva evolutiva, de modo que en sus orígenes los seres vivos se someterían al orden temporal impuesto por el ambiente, y conforme evolucionaron "asimilando" el tiempo externo dieron origen a su propia organización temporal. Así el correlato biológico-geofísico se explica por la impresión original del ambiente, mientras que sus diferencias se deben a las características particulares de las especies para adaptarse al medio ambiente (Pittendrigh, 1981b).

Sin embargo, ¿cuál sería el valor adaptativo de un ritmo endógeno con período diferente al del *zeitgeber* ambiental? De expresarse su período endógeno, el ritmo se iría desfasando continuamente de las condiciones periódicas ambientales. Siguiendo un principio de homeostasis predictiva, la regulación del medio interno estaría basada en la capacidad de los ritmos para sincronizarse con el ambiente. Entonces el valor adaptativo de los ritmos

biológicos reside principalmente en su capacidad de sincronización con el programa temporal del ambiente, que de este modo resultaría predecible para los organismos en pro de elaborar respuestas fisiológicas y conductuales anticipatorias.

La selección natural ha aprovechado la predictibilidad de un ambiente cíclico. Las especies se han adaptado al ambiente explotando una miríada de nichos ecológicos disponible en la biósfera, definidos tanto por características permanentes como cíclicas. Además, las fases diurna y nocturna del día solar posibilitan una compartimentalización en nichos temporales: existen organismos de hábitos diurnos, que manifiestan ritmos de actividad/reposo de 24 horas con la fase de actividad durante las horas del día, otros de hábitos nocturnos que se muestran activos durante la noche, y los que son activos en las transiciones luminosas del amanecer y el crepúsculo. El significado adaptativo de ciertas fases de actividad puede encontrarse en los aspectos temporales de las interacciones entre especies, como es el caso del parásito de la malaria, el cual se dirige mayormente a la circulación periférica cuando el mosquito *Aedes aegypti*, que lo disemina entre sus huéspedes, se encuentra activo. En el caso de las plantas crasuláceas que viven en ambientes secos, el proceso íntegro de la fotosíntesis se da durante el día, mientras que la fijación de CO<sub>2</sub> ocurre durante la noche, existiendo un ritmo nocturno en la apertura de los estomas para evitar una excesiva transpiración. Ejemplos clásicos de coevolución como el de las angiospermas y sus polinizadores muestran adaptaciones morfológicas recíprocas, así como también ritmos sincronizados de apertura de flores y de actividad recolectora. La apertura y cierre de las flores de ciertas plantas inspiró a Carolus Linneo el diseño de su "reloj floral", en el que la hora se mide mediante la observación de flores que se abren o cierran a horas precisas del día (Fig. 1).



**Figura 1.** Reloj floral de Carolus Linneo.

Otra propiedad importante de los ritmos reside en la base de los fenómenos fotoperiódicos, que ocurren especialmente en zonas de estacionalismo marcado, como la floración de las plantas angiospermas, la diapausa y los morfos estacionales de los insectos holometábolos, el aletargamiento invernal (torpor, hibernación) propio de mamíferos de pequeño tamaño, como los órdenes Chiróptera, Rodentia e Insectívora (Eckert y col., 1990). Ante la ocurrencia de un ambiente predecible, los organismos pueden realizar ajustes en sus funciones para anticiparse a períodos de condiciones desfavorables. Si bien en algunas especies el control de los fenómenos fotoperiódicos puede estar sujeto a mecanismos pasivos tipo reloj de arena, en otras como en el hámster el rol de los ritmos es generar un modelo de coincidencia externa para establecer la dirección del cambio ambiental (Binkley, 1990; Pittendrigh, 1981b).

### **1.1.2. Clasificación de los ritmos biológicos**

Los ritmos biológicos medidos en ambientes controlados muestran períodos de curso libre similares al período del ritmo geofísico más relevante para el organismo. Franz Halberg introdujo el prefijo "circa" para caracterizar esta periodicidad endógena relacionada a la variable ambiental de influencia, en sus experiencias de aislamiento el ciclo diario de luz/oscuridad, por lo que los ritmos hallados eran "circadianos" (Halberg, 1959). Por otro

lado, Jürgen Aschoff extendió el concepto, hallando periodicidades "circamareales", "circalunares" y "circanuales". Los ritmos biológicos se presentan abarcando un amplio rango de frecuencias, y pueden ser clasificados de acuerdo a ellas.

### Frecuencias de ritmos biológicos

	<b>ALTA FRECUENCIA</b> $\tau < 0.5$ hs.	<b>FRECUENCIA MEDIA</b> $0.5 < \tau < 3$ días	<b>BAJA FRECUENCIA</b> $\tau > 3$ días
<b>Regiones de los ritmos</b>	$\tau \approx 0.10$ seg. $\tau \approx 0.01$ seg. etc.	Ultradiano: $0.5 < \tau < 20$ h Circadiano: $20 < \tau < 28$ h Infradiano: $\tau > 28$ hs. Circamareal: $\tau \approx 12$ hs.	Circaseptano: $\tau \approx 7$ días Circadiseptano: $\tau \approx 14$ d Circavigintiano: $\tau \approx 20$ d Circatrigintano: $\tau \approx 30$ d Circannual: $\tau \approx 1$ año
<b>Ritmos en:</b>	Electroencefalograma Electrocardiograma Respiración Peristalsis	Sueño-Vigilia Actividad-Reposo Movimientos oculares Componentes en sangre, orina, etc. Temperatura Procesos metabólicos	Apareamiento Desarrollo gonadal Migración Menstruación

Muchas de las funciones de los ritmos biológicos se manifiestan al poner énfasis en sus frecuencias: el pulso mantenido por las células marcapasos del corazón conduce la frecuencia de contracción del órgano como un todo, en un ejemplo de interrelación de ritmos de distinta frecuencia (Eckert, 1990). Un ejemplo espectacular a escala poblacional de acoplamiento de ritmos de frecuencias individuales, es el de la sincronización de la actividad luminiscente de millares de individuos de luciérnagas de la especie *Pteroptyx cribellata*.

### 1.2 El sistema circadiano

La ocurrencia de ritmos en situación de aislamiento, separados de sus influencias externas, permite suponer la existencia de procesos biológicos con funciones marcapasos, lo que es denominado como *reloj biológico*. Una primera forma de estudiar las propiedades de éste hipotético reloj es a través de su salida, es decir, caracterizando los ritmos bioquímicos, fisiológicos y conductuales que regula. Hemos mencionado ritmos de frecuencia y períodos



---

variados, pero los relojes más estudiados por su obviedad son los circadianos, que miden el período de rotación de la Tierra sobre su eje. Ya en el año 1960, Colin Pittendrigh resumió muchas de las propiedades básicas de dichos relojes (Pittendrigh, 1960):

- 1- los ritmos circadianos (RC) se definen como aquellos ritmos biológicos cuyo  $\tau$  *SE APROXIMA AL PERIODO DE ROTACION DE LA TIERRA*.
- 2- los RCs son *UBICUOS* en los sistemas vivientes.
- 3- los RCs son *ENDÓGENOS* en los sistemas vivientes.
- 4- los RCs son *OSCILACIONES AUTO-SOSTENIDAS*.
- 5- los RCs son *INNATOS*.
- 6- los RCs se producen de forma autónoma en *TODOS LOS NIVELES DE ORGANIZACION* de un organismo.
- 7- el  $\tau$  se caracteriza por una muy pequeña variación en la secuencia de ciclos en aislamiento; el sistema subyacente despliega una gran *PRECISIÓN*.
- 8- el  $\tau$  no es una característica fija e inalterable de un organismo; es susceptible a cambios espontáneos e inducidos dentro de un rango de valores característico.
- 9- algunas especies difieren claramente de otras en sus rangos de  $\tau$  (nocturnas, diurnas, etc.).
- 10- el  $\tau$  puede mostrar la historia previa de sincronización, o *POST-EFECTO* del *zeitgeber*.
- 11- el  $\tau$  es prácticamente *INDEPENDIENTE DE LA TEMPERATURA*, es decir, compensa sus variaciones ( $1.2 > Q_{10} > 0.9$ ).
- 12- el  $\tau$  es *DEPENDIENTE DE LA INTENSIDAD LUMINICA* (Reglas de Aschoff:  $\tau_{LL} > \tau_{OO}$  en animales nocturnos,  $\tau_{LL} < \tau_{OO}$  en animales diurnos).
- 13- los RC son *SINCRONIZABLES* ( $T=\tau$ ) por una *CONJUNTO RESTRINGIDO DE PERIODICIDADES AMBIENTALES*, en especial por el ciclo LO, existiendo rangos de sincronización característicos de las especies; en general las especies "más complejas" tienen rangos más estrechos.
- 14- la fase ( $\phi$ ) de los RC puede ser *MODIFICADA POR UNA PERTURBACION DISCRETA* del *zeitgeber* externo.
- 15- el alcance de un nuevo estado estacionario, luego de un cambio de fase del *zeitgeber*, siempre es precedido por reajustes *TRANSITORIOS* o graduales del  $\tau$ .

Algunos autores como Pittendrigh ó Aschoff propusieron la existencia de estructuras orgánicas de localización anatómica específica, que funcionarían como marcapasos capaces de imponer período y fase a los procesos orgánicos. Para otros más “emergentistas”, como Halberg ó Reinberg, las propiedades que definen al reloj biológico son el resultado de múltiples procesos fisiológicos oscilatorios que ajustan sus fases (Aschoff, 1960; Pittendrigh, 1960; Halberg, 1960). Actualmente se impone claramente la visión reduccionista, que busca el *locus* anatómico y los mecanismos fisiológicos del reloj, y que ha producido una vasta evidencia experimental sobre la existencia concreta de mecanismos de temporización, desde organismos unicelulares hasta plantas y metazoos.

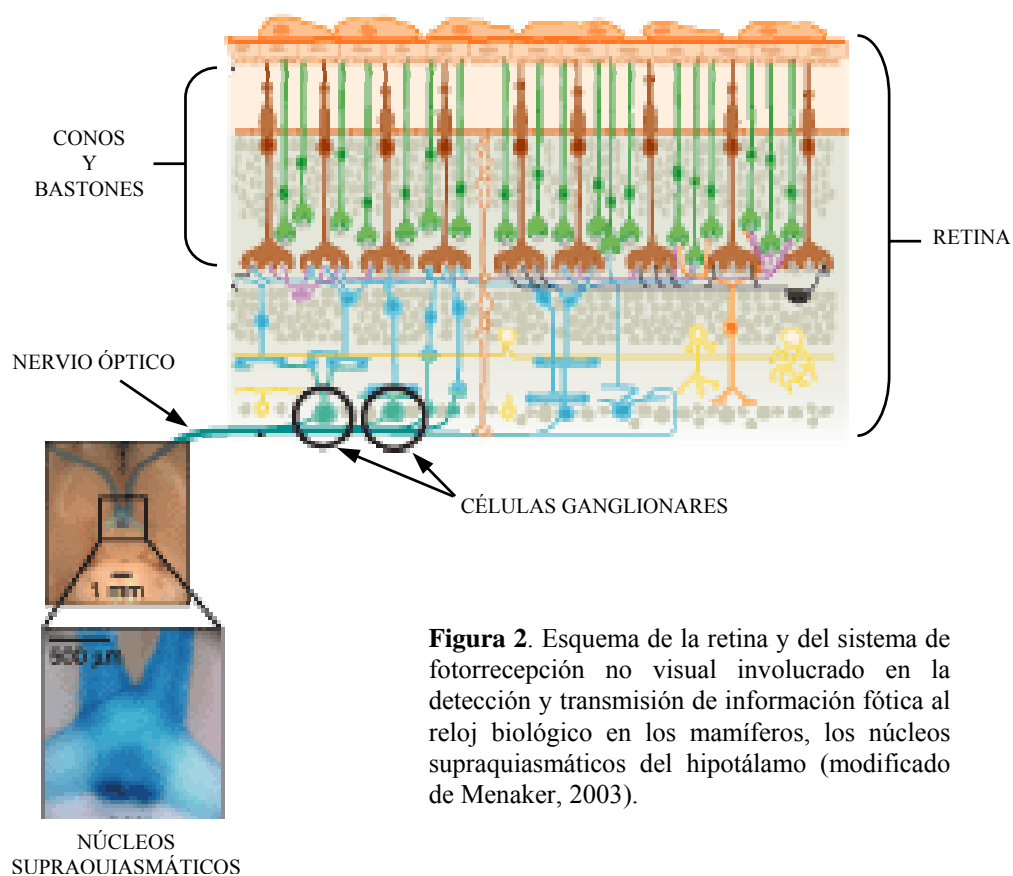
El reloj es capaz de generar ritmos en aislamiento, pero el valor adaptativo de su funcionamiento reside en su capacidad de sincronizarse con los ciclos ambientales, acoplando su oscilación con las funciones orgánicas de manera que éstas se presenten en armonía entre sí y con el ambiente. Así, los ritmos biológicos hallados en la naturaleza son el resultado de un reloj endógeno que ha sido "puesto en hora" por claves temporales del ambiente. Por ahora, cuando se hable de sincronización se referirá simplemente al ajuste del período y/o de la fase (cambio en las agujas) del reloj, sin entrar en los detalles del propio proceso.

El *sistema circadiano*, está compuesto por un sistema fotorreceptor, por las vías aferentes que llevan información del *zeitgeber* exógeno, el reloj, que elabora un código neuroendócrino de dicha información, y las vías eferentes que conducen esta información para el control temporal de los sistemas efectores, interactúan para generar los ritmos manifiestos en los organismos.

### **1.2.1. Fotorrecepción y vías aferentes**

El *zeitgeber* ambiental más estable en período y fase, y por ende más predecible es el ciclo diario de LO. La luz es percibida por el sistema circadiano mediante un sistema fotorreceptor, o “de detección de irradiancia” como se lo denomina actualmente. Éste fue hallado primeramente en vertebrados no mamíferos, como peces, anfibios, reptiles y aves. En éstos, existen células fotorreceptoras circadianas especializadas localizadas en distintos lugares del cerebro, que responden directamente a la luz que penetra a través de cráneo (Menaker,

2003). Quizás por compartir un ancestro común nocturno, en los mamíferos los ojos son necesarios para la sincronización con el ciclo LO. Actualmente se sabe que la información fótica necesaria para el sistema circadiano de los mamíferos es detectada por pigmentos fotorreceptores específicos de la familia de las opsinas, localizados en un pequeño conjunto de células ganglionares de la retina (Berson y col, 2002). La conexión anatómica y fisiológica con el reloj es el tracto retino-hipotalámico (TRH), descrito en el año 1972 (Moore y Lenn, 1972), un haz de fibras nerviosas localizado en el nervio óptico que está presente en los mamíferos (Johnson y col. 1988). Los axones de éstas células se conducen por el TRH, haciendo sinapsis principalmente mediante la liberación de glutamato y de neuromoduladores como la sustancia P, con grupos de neuronas con actividad neurosecretora localizadas en el hipotálamo, llamados núcleos supraquiasmáticos (NSQ) (Moore, 1983) (Figura 2). Podemos referirnos también a Julio Cortázar, pionero de la Cronobiología, quien visionariamente propuso que “...el tiempo entra por los ojos. Eso lo sabe cualquiera.” (Cortázar, 1960).



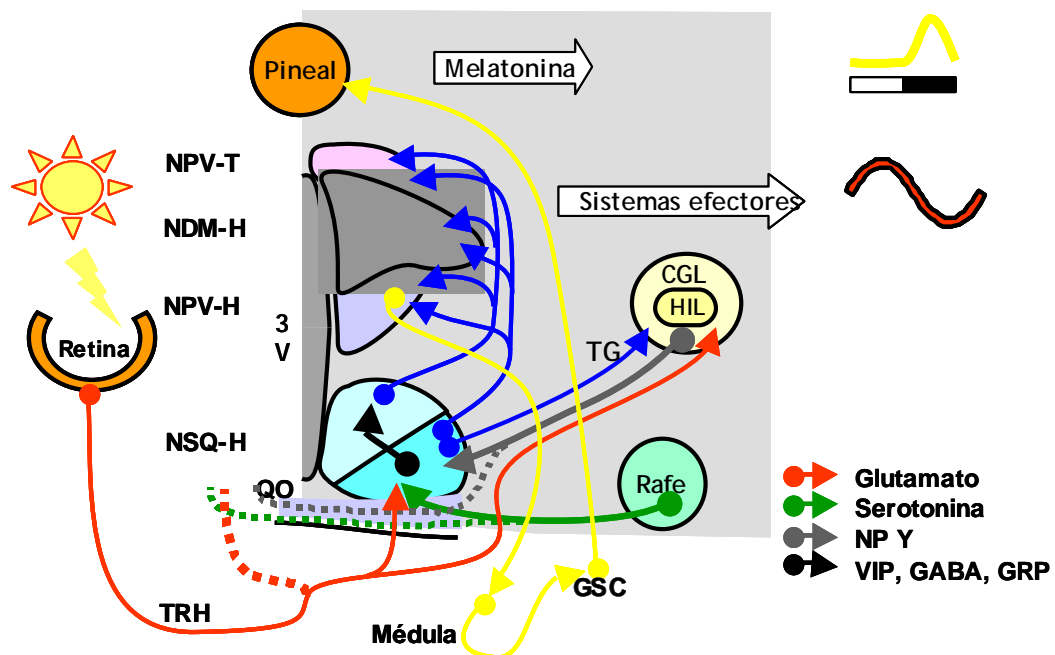
**Figura 2.** Esquema de la retina y del sistema de fotorrecepción no visual involucrado en la detección y transmisión de información fótica al reloj biológico en los mamíferos, los núcleos supraquiasmáticos del hipotálamo (modificado de Menaker, 2003).

En los organismos epigeos, la luz es el estímulo sincronizador por excelencia para el sistema circadiano. Sin embargo, una variedad de fenómenos ambientales cíclicos pueden funcionar como sincronizadores, entre otros la temperatura, la disponibilidad de alimento, las señales de comunicación social y las interacciones interespecíficas (Francis y Coleman, 1988; Boulos, 1980; Mrosovsky, 1989). De importancia en el contexto de esta tesis, la disponibilidad de una rueda de actividad, ya sea presentada de manera novedosa o continua, es un potente estímulo sincronizador en el hámster (Reebs y Mrosovsky, 1989). Estos estímulos son definidos contrafactualmente y de manera colectiva, debido a la importancia de la luz, como “estímulos no-fóticos”. Siendo la fuente de estas perturbaciones aparentemente externa, no se han identificado aún sustratos específicos para la detección de éstos estímulos en el sistema circadiano. De todos modos, se sabe que esta información circadiana es integrada en el cerebro a nivel del tálamo en la hojuela intergeniculada lateral (HIL), que envía aferencias a los NSQ por el tracto geniculohipotalámico (TGH), utilizando al neuropéptido Y (NPY) y al ácido gamma-amino butírico (GABA) como neurotransmisores, y a nivel del cerebro medio en el rafe, cuyas aferencias a los NSQ liberan serotonina. Más que ser estímulos conducidos por vías específicas, la propia activación motora (estado conocido como *arousal*) inducida por la presencia de los estímulos no-fóticos, o la información relacionada con el estado fisiológico y comportamental del organismo, sería la responsable de los efectos sincronizadores sobre el reloj (Yannielli y Harrington, 2004).

### **1.2.2. Las vías eferentes y la salida humoral del reloj**

Los NSQ transducen información temporal de *zeitgebers* ambientales en códigos de naturaleza neural o humoral, los cuales proporcionan la fase de oscilación para los ritmos endógenos. Las proyecciones eferentes del NSQ a diversas regiones del cerebro son bastante similares entre los mamíferos, implicando un control autonómico y neuroendócrino conservado de los ritmos. Muchas de las eferencias son cortas y terminan en los propios NSQ, en el hipotálamo dorsomedial (NDM-H) y en los núcleos paraventriculares (NPV-H). Algunas terminan en otras áreas del hipotálamo incluyendo la region subparaventricular, las áreas preópticas, supraópticas y lateral, y en zonas del tálamo como el núcleo paraventricular (NPV-T) (Moore, 1983). Estas regiones del hipotálamo pueden influir directamente en

funciones endócrinas, como en la secreción de cortisol resultado de la variación cíclica de su factor liberador hipotalámico (Weitzmann, 1971), o mediante conexiones multisinápticas como la liberación de hormonas hipofisarias y de la hormona melatonina, sintetizada y liberada a la circulación por la glándula pineal durante la noche (Goldman, 1983). Las señales de los NSQ *via* sus eferencias en los NPV-H, pueden participar en el control circadiano de las funciones simpáticas y parasimpáticas controladas por los centros autónomos medulares y del tronco encefálico (Panda y col., 2004).



**Figura 3.** Esquema de la mitad izquierda del cerebro, mostrando las proyecciones hacia los NSQ y las enviadas por éste a otras estructuras. QO: quiasma óptico; 3V: tercer ventrículo; CGL: cuerpo geniculado lateral.

Cabe destacar que este escenario es mucho más complejo, y que distintas regiones del cerebro también exhiben expresión rítmica en su actividad neural (Abe y col., 2002). Además, en los últimos años se han descubierto que distintos tejidos del organismo presentan oscilaciones autosostenidas (osciladores periféricos), que contribuyen a la regulación circadiana del organismo (Schibler y Sassone-Corsi, 2002). El estudio de estos osciladores y de sus interacciones con los NSQ constituyen una importante línea de investigación en la actualidad.

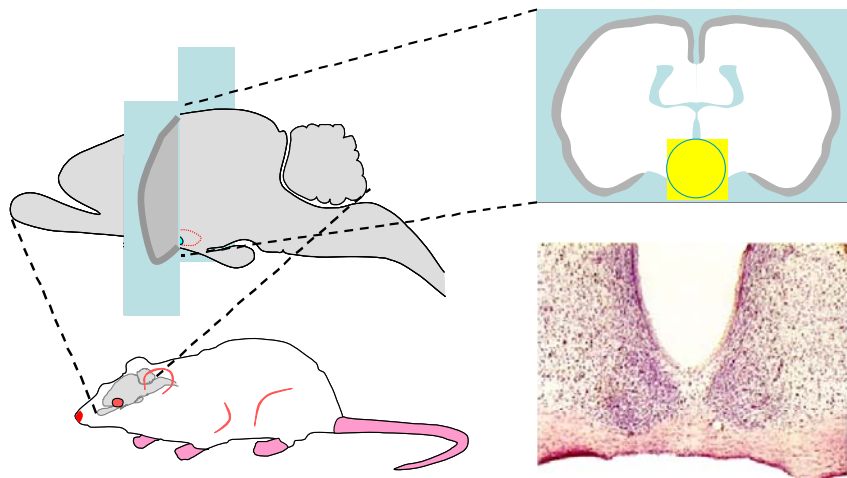
Los NSQ también tienen una importante actividad neurosecretora, liberando factores humorales a la circulación sanguínea. Se ha demostrado que el control del ritmo de actividad locomotora depende principalmente de ellos (Silver y col., 1996), algunos de los cuales como el factor de crecimiento tumoral  $\alpha$  (Kramer y col., 2001) y la prokineticina 2 (Cheng y col., 2002) están identificados. La rápida recuperación de la ritmicidad en animales lesionados con trasplantes de los NSQ dentro de cápsulas poliméricas, demuestran la comunicación humoral entre el reloj y los ritmos. Esto es así debido a que los procesos de desarrollo neural necesarios para restablecer la conexión anatómica perdida en la lesión serían más lentos, y a que el polímero permite el pasaje de sustancias que alcanzan la circulación sanguínea, pero impide el crecimiento neurítico. Sin embargo, se pierden por completo las funciones rítmicas neuroendocrinas, como la liberación de hormonas hipofisarias, que parecen requerir de las proyecciones neurales intactas de los NSQ.

### **1.2.3. Los NSQ: el reloj biológico en los mamíferos**

Aceptada la idea de la ritmicidad como resultado de un mecanismo endógeno, comenzó la búsqueda de relojes en los organismos vivientes por los investigadores, los denominados “clockwatchers” en la jerga cronobiológica. Se hallaron a distintos niveles de complejidad funcional, elementos que cumplen con los requisitos de un reloj biológico: a nivel molecular, el gen *Per* en *Drosophila melanogaster*, a nivel celular y sistémico, el ganglio cerebral en la polilla, los ojos en el molusco *Bulla* sp (Hardin y Siiwicky, 1995; Block y col., 1995). En los mamíferos como la rata, la lesión de áreas del hipotálamo (Stephan y Zucker, 1972) produjo la pérdida de diversos ritmos como el de actividad y bebida. Fue posible comenzar a identificar al reloj biológico como una entidad anatómica diferenciable y con una localización precisa en el hipotálamo (Moore y Eichler, 1972). En hámsteres, la lesión o la ablación de los NSQ provocaba la desaparición de los ritmos circadianos de secreción hormonal, actividad locomotora y bebida, entre otros. Luego, trasplantes de tejido hipotalámico fetal o neonatal conteniendo los NSQ, realizado sobre animales previamente lesionados, produjeron la reaparición de los ritmos (Ralph y Lehman, 1991), pero esto aún no aportaba evidencias suficientes.

La demostración definitiva de que los ritmos eran consecuencia de la actividad de los NSQ se produjo cuando los experimentos de lesión y trasplante se realizaron con hámsteres mutantes, que expresaban períodos de libre curso considerablemente distintos a los salvajes, y que eran portadores de una mutación puntual. Los experimentos consistieron en lesionar los NSQ de hámsteres normales ( $\tau \approx 24$  hs.) y mutantes ( $\tau \approx 20$  o  $22$  hs.), y realizarles trasplantes de genotipo distinto: el período del ritmo resultante correspondió al del animal donador y no al del hospedador (Ralph y Lehman, 1991). De este modo, al transferirse no sólo la ritmicidad sino una característica específica de ella como el período, quedaba confirmada la función de reloj en los NSQ de los mamíferos.

Los NSQ son dos estructuras ovales localizadas en la base del hipotálamo, dorsales al tercio caudal del quiasma óptico y ventrolaterales al tercer ventrículo. Cada uno de los núcleos está constituido por cerca de 10.000 células y un volumen total de  $0,068 \text{ mm}^3$  (Moore, 1983).

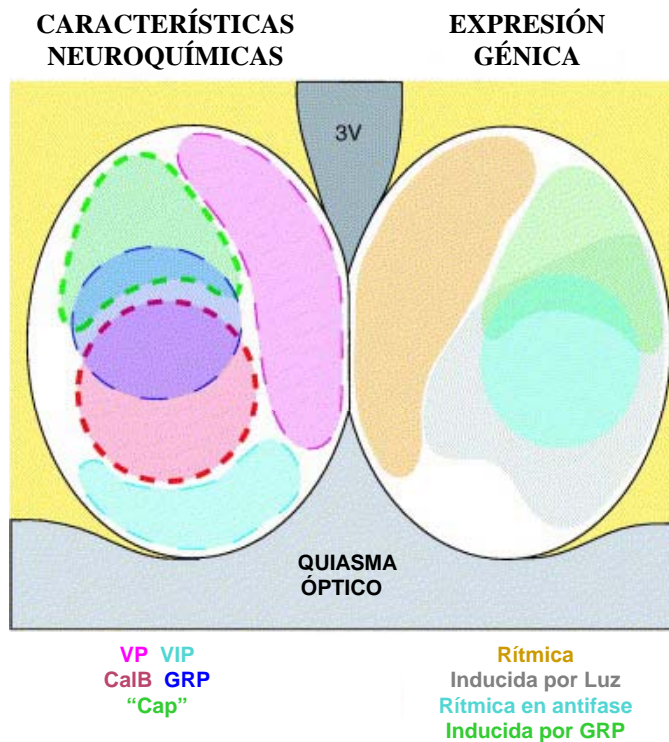


**Figura 4.** Esquema de corte transversal del cerebro de la rata y la localización de los NSQ. La fotografía muestra un corte histológico con tinción de Nissl.

Se sabe que ciertas neuronas de los NSQ exhiben de manera autosostenida ritmos circadianos de actividad eléctrica (Gillette y Reppert, 1987). El aislamiento de mutantes con fenotipos rítmicos alterados permitió la clonación de diversos genes y el aislamiento del mecanismo intracelular que controla la oscilación (Reppert y Weaver, 2002). Este reloj molecular está muy bien conocido y consta de tres sistemas de expresión genética acoplados: 1) un elemento negativo, en el cual la transcripción de un conjunto de genes críticos (*Per1*, *2*, *3*, *Cry1*, *2*, *Rev-Erb $\alpha$* ) es promovida por un heterodímero proteico Bmal1/Clock, e inhibida por la acumulación en el núcleo de los productos proteicos Per y Cry acoplejados, cerrando un bucle de retroalimentación negativa que ocurre cada 24 hs.; 2) un elemento positivo, en el cual la expresión de *Rev-Erb $\alpha$*  regula negativamente a *Bmal1* de manera que éste se desinhibe en antiphase al pico de Per y Cry, realimentando nuevamente el ciclo; 3) un sistema de genes controlados por el reloj que participan en la regulación de los ritmos celulares.

Una característica principal de los NSQ es su compartimentalización en dos regiones inicialmente distinguidas por sus patrones de inervación retiniana, y luego por su distinto fenotipo histoquímico: una región ventrolateral o “core” caracterizada por la presencia del péptido vasoactivo intestinal (VIP), y una región dorsomedial y rostral o “shell”, que presenta neuronas con una alta densidad del neuropéptido vasopresina (VP). Las células del “core” reciben inervación directa de la retina, responden a la luz expresando tanto genes reguladores (como c-fos) como propios del mecanismo que controla la fase del reloj (*Per1* y *Per2*) y liberando VIP, GABA y péptido liberador de gastrina (GRP) desde sus terminales sinápticas proyectadas hacia la región “shell”. Si bien estas células no presentan ritmos autónomos ni de actividad eléctrica ni en la expresión de genes reloj, presentan un ritmo diario de sensibilidad a la luz y son fundamentales para el mantenimiento de los ritmos del organismo. Por otro lado, las células del “shell” poseen el reloj molecular siendo intrínsecamente rítmicas, y responderían de manera indirecta a la luz por la acción de los neurotransmisores liberados desde la región “core”. Este arreglo neuroanatómico general se ha descrito en varios roedores, aunque con importantes diferencias específicas (Antle y Silver, 2005). Actualmente se sabe que esta organización es bastante más compleja, existiendo además otras subregiones (como células que contienen calbindina, CalB, o GRP) con distintas características bioquímicas y fisiológicas.



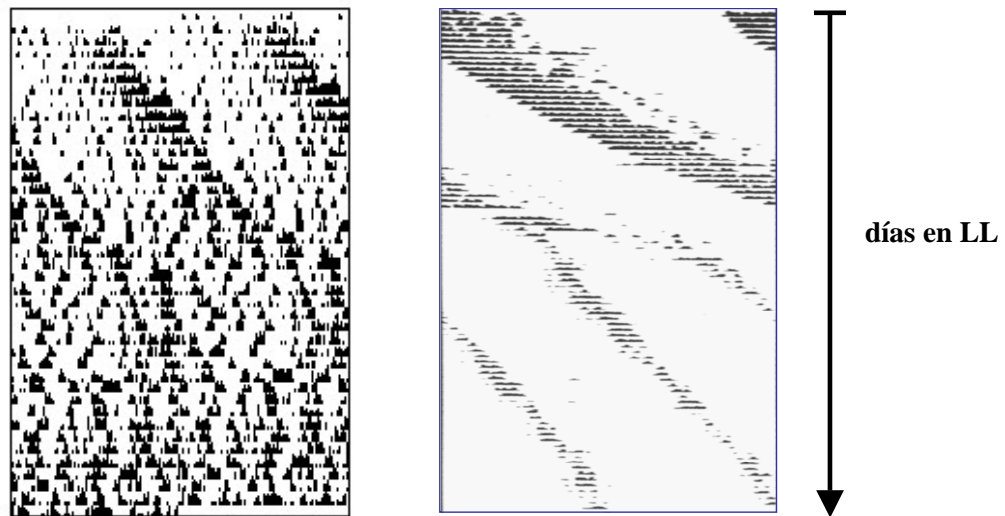


**Figura 5.** Distribución de las distintas poblaciones celulares en los NSQ del hámster. Modificado de Antle y Silver, 2005.

### 1.3. El reloj como un sistema multioscilariorio

Mucho antes de haberse dilucidado el mecanismo molecular del reloj, se mantenía la idea de que éste último estaba constituido funcionalmente por diversos osciladores. En experimentos con humanos en aislamiento, se observó que podían presentarse simultáneamente ritmos con distintos períodos en curso libre produciéndose una *desincronización espontánea* (Aschoff y Wever, 1976). Estos cambios en la relación de fases interna fueron descritos para varios ritmos, sugiriéndose que el sistema circadiano es multioscilariorio, de arreglo jerárquico, y depende de varios osciladores que controlan a los distintos ritmos cambiando su relación de fases de acuerdo a las condiciones de sincronización (Wever, 1979). Estos modelos clásicos propuestos inicialmente por Jürgen Aschoff, resultan hoy de gran utilidad para los estudios cronobiológicos en humanos y sus aplicaciones biomédicas.

En los roedores nocturnos, la presencia de luz constante (LL) induce la pérdida gradual de diversos ritmos circadianos, y en algunos casos la aparición de ritmos de mayor frecuencia o ultradianos (Eastman y Rechtschaffen, 1983; Depres-Brummer y col., 1995). Debido al cierto enfoque físico-matemático de la cronobiología en la época, este estado de arritmicidad fue explicado en los años 60 mediante modelos teóricos de acoplamiento entre múltiples osciladores. En hámsteres, la arritmicidad inducida por LL ha sido descrita como un estado “metaestable” (es decir, sujeto a cambios espontáneos) (Pittendrigh, 1981b). De hecho, en esta especie los efectos LL son bastante más complejos que una mera arritmicidad, y una proporción de los animales sujeta a estas condiciones puede mostrar una partición del ritmo de actividad de 24 hs. en dos componentes manifiestos cada 12 hs., estado conocido como de “splitting”. Estos componentes en general permanecen manteniendo una relación de fase estable, pero pueden cambiar el estado de acoplamiento y volver a manifestar un ritmo único (Pittendrigh and Daan, 1976b; Pittendrigh, 1981b).



**Figura 6.** Ritmo de actividad motora en una rata (A) y en un hámster sometidos a LL. La rata muestra un patrón arrítmico, mientras que en el hámster se manifiesta el fenómeno de “splitting”.

A partir de las regularidades empíricas observadas estudiando ritmos en el hámster, Pittendrigh y Daan desarrollaron un modelo conceptual de alto valor explicativo (Pittendrigh y Daan, 1976b). Consideraron que el reloj circadiano del hámster estaba compuesto por dos osciladores (o grupos principales de ellos) mutuamente acoplados, uno al que denominaron “morning” (M), que es acelerado por la luz y sincroniza con el amanecer, y otro denominado “evening” (E), cuya frecuencia disminuye por la luz y sincroniza con la luz crepuscular. Básicamente, la propiedad fundamental es que estos osciladores pueden adoptar relaciones de fase variables dependiendo de la intensidad de la luz. Además, la interacción particular de ambos osciladores con las transiciones luminosas del amanecer y del crepúsculo, podrían contribuir a medir con precisión el largo del día, y así potenciar la regulación estacional del organismo. Incluso, se observó que el período del sistema cambiaba dada una determinada fuerza de acoplamiento, de acuerdo a la relación de fase entre los componentes. Posteriormente se han descrito algunos correlatos funcionales de este modelo para el ritmo de actividad (Gorman y col., 1997) y de melatonina (Elliott and Tamarkin, 1994).

Sin embargo, éstos investigadores discutían el hecho de que asumir entidades funcionales individuales (el E o el M) era necesario para establecer un modelo general con cierto valor predictivo, pero que siendo parte del sistema nervioso, el sustrato real del reloj debería ser estructuralmente complejo y múltiple. De hecho planteaban la posibilidad de que cada entidad funcional E y M podrían estar formados por múltiples componentes celulares estrechamente acoplados. En relación a la localización de estos osciladores, se halló un posible correlato *in vitro* de la actividad de estos grupos de osciladores E y M en el tejido aislado del NSQ (Jagota y col., 2000). Luego, se propuso que el patrón de “splitting” en la actividad del hámster se debía a oscilaciones en antifase del NSQ izquierdo y del derecho (de la Iglesia y col., 2000). En un experimento reciente, se demostró que los osciladores del “shell” y del “core” funcionarían como dos redes topográficamente separadas constituyendo los osciladores E y M (Yan y col., 2005).

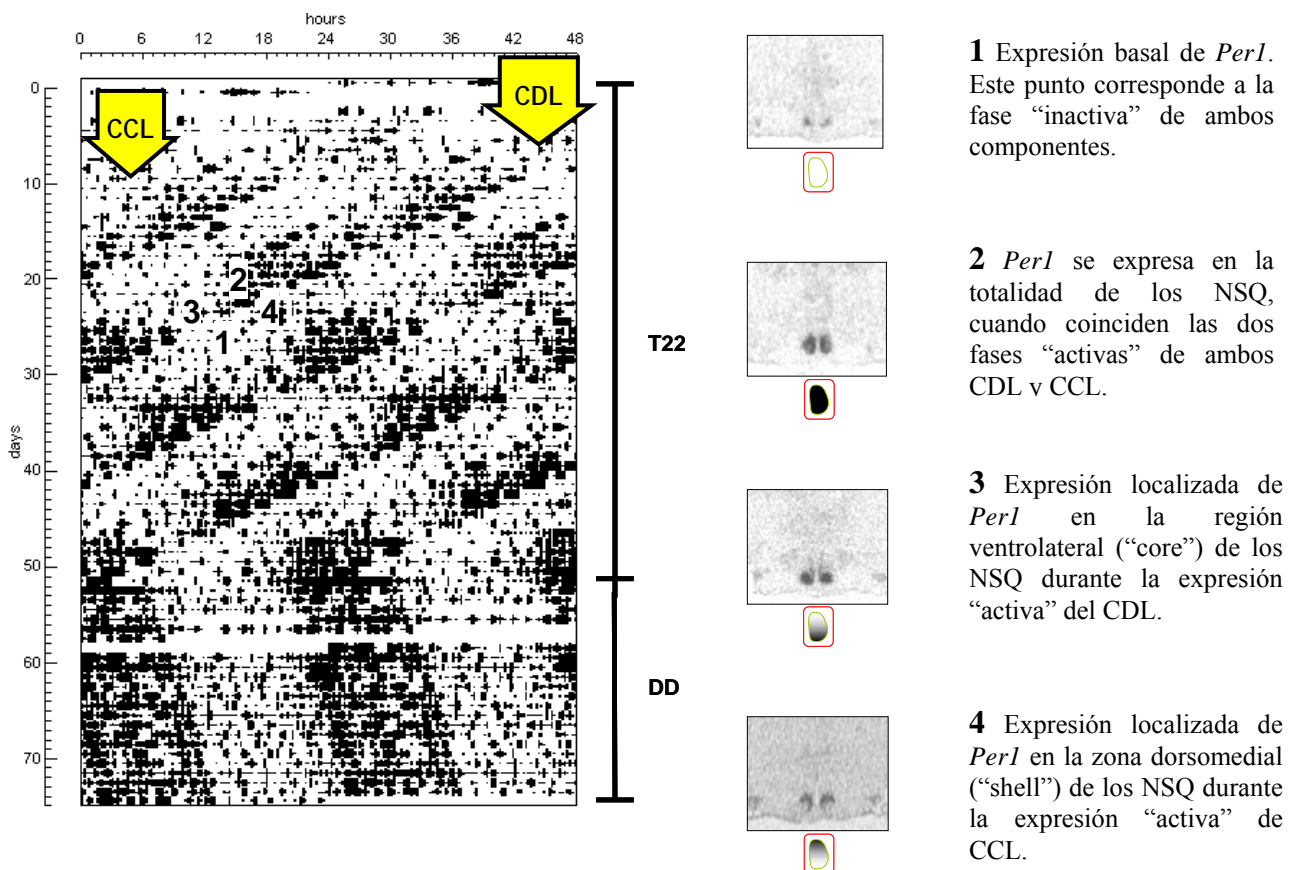
### **1.3.1. El fenómeno de la disociación en la rata**

En el año 1997, estudiando las propiedades del sistema circadiano de la rata en ciclos LO de períodos (T) diferentes a 24 h (denominados ciclos T) el grupo de Barcelona, se

encontró con el hallazgo de un patrón rítmico inesperado. Particularmente, en ciclos T de 22 hs. (T22) y en T23, se observaba que el ritmo de actividad motora se disociaba en dos componentes circadianos: uno manifestando un período de 22 hs. igual al del ciclo T, y otro con un período específico del individuo cercano a 24 hs. (Figura 7). Estos componentes fueron denominados en base a sus períodos, como “componente dependiente de la luz” (CDL), y “componente en curso libre” (CCL) (Vilaplana y col., 1997; Campuzano y col., 1998). La expresión de éstos componentes depende no sólo de la intensidad de la luz, sino también de factores no fóticos como la actividad en la rueda (Cambras y col., 2000). Se hipotetizó que estos factores (mayormente la luz) afectarían el grado de acoplamiento entre los osciladores del sistema circadiano, produciéndose desincronización entre éstos con la consecuente disociación de los ritmos que controlan. Sin embargo, no se conocía la dependencia de este fenómeno de otros factores ambientales como el fotoperíodo, la cual estudiaremos en esta tesis.

El paso siguiente fue intentar encontrar el sustrato neural responsable de la disociación. Evidencias previas mostraban que las divisiones ventrolateral y dorsomedial de los NSQ tenían propiedades circadianas diferentes (Nakamura y col., 2001). Considerando la estructura anatómica y funcional de los NSQ y sus conexiones aferentes y eferentes (Figuras 3 y 5), la posibilidad más evidente era que el CDL fuera controlado por la región que recibe las aferencias de la retina, la ventrolateral o “core”, mientras que al ser independiente de la luz y manifestar una periodicidad espontánea, el CCL sería regulado por la región dorsomedial o “shell”. Se decidió entonces estudiar el patrón temporal de expresión de genes reloj en los NSQ de ratas con disociación de actividad motora en condiciones de T22. Los animales eran sacrificados y sus cerebros extraídos en momentos coincidentes con las distintas fases de la expresión de los dos componentes, donde se define como la fase “activa” de un componente, si se presenta actividad motora (Figura 7). Luego se detectó la expresión de los genes en el tejido mediante técnicas de hibridación *in situ*. Brevemente, la técnica consiste en construir el RNA mensajero en secuencia antisentido, partiendo del fragmento clonado del gen reloj, en este caso *Per1*, *Per2* y *Bmal1*. Este mensajero se transcribe *in vitro* incorporando <sup>35</sup>S, un isótopo radioactivo del azufre. Luego se exponen cortes del tejido conteniendo los NSQ a éstos mensajeros y se revela por autoradiografía. Se halló que la expresión de genes propios del mecanismo molecular del reloj presentaba un patrón espacial y temporal definido en un

animal disociado: 1) cuando ambos componentes manifestaban su fase “inactiva”, la expresión era basal; 2) cuando estaban en fase “activa”, la expresión era alta y abarcaba la totalidad de los NSQ; 3) cuando se expresaba sólo el CDL (en antifase con el CCL), la expresión se limitaba mayormente a la región ventrolateral (“core”) de los NSQ; 4) cuando sólo el CCL se mostraba activo, se daba en la región dorsomedial (“shell”) (de la Iglesia y col., 2004).

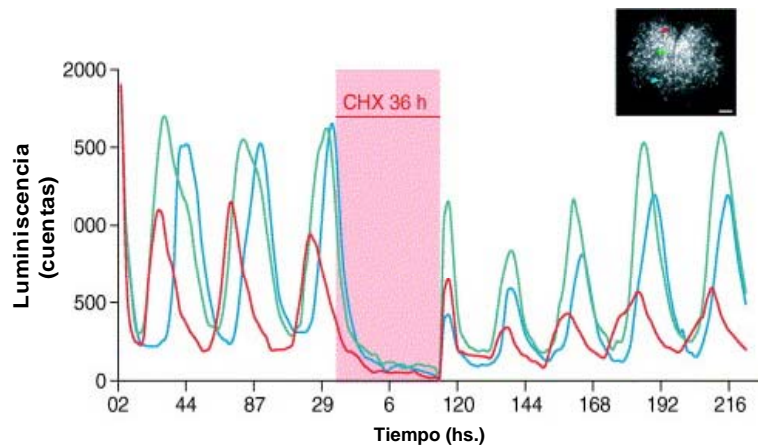


**Figura 7.** Actograma de una rata mostrando la disociación en dos componentes del ritmo de actividad motora: CDL con un período igual a 22 hs, y CCL con un período característico del individuo de  $\approx 24$  hs. El actograma está graficado en 24 hs. Los números indican las distintas fases del patrón en las que se estudió la expresión de genes reloj. Las fotos a la derecha son autoradiografías en las cuales se reveló la expresión de *Per1* (la de *Per2* fue similar). La expresión de genes propios del mecanismo molecular del reloj presenta un patrón espacial y temporal característico en un animal disociado. Este patrón revela que cada componente de actividad es regulado por una región específica de los NSQ: la ventrolateral regula al CDL, la dorsomedial al CCL. Modificado de de la Iglesia y col., 2004.

### 1.3.2. El acoplamiento entre los osciladores

Si bien desde los años 60 ya se hablaba de que el sistema circadiano era multioscilariorio (Aschoff, 1981), pasaron 30 años hasta que las técnicas experimentales permitieron confirmar estas hipótesis. Estudios electrofisiológicos realizados en el tejido hipotalámico aislado conteniendo los NSQ muestran oscilaciones del potencial de membrana de las neuronas, con períodos de alrededor de 24 hs. (Hiroshige y col., 1991). Sin embargo, al registrar la actividad eléctrica de neuronas individuales disgregadas en cultivo, se observó que cada una podía sostener un ritmo circadiano de actividad eléctrica, pero las células se desfasaban entre ellas (Welsh y col., 1995), presentándose una distribución de períodos en la población neuronal (Herzog y col., 1998; Honma y col., 2004). El modelado experimental del reloj molecular presente al nivel de la célula individual, comenzaba a confirmar la idea original de que el reloj biológico, como entidad funcional que regula la fisiología circadiana, es funcionalmente heterogéneo y está constituido por múltiples unidades oscilatorias.

Pero entonces, ¿cómo es posible que el reloj circadiano en los NSQ genere, en condiciones normales, una salida coherente en la escala circadiana a partir de los múltiples períodos de cada neurona individual? Evidentemente es necesario postular la existencia de mecanismos que aseguren el funcionamiento concertado de los NSQ. Mediante ingeniería genética, se diseñó una línea de ratones transgénicos portadores de un constructo formado por el promotor de la transcripción de *Per1*, acoplado al gen de la luciferasa (*mPer1-luc*), que produce luminiscencia cuando se cultiva el tejido con un sustrato adecuado. En cultivos organotípicos (rodajas intactas) de los NSQ mantenidos a largo término, se monitoreó la actividad de el reloj molecular siguiendo estos picos de luminiscencia debidos a la expresión de *Per1*, bajo distintos tratamientos como la presencia en el cultivo de cicloheximida (CHX), un inhibidor de la síntesis de proteínas. Antes del tratamiento con CHX, las células mantuvieron una relación de fase característica y estable, mostrando sincronía. Un tratamiento prolongado con CHX interrumpe la oscilaciones, mientras que al retirar la droga las células comienzan a oscilar inicialmente en la misma fase, alcanzándose de forma gradual la relación de fases previa al tratamiento.



**Figura 8.** Ciclos circadianos sucesivos de actividad del reloj molecular de tres neuronas. En la foto se muestra la localización de éstas neuronas en los NSQ. Modificado de Yamaguchi y col., 2003.

Este hallazgo es muy importante, ya que demuestra que la naturaleza funcional del programa temporal de los NSQ reside no sólo en la capacidad de oscilar de las células, sino más bien en sus interacciones. En este trabajo, se describió también que el ritmo de transcripción de *Per1* muestra un patrón topográficamente específico como una característica inherente de la red de relojes en los NSQ del ratón. Esta organización en red de los relojes celulares es propia de los NSQ, mientras que aún no se ha hallado en aquellos tejidos considerados osciladores periféricos (Yamazaki y col., 2000; Welsh y col., 2004).

Como es de esperar, la naturaleza de ésta sincronización o acoplamiento entre osciladores neuronales, estaría basada en diversos mecanismos de comunicación celular. Utilizando ratones transgénicos deficientes de conexina 36, una proteína mayoritaria de las uniones estrechas, se ha demostrado que la comunicación neural efáptica *via* sinápsis eléctrica (Long y col., 2005) es importante para sincronizar al reloj celular. Además, esta pérdida de acoplamiento tiene un correlato funcional preciso en el ritmo de actividad en rueda de los animales, que se presenta con una gran inestabilidad en la fase diaria. Efectos similares se encontraron al utilizar tetrodotoxina, inhibidor de los potenciales de acción dependientes de  $\text{Na}^+$ , sugiriendo que éstos tienen un rol importante (Honma y col., 2000; Yamaguchi y col., 2003). Como resulta obvio, las sinapsis químicas mediante la liberación de distintos neurotransmisores ya caracterizados en los NSQ como el VIP (Aton y col., 2005) y el GABA

(Liu y Reppert, 2000) también participan de la sincronización neuronal. Cabe destacar que de estos estudios se deduce que no todas las neuronas, sino sólo un grupo reducido de ellas, es importante no sólo para la sincronización sino también para el mantenimiento de la ritmicidad. Además las sinapsis GABAérgicas tendrían un rol importante en la transmisión del ajuste de fase mediado por la luz desde la región ventrolateral a la dorsomedial (Albus y col., 2005).

### **1.3.3. El rol modulador de la luz sobre el acoplamiento**

Es claro que el acoplamiento entre los osciladores neuronales a nivel de los NSQ comienza a dejar de ser una entelequia y pasa a ser considerado un fenómeno básico que determina las propiedades funcionales del sistema circadiano. Se están dando algunos pasos importantes para entender los mecanismos de comunicación celular involucrados en el acoplamiento a nivel de los NSQ, y de estos estudios surgen dos consideraciones: 1) los NSQ son una estructura heterogénea, y esta heterogeneidad es muy importante para determinar las propiedades del reloj, y 2) el acoplamiento depende de un conjunto de factores y mecanismos neurales. Sin embargo, no se tiene aún una idea clara de cómo los diversos factores ambientales que dan información circadiana al reloj afectarían estos mecanismos. Como es evidente, la intensidad lumínica es uno de los más importantes, como fue sugerido inicialmente por Aschoff (1981).

La posibilidad de que la intensidad lumínica module el acoplamiento surge principalmente del efecto tanto de arritmicidad como de patrones ultradianos inducidos por LL, mayormente observado en ritmos de actividad y temperatura en ratas (Eastman y Rechtschaffen, 1983; Depres-Brummer y col., 1995). De hecho, se ha ido más allá y se ha propuesto que la luz podría disminuir el acoplamiento entre los osciladores de los NSQ (Vilaplana y col., 1997). Sin embargo, dada la complejidad del sistema circadiano, esta relación aún no está clara y se supone bastante más compleja. Por ejemplo, la exposición a LL restablece el ritmo circadiano de actividad de ratones mutantes de los genes *Per2* y *clock*, los cuales son arrítmicos en condiciones OO (Spoelstra y col., 2002). Incluso se ha asumido que la exposición a OO podría producir una disminución del acoplamiento entre los osciladores (Oda y col., 2000). Un hallazgo reciente sostiene la posibilidad de que la luz puede disminuir



el acoplamiento entre los osciladores de los NSQ. En ratones con la construcción *mPer1-luc* expuestos a condiciones de LL prolongadas, se halló que las neuronas en cultivo de los NSQ extraídos de los animales que resultaron arrítmicos, mostraron ritmos de bioluminiscencia desincronizados. Por otro lado, los animales que mantuvieron el ritmo de actividad locomotora, mostraron también ritmos neuronales coherentes en cultivo (Ohta y col., 2005). Otras evidencias sostienen que la sincronización del reloj en los NSQ tanto a ciclos continuos de LO (Quintero y col., 2003) como a pulsos cortos de luz (Kuhlman y col., 2003) involucra cambios en el acoplamiento que son dependientes de la intensidad de la luz. De hecho, se ha sugerido que tanto el  $\tau$  de los NSQ como el de los ritmos que controla, podrían estar determinados por el período medio de la población de osciladores celulares, que surge de las propias interacciones entre ellos (Liu et al., 1997; Low-Zeddies and Takahashi, 2001). Como se ha destacado, dada la importancia de la organización en red de los relojes celulares de los NSQ, la modulación de éstos elementos por factores ambientales como la luz, resulta importante para deducir los aspectos funcionales del sistema circadiano.

#### **1.4. Mecanismos de sincronización del reloj**

La sincronía o la calidad de sincrónico (del griego *syn*, con; *chronos*, tiempo) se refiere a la condición en la cual dos o más fenómenos mantienen una relación temporal estable entre sí. En condiciones naturales la ritmicidad biológica no manifiesta su oscilación espontánea, sino que presenta una estrecha relación temporal con el ambiente geofísico. La existencia de mecanismos de sincronización permite el ajuste o adecuación del sistema circadiano con el día solar, el cual presenta cierta variación, y además provee a los organismos de un mecanismo para reconocer la hora local y generar una referencia temporal interna, permitiendo la adecuada interacción en el dominio del tiempo entre el organismo y su ambiente (Pittendrigh, 1981b). Algunos investigadores cuestionan el argumento funcionalista del ajuste “necesario” del período  $\tau$  del reloj ejercido por el ambiente, debido a que la oscilación en curso libre no existe en la naturaleza, y justamente es el ritmo sincronizado el que prevalece (Roenneberg y col., 2003). Sostienen que el reloj es capaz de oscilar en curso libre con un período circadiano ya que ha evolucionado en condiciones de sincronización con el ambiente (de hecho, no existe un valor de  $\tau$  fijo, sino que como veremos, depende de la naturaleza de las condiciones ambientales).

Cualquier sistema puede ser sincronizado con los cambios del ciclo diario ambiental respondiendo pasivamente a alguna transición del mismo, por ejemplo, mediante un temporizador que se active con el atardecer. Es claro que este mecanismo presenta un momento único durante cual el ciclo ambiental y el sistema se sincronizan. Los relojes biológicos, por otro lado, son osciladores autosostenidos que responden de manera específica al ciclo ambiental de acuerdo a las diversas fases del propio ciclo endógeno. Se considera que esta respuesta fase-dependiente es activa, ya que en general el ajuste no es inmediato cuando se impone un *zeitgeber*, lo que sugiere la ocurrencia de cambios en el estado del reloj. Por todo esto, para diferenciarlo de un mero proceso pasivo, al proceso de sincronización entre un reloj biológico y su *zeitgeber* ambiental se lo denomina *entrainment*, término del inglés para cuya traducción al castellano hemos adoptado *encarrilamiento*. El proceso de encarrilamiento puede comenzar a comprenderse básicamente mediante una metáfora muy útil, que es imaginar al oscilador circadiano como un columpio que oscila sostenidamente. Para modificar la fase de la oscilación, tanto la velocidad como la posición del columpio (sus variables de estado), y además considerando la intensidad de la fuerza externa aplicada, resultan factores necesarios que definirán el efecto obtenido sobre la fase. Esto significa que el encarrilamiento es un mecanismo de sincronización que presenta varios grados de libertad, lo cual confiere a los organismos de flexibilidad en el ajuste temporal con el ambiente (Roenneberg y col., 2003).

Los mecanismos de encarrilamiento pueden modelarse en el laboratorio, asumiendo que el efecto de la luz sobre el sistema circadiano es ejercido de manera continua, denominado *encarrilamiento continuo*, o asumiendo que el efecto mayoritario de la luz es puntual, denominado *encarrilamiento discreto*.

#### **1.4.1 Encarrilamiento continuo**

El modelo continuo, propuesto inicialmente por Jürgen Aschoff, asume que el efecto encarrilador de la luz ocurriría por ciclos LO completos, de manera que el *zeitgeber* ejercería una acción continua o tónica sobre la velocidad angular del oscilador. De este modo, los cambios en el  $\tau$  del reloj producidos por las variaciones diarias en la intensidad lumínica

serían los responsables del encarrilamiento al ciclo LO (Aschoff, 1981). El encarrilamiento consiste entonces, en el ajuste realizado por el ciclo ambiental sobre el período  $\tau$  del reloj, hasta alcanzar el del ambiente (T), de tal forma que se produzca el *control del período* del reloj, y el período encarrilado resulte  $\tau^* = T$ .

Este modelo está basado en una de las propiedades básicas del reloj biológico deducida por Jürgen Aschoff, ya que en muchas especies se observó que el  $\tau$  varía continuamente con la intensidad de la luz. Además se observó que esto también dependía de si la especie en consideración era diurna o nocturna. Aschoff propuso reglas empíricas para caracterizar los hábitos de animales de acuerdo a sus ritmos circadianos de actividad en curso libre (aunque existen excepciones), conocidas como las "Reglas de Aschoff" (Aschoff, 1981):

- 1- en los animales de hábitos diurnos:  $\tau_{LL} < \tau_{DD}$ .
- 2- en los animales de hábitos nocturnos:  $\tau_{LL} > \tau_{DD}$ .
- 3- en general,  $\tau$  aumenta con la intensidad de la luz.

Además, se establece una relación temporal (o *ángulo de fase*,  $\Psi_{o,z}$ ) constante entre la fase del ritmo endógeno y la fase del *zeitgeber* ambiental. Como lo indica su notación  $\Psi_{o,z}$  toma valores positivos o negativo en referencia al oscilador biológico: si el *zeitgeber* lo precede es positivo, si lo antecede es negativo. Esta relación de fase depende de la intensidad del estímulo encarrilador y de la relación entre  $\tau$  y T, y ambos factores determinan la *fuerza del zeitgeber*. Como se hace cuando existe algún fenómeno que se halla en función de dos variables, se fija una y se estudia la dependencia con la otra. Entonces, se halló que para una intensidad determinada del sincronizador:

- 1) cuando  $\tau < T$  el ritmo endógeno antecede al ambiental, siendo  $\Psi_{o,z}$  positivo.
- 2) cuando  $\tau > T$  el ritmo endógeno sigue la oscilación más rápida del *zeitgeber*,  $\Psi_{o,z}$  es negativo.
- 3) si  $\Psi_{o,z} = 0$  cuando  $\tau^* = T$ , no puede establecerse el encarrilamiento.

Por otro lado si la intensidad del estímulo encarrilador se disminuye en la proporción de horas de luz o fotoperíodo (p. ej. de LO 50:50 % a 25:75 %), pero manteniendo constante la relación  $\tau/T$ , la relación de fases se incrementa, como si el ciclo LO con sólo un 25% de luz se tratara de un *zeitgeber* "débil". Aschoff propone también que la intensidad del estímulo encarrilador, para un ciclo LO 50:50 %, está determinada por la intensidad de la luz, manteniéndose la misma relación para determinar el ángulo de fase que con el fotoperíodo.

De lo anterior se deduce uno de los principios que permiten demostrar formalmente la existencia de encarrilamiento ante la presencia de un *zeitgeber* determinado: la variación en la fuerza del *zeitgeber* debe producir un cambio en el ángulo de fase definido por la relación  $\tau/T$ , y éste no puede tomar un valor 0.

Diversos estímulos, cuando son presentados de manera cíclica, pueden afectar al organismo directamente sobre sus sistemas efectores de la ritmicidad aunque sin modificar la oscilación del reloj. A este fenómeno descrito por Aschoff se le denomina *enmascaramiento*, y es distinguible del encarrilamiento porque si el ritmo estaba sujeto a enmascaramiento, cuando se lo deja en curso libre muestra un salto súbito retomando la fase que mantenía previamente a la presencia del aparente estímulo encarrilador (Aschoff, 1981). De hecho este efecto sobre el ritmo se denomina enmascaramiento ya que se consideraba que la verdadera fase del oscilador quedaba "oculta" por el estímulo ambiental. Entonces, otra de las características del encarrilamiento es la existencia del *control de la fase* del reloj por el *zeitgeber*. Otra manera de evidenciar el enmascaramiento sería obtener un  $\Psi_{o,z} = 0$ , que indicaría la respuesta temporal directa del ritmo a la presencia del estímulo.

También es característico del proceso de encarrilamiento el hecho de que luego de un cambio súbito en la fase del estímulo sincronizador, el período del ritmo cambia gradualmente en forma transitoria (a estos cambios se los denomina *transitorios*) perdiéndose así la relación de fase estable que había sido adquirida previamente con el *zeitgeber*, hasta que se restablece una relación de fase alcanzándose un nuevo *estado estacionario*.

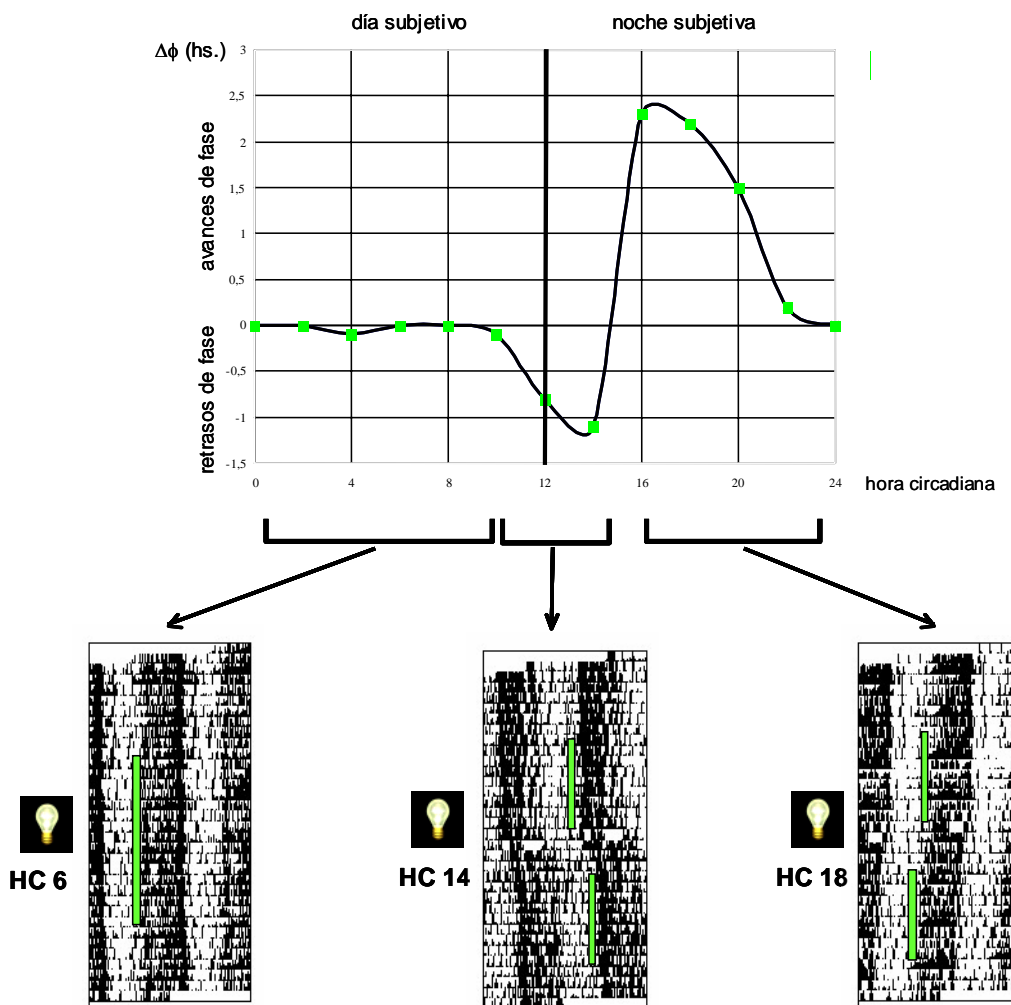
### 1.4.2. Encarrilamiento discreto

En el modelo discreto se asume que el efecto principal de la luz se ejerce por transiciones lumínicas cortas (pulsos de luz) administradas en determinados momentos del ciclo circadiano. Para ello, se asume que  $\tau$  es una constante del reloj, y su ajuste con el período del *zeitgeber* ocurre mediante cambios en la fase del reloj inducidos por pulsos fóticos (Pittendrigh, 1981a). Colin Pittendrigh propone que el estímulo sincronizador puede ser *discreto*, hallando ritmos circadianos de eclosión de larvas en *Drosophila pseudoobscura* susceptibles de ser sincronizados tanto por un fotoperíodo prolongado como por pulsos de luz, planteándose si la acción de un fotoperíodo "natural" (p.ej., un "pulso" de 12 hs.) es de naturaleza continua, discreta, o una mezcla de ambas. De hecho, este modelo es asumido principalmente para organismos nocturnos como el hámster, en los cuales el rol de las transiciones luminosas del crepúsculo o el amanecer puede ser importante. Además, describe el encarrilamiento por medio de un *fotoperíodo esqueleto*, en el cual un ritmo en curso libre puede encarrilarse proporcionando dos pulsos cortos de luz, separados por una distancia de tiempo correspondiente a un fotoperíodo completo ( $< 11$  horas), de manera que su efecto neto resulta la suma de dos de los efectos discretos asociados con su comienzo y su final.

Continuando con su análisis sobre los efectos discretos de la luz sobre el reloj, Pittendrigh caracterizó la respuesta de fase de ritmos en oscilación espontánea ante pulsos de luz de 15 min. administrados en diferentes fases sucesivas del ritmo circadiano. Los resultados obtenidos se representan como cambios de fase ( $\Delta\phi$ ) en función del tiempo o la hora circadiana (una HC =  $1/24 \tau$ ), en una gráfica denominada *Curva de Respuesta de Fase* (CRF), que en este caso por ser una respuesta a la luz es una curva de respuestas de fase fótica. Para construir una CRF, el período circadiano del organismo se divide en dos partes iguales:

- el *día subjetivo*, o el lapso de tiempo que correspondería a cuando el animal está expuesto a la luz en condiciones naturales (por convención, entre las 0 y las 12 HC).
- la *noche subjetiva*, lapso en el cual el animal en condiciones naturales se encuentra en oscuridad (por convención, entre las 12 y las 24 HC).

La CRF fónica se caracteriza por una región relativamente refractaria al estímulo sincronizador, que ocurre durante el día subjetivo. Generalmente se presentan retrasos de fase al final del día subjetivo y comienzo de la noche subjetiva, y adelantos de fase durante la segunda mitad de la noche subjetiva (Figura 9). Puede destacarse entonces que los períodos de eficacia luminosa se encuentran hacia las transiciones luz-oscuridad u oscuridad-luz, como si los organismos fueran más sensibles para "interpretar" la información del *zeitgeber* durante el alba y el crepúsculo.



**Figura 9.** Curva de respuesta de fase del ritmo de actividad motora de la rata a pulsos de luz. Los pulsos son aplicados en las distintas fases del ciclo circadiano u horas circadianas (HC), representadas en el eje de las abscisas. Los cambios de fase se representan en el eje de las ordenadas, los avances son positivos, mientras que los retrasos negativos. HC 12 divide al ciclo circadiano en dos partes, día subjetivo y noche subjetiva. Las barras verdes en los actogramas indican la fase estable del ritmo obtenida antes y después de la aplicación del pulso de luz.

El estudio de CRF a distintos agentes ambientales, físicos, químicos o biológicos, proporcionó las siguientes leyes:

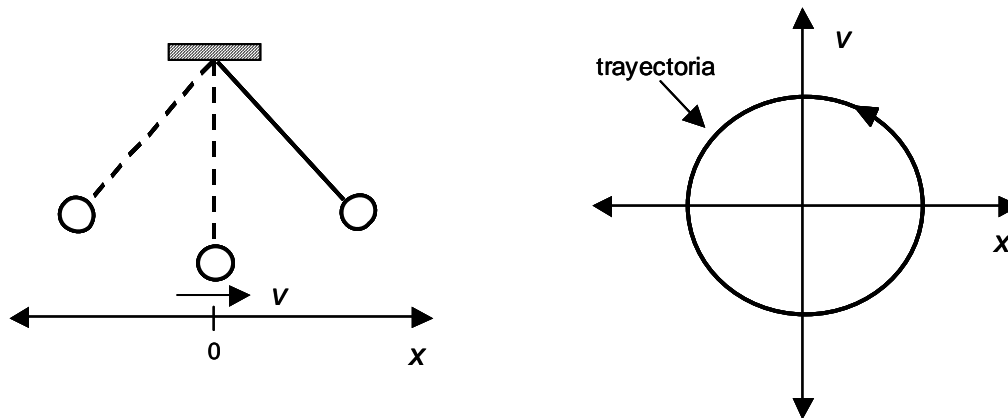
- 1- las CRF son universales, están presentes en todos los seres vivos. Esto sugiere que el origen de los osciladores circadianos fue un evento muy temprano en la evolución.
- 2- Son similares en un animal de hábitos nocturno o diurno.
- 3- Muestran diferencias intra e interespecíficas en cuanto a la magnitud de los cambios de fase.
- 4- Son asimétricas, es decir, en ciertas especies los avances pueden predominar sobre los retrasos y viceversa.
- 5- las CRF fóticas dependen de la intensidad del estímulo luminoso aplicado.
- 6- los retardos de fase pueden manifestarse inmediatamente, mientras que los adelantos de fase se manifiestan al cabo de unos días.

Si bien la interacción del sistema circadiano con el ambiente ha demostrado ser compleja, las CRFs tienen un cierto valor predictivo, ya que de acuerdo a la amplitud observada para un estímulo característico, permiten establecer el máximo cambio de fase que puede obtenerse. Entonces, asumiendo que el reloj mantiene un  $\tau$  constante y que encarrila utilizando las transiciones lumínicas del ciclo LO, el *rango de encarrilamiento* puede estimarse como  $T = \tau \pm \Delta\phi$  máximo (Pittendrigh, 1981a). Además, es importante destacar que el modelo discreto de encarrilamiento puede integrarse con el continuo, si se considera a la CRF como una curva de respuesta de velocidad, entendiendo los cambios de fase como consecuencia de cambios continuos en la velocidad angular del reloj (Johnson y col., 2003).

### **1.5. El sistema circadiano como un sistema dinámico**

Un sistema físico o biológico puede adquirir una representación funcional desde la perspectiva de la teoría de sistemas dinámicos. Básicamente, consiste en representar en un plano cartesiano el estado funcional del sistema a partir de sus *variables de estado*, es decir el conjunto de variables que están involucradas en sus cambios. El modelado de un sistema dinámico requiere entonces de un conjunto de ecuaciones diferenciales para obtener los cambios temporales del sistema. Por ejemplo, un péndulo simple sin rozamiento puede ser

representado como un sistema dinámico en un *plano de estados*, mediante sus variables de estado, la posición y la velocidad.

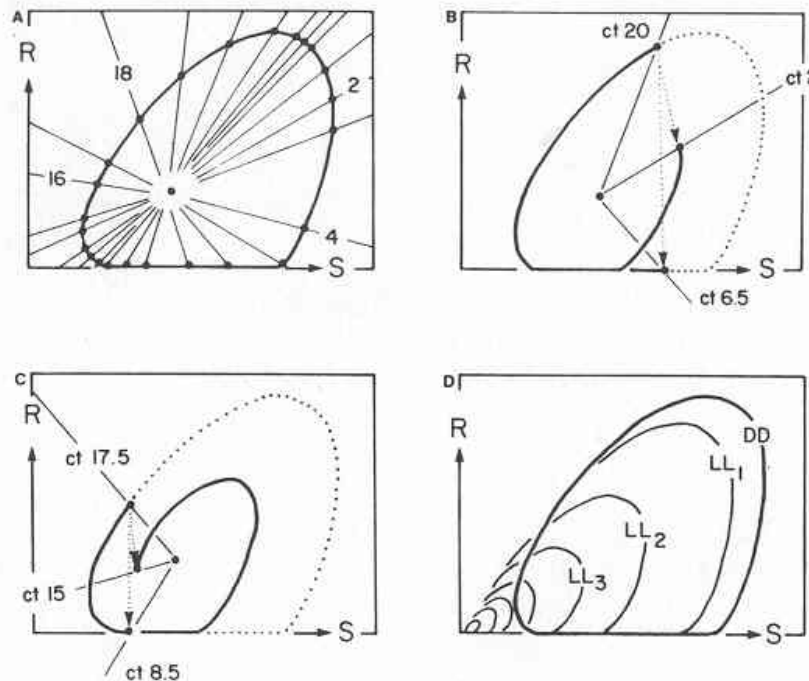


**Figura 10.** Representación de un sistema físico como un sistema dinámico. La posición ( $x$ ) y la velocidad ( $v$ ) definen el estado del sistema ( $x, y$ ). La sucesión de estados en el tiempo definen una trayectoria, la cual en el caso de un péndulo sin rozamiento es un círculo.

Si el sistema oscila de manera autosostenida manteniendo el período, cualquier perturbación puntual modificará la trayectoria transitoriamente, pero el sistema retornará (o será atraído) a la original a la cual tiende espontáneamente, su *ciclo límite*.

Como se ha mencionado, el reloj biológico presenta un conjunto de propiedades altamente conservadas, lo que ha permitido modelar su funcionamiento considerándolo como un oscilador físico. Investigadores como Winfree (1971), Pavlidis (1981) o Pittendrigh (1981a) integraron los hallazgos empíricos en modelos dinámicos del reloj, proporcionando un marco conceptual para comprender sus propiedades funcionales. Winfree propuso que los relojes biológicos se comportaban como ciclos límite, explicando los cambios observados en las CRFs. Los pulsos de luz podían modificar el estado del reloj, afectándose o no su fase. Para ello, introdujo el concepto de *isocrona*: si el estado del sistema es desplazado fuera de su ciclo límite, eventualmente retornará a él en alguna fase determinada. El conjunto de puntos del plano que retornan a una misma fase del ciclo límite, se los denomina isocrona. Este concepto es muy importante considerando la CRF, ya que cada fase del ciclo circadiano (HC) corresponde con una isocrona. De este modo es posible modelar la CRF, utilizando un *plano de fases*.



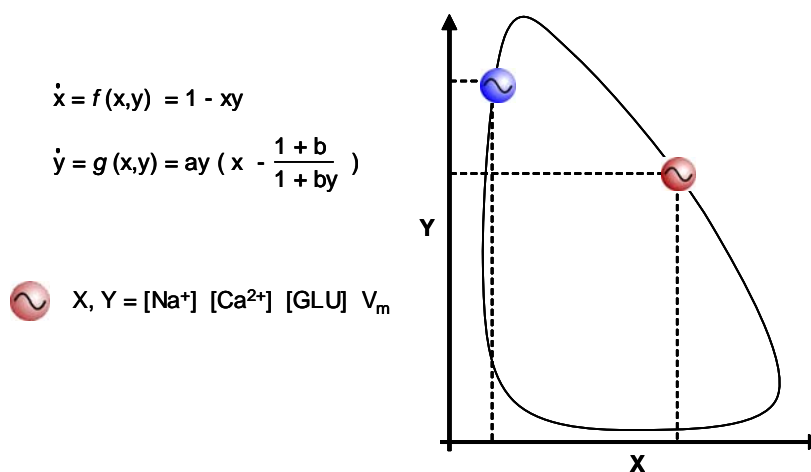


**Figura 11.** Plano de fases representando el reloj de *Drosophila pseudoobscura*, tomando las ecuaciones de Pavlidis (1973) para dos variables de estado, R y S. **A-** Estado estacionario en OO, las líneas representan isocronas que intersectan el ciclo límite a distintas HCs. La intersección de las isocronas en el interior del ciclo es la *singularidad* del sistema. **B-** Un pulso de luz aplicado en HC 20 produce un avance de fase hacia HC 2, el cual es mayor con un pulso de mayor intensidad. **C-** Un pulso en HC 17.5 modifica el sistema hacia isocronas previas produciendo un retraso de fase. Modificado de Pittendrigh (1981a). **D-** En LL de intensidad creciente, el sistema es perturbado continuamente, alejándose del ciclo límite hacia su

Más que un conjunto de abstracciones matemáticas, un modelo es la representación formal de un conjunto de hipótesis sobre el funcionamiento de un sistema. Un buen modelo debe reunir dos características esenciales: 1) debe resumir la evidencia experimental disponible, y 2) debe tener la capacidad de predecir el funcionamiento del sistema en circunstancias novedosas (Pavlidis, 1981). Los modelos previamente descritos reúnen satisfactoriamente estas características, ya que no sólo reúnen hipótesis sobre los mecanismos de encarrilamiento de los relojes biológicos, sino que han demostrado predicciones funcionales de exquisito valor conceptual. Son un ejemplo los trabajos de Winfree para demostrar la existencia de la singularidad del reloj de *Drosophila*, obteniéndose patrones de arritmicidad mediante pulsos únicos administrados en torno a esta fase (Winfree, 1971).

### 1.6. El modelo de Barcelona: una hipótesis sobre el sistema circadiano

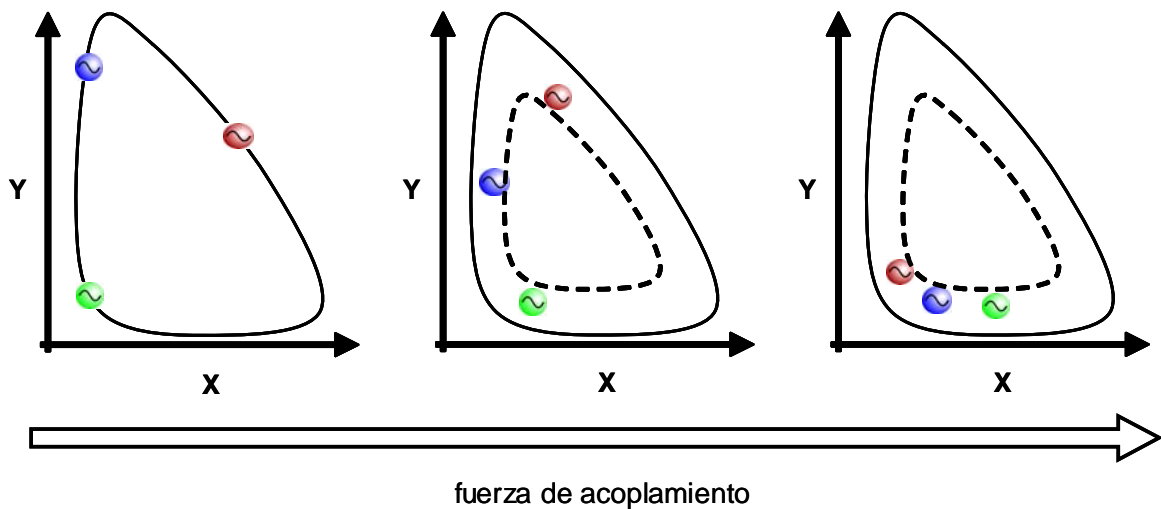
Basándose en la idea del reloj como un sistema multioscilar, el grupo de Cronobiología de la Universidad de Barcelona ha desarrollado un modelo teórico del sistema circadiano, denominado como el "Modelo de Barcelona" por Colin Pittendrigh. El modelo resume diversas hipótesis acumuladas por la evidencia empírica actual acerca del funcionamiento del sistema. Básicamente, está definido como una población de osciladores (representando a neuronas o grupos de neuronas) con una distribución de velocidades angulares. Cada oscilador es descrito por dos ecuaciones diferenciales, definiendo un ciclo límite en el plano de estados. En esta introducción se describirán las características más importantes del modelo, mientras que sus detalles han sido explicitados en Díez-Noguera (1994).



**Figura 12.** Representación del modelo de Barcelona, un sistema de múltiples osciladores ciclo límite. La dinámica del oscilador está descrita por dos ecuaciones diferenciales (en este caso el sistema Selkov). El correlato real del oscilador es un conjunto de variables fisiológicas, como las concentraciones de algún ion involucrado en las propiedades eléctricas de la membrana neuronal (Na<sup>+</sup>), de algún mensajero intracelular (Ca<sup>2+</sup>), de algún neurotransmisor (GLU), el propio potencial de membrana (V<sub>m</sub>), o de algún factor dependiente del propio reloj celular.

Actualmente se sostiene que la organización funcional de los NSQ, un conjunto heterogéneo de osciladores celulares, reside en los mecanismos de comunicación entre ellos. El modelo incluye esta hipótesis como una de sus propiedades fundamentales. La interacción entre los osciladores es definida por una matriz de coeficientes, cuyos valores son afectados por un factor de acoplamiento global que representa la fuerza de acoplamiento del sistema. El

acoplamiento actúa en el modelo como un factor ecualizador entre los osciladores, de manera que cuando aumenta se reducen las diferencias entre los valores instantáneos de las variables de estado de los mismos. Esencialmente, el estado de cada oscilador es modificado continuamente por el estado de los restantes osciladores.



**Figura 13.** El esquema muestra el cambio esperado en las trayectorias de los osciladores al incrementarse la fuerza de acoplamiento. Los osciladores se aproximan en el plano de estados adquiriendo una trayectoria más central, que se acerca al promedio del sistema.

Si se retoma la idea del plano de estados como uno de fases (Figura 12), el efecto principal producido al aumentar el acoplamiento del sistema es el cambio en las fases de los osciladores, las cuales se aproximan. El principio de acoplamiento en un sistema multioscilariorio fue sugerido por Winfree (1967). Si bien este principio resulta útil con el objeto de modelar el funcionamiento del sistema circadiano, debe considerarse que el modelo reduce a un factor unidimensional el acoplamiento, cuyo correlato fisiológico es evidentemente multivariado y complejo tal como se ha descrito anteriormente.

La aplicación computacional del modelo permite el uso de distintas ecuaciones diferenciales cuya salida numérica es oscilatoria y que se han utilizado para modelar oscilaciones reales de diversos sistemas (Díez-Noguera, 1994). El sistema más usual por razones empíricas, resulta el descrito por Selkov (1968) para modelar la glucólisis. Este sistema produce simulaciones estables y presenta una CRF a pulsos de acoplamiento de forma

similar a la CRF fónica de los roedores. Además, se han realizado varios estudios en los que se demuestra que la naturaleza del oscilador resulta trivial y que las propiedades funcionales de un sistema multioscilario residen en la modulación ejercida sobre el acoplamiento entre los componentes (Díez-Noguera y col., 2003).

Uno de los supuestos básicos para el uso del modelo como hipótesis del sistema circadiano, es que el acoplamiento puede ser modulable por la intensidad de la luz, entre otros factores. De este modo ha sido posible simular diversos comportamientos, como el desarrollo de la ritmicidad circadiana durante la ontogenia y el encarrilamiento continuo y discreto. Además se ha sugerido la existencia de elementos hipotéticos de naturaleza aún desconocida, que podrían mediar el acoplamiento en el sistema circadiano (Helfrich-Förster y Díez-Noguera, 1993).

### **1.7. Plasticidad funcional del sistema circadiano**

En esta introducción se han descrito hasta aquí las regularidades empíricas más importantes del sistema circadiano, las cuales conforman un núcleo duro bastante establecido en Cronobiología. Sin embargo, el sistema circadiano es altamente complejo, e involucra múltiples componentes desde el nivel anatómico hasta el molecular. En el caso de un ciclo límite, por ejemplo, el sistema siempre conservará el  $\tau$  y tenderá a responder con la misma CRF. Estos sistemas son definidos como de “sólo-fase” (Roenneberg y col., 2003). Evidentemente estos sistemas resultan insuficientes para predecir el encarrilamiento a perturbaciones continuas como durante un ciclo LO, debido a que justamente no se consideran estos efectos. De hecho, el encarrilamiento en el medio natural debe basarse tanto en efectos continuos como discretos del ciclo LO (Aschoff, 1963). En condiciones de laboratorio, el ciclo LO generalmente presenta transiciones abruptas (apagado y encendido) de la luz ambiental las cuales afectan fuertemente al ritmo circadiano manifiesto más allá de los efectos específicos de encarrilamiento. Estos efectos directos de enmascaramiento pueden ocurrir tanto sobre procesos dependientes como independientes del reloj (Redlin y Mrosovsky, 1999). Resulta claro que no es posible discriminar entre los efectos encarriladores

---

específicos e inespecíficos de la luz, y esta situación se acentúa cuanto más se aleja el ciclo T del  $\tau$  del ritmo, cerca de los límites de encarrilamiento.

Por ejemplo, a pesar de su específico correlato neural a nivel de la región ventromedial de los NSQ, el componente encarrilado por la luz observado en la disociación del ritmo de actividad motora en T22, podría incluir el efecto de enmascaramiento impuesto por las transiciones bruscas del ciclo LO. Este efecto no sólo contribuye al ritmo manifiesto, sino que también podría afectar a los NSQ por otras vías (Redlin y Mrosovsky, 1999). Otra posibilidad es que este componente resulte del “reclutamiento” de un conjunto de osciladores que encarrilan, lo que permite sugerir la existencia de grados de encarrilamiento a nivel del sistema circadiano. Para verificar estas hipótesis, y dado que la intensidad de la luz modula proporcionalmente el encarrilamiento de acuerdo al modelo continuo, se propone estudiar los efectos del fotoperíodo en ciclos T22 y T23 en el límite inferior de encarrilamiento, donde se presenta el ritmo disociado de actividad motora de la rata (**Artículo 1**).

Se sabe que el rango de encarrilamiento es característico de la especie y que varía con la fuerza del *zeitgeber* (Aschoff, 1981), además de variar también con la edad (Ehret y col., 1978). La determinación de este rango resulta muy útil para estudiar las características de la interacción del sistema circadiano con el ambiente. Por ejemplo, se ha demostrado que ciclos T que presentan transiciones suaves entre la escotofase y la fotofase simulando el crepúsculo y el amanecer, son más eficientes para encarrilar el ritmo de actividad del hamster ya que ensanchan el rango de encarrilamiento (Boulos y col., 2002). Otros experimentos demuestran que ciclos LO presentando luz tenue nocturna simulando la iluminación lunar, también aumentan el límite superior de encarrilamiento (Gorman y col., 2005). Estos experimentos sugieren que los efectos de la luz en los mecanismos de encarrilamiento son complejos y que no pueden ser predecidos mediante la CRF considerando un sistema de “sólo-fase”.

Al aproximarse experimentalmente a los márgenes de encarrilamiento, se observan comportamientos complejos, como el *encarrilamiento parcial o relativo* de ciertos ritmos controlados por el sistema circadiano (Aschoff, 1981). También puede observarse la modulación periódica de la frecuencia del oscilador, obteniéndose un período acelerado durante la luz y desacelerado durante la oscuridad, fenómeno conocido como *coordinación*

*relativa* del oscilador por el *zeitgeber* (Aschoff, 1981). Estos fenómenos demuestran que el encarrilamiento no es un fenómeno de tipo “todo o nada”, y que puede presentar niveles de complejidad. Incluso el propio paradigma experimental puede influir en la determinación del rango de encarrilamiento. Existen tres estrategias experimentales básicas para esta determinación: 1) exponer a distintos grupos de animales bajo distintos ciclos T cubriendo el hipotético rango, 2) incrementar o decrementar gradualmente el ciclo T partiendo desde T24, hasta observar la pérdida del encarrilamiento, 3) utilizar la CRF. Además, si bien el ciclo LO es la principal información temporal para el sistema, otras claves ambientales presentadas de manera cíclica, como la disponibilidad de alimento (Boulos y Terman, 1980), la temperatura ambiente (Francis y Coleman, 1988), interacciones sociales (Honrado y Mrosovsky, 1991) o la actividad en la rueda (Reebs y Mrosovsky, 1989) son *zeitgebers* potentes. En el contexto de esta tesis, se propone estudiar el efecto de la actividad en la rueda y de la exposición prolongada en ciclos T en el límite inferior de encarrilamiento del ritmo de actividad del hámster (**Artículo 2**).

Como se ha explicitado, el sistema circadiano del hámster es un sistema complejo capaz de mostrar diversas configuraciones funcionales. Además, este sistema es altamente sensible al fotoperíodo, el cual puede modular el encarrilamiento de manera de producir un modelo de coincidencia externa generando ritmos comportamentales y fisiológicos apropiados para cada estación del año (Pittendrigh y Daan, 1976b; Schwartz y col., 2001). Incluso la historia fotoperiódica previa puede permanecer impresa en el sistema circadiano, reflejándose como post-efectos en el  $\tau$ , en el perfil de actividad, y en la CRF (Pittendrigh y Daan, 1976a; Pittendrigh y col., 1984). Estas influencias también tienen correlatos en la actividad de los NSQ (Mrugala y col., 2000; Schaap y col., 2003). Los cambios dependientes de la historia previa de encarrilamiento sugieren que el sistema circadiano muestra plasticidad, ya que el estado actual del sistema no depende sólo de las condiciones de iluminación contingentes, sino que también es establecido históricamente, como un fenómeno de histéresis descrito por Hoffman (1971) para el “splitting” en *Tupaia*. Dado que estas evidencias reflejan claramente que el sistema circadiano es más complejo que un sistema de “sólo-fase”, y asumiendo que el acoplamiento entre los osciladores puede ser disminuido por la intensidad de la luz, se propone: 1) realizar simulaciones con el modelo del sistema circadiano, para predecir su funcionamiento en distintas condiciones experimentales, 2) estudiar el encarrilamiento del

ritmo de actividad del hámster en ciclos T22 de distinto contraste, que modularían el acoplamiento, para verificar las predicciones del modelo, 3) estudiar la dependencia de la historia previa en el encarrilamiento (**Artículo 3**).

El reloj del sistema circadiano, los NSQ, son una estructura anatómica y fisiológicamente heterogénea, que puede presentar múltiples salidas oscilatorias. En los rodeos, condiciones LL prolongadas producen la pérdida de distintos ritmos circadianos como el de actividad, temperatura, y en funciones endócrinas (Eastman y Rechtschaffen, 1983; Depres-Brummer y col., 1995). Resulta muy probable que este estado de arritmicidad sea consecuencia del desacoplamiento entre los osciladores, y de hecho actualmente se sabe que el funcionamiento coherente de los NSQ en LL se pierde (Ohta y col., 2005). Este estado funcional a nivel del reloj se correlaciona bastante con la arritmicidad comportamental. Pero desde el punto de vista de la estructura de la serie-temporal, ¿qué es esencialmente la arritmicidad? Cabe preguntarse además, cuales son las características dinámicas de este estado, y en este sentido surgen dos posibilidades: 1) que sea mayormente un proceso estocástico, 2) que presente una estructura temporal con frecuencias dominantes y algún grado de correlación. Para contestar esta pregunta, se planteó el estudio de la AM de ratas expuestas a LL, y de otras con lesiones en los NSQx. Además, realizando el registro con una elevada frecuencia de muestreo (1 min), es posible utilizar técnicas de análisis fractal sobre las series temporales. Estas técnicas permiten estimar el nivel de correlación en la estructura temporal de los datos. De este modo, se estudió la estructura de frecuencias en el rango ultradiano, y el grado de correlación de las series temporales, tanto en el dominio del tiempo como en el de la frecuencia, en la región de alta frecuencia (**Artículo 4**).

Dado que los NSQ pueden presentar distintas reorganizaciones funcionales, como se ha descrito anteriormente en los distintos estudios realizados, siguiendo un modelo de caja negra cabe preguntarse si estas reorganizaciones pueden reflejarse en el patrón de AM. Incluso al observar un actograma en condiciones de curso libre, se observa que el patrón rítmico presenta complejidades en su estructura temporal. Estas complejidades estructurales no pueden ser caracterizadas con los métodos convencionales de detección de AM, como los dispositivos de haces infrarojos (IR) o la rueda. De hecho, estos métodos (sobre todo el IR) asumen que la AM es una variable estocástica, de la cual sólo interesa para los estudios

cronobiológicos su caracterización rítmica. Sin embargo, es obvio que esta AM general incluye diversos patrones comportamentales como estereotipias, incluyendo exploración, aseo, acceso a la bebida y la comida, fases de mayor movimiento, otras de permanencia en determinados sectores, etc. Entonces, la caracterización de otros posibles ritmos comportamentales se pierde con los métodos convencionales, la cual puede mejorar la comprensión de la salida comportamental del reloj. Además, considerando los resultados del anterior trabajo, el estudio de la complejidad en series temporales de AM podría ser también útil. Con este objeto, se desarrolló un método para la adquisición de datos comportamentales con alta resolución temporal y espacial, que permita hacer registros prolongados de roedores en aislamiento. Se construyó un actímetro basado en una plataforma provista de sensores de fuerza, y un sistema de cálculo para obtener el centro de la fuerza, determinar la posición del objeto móvil sobre el plano y obtener su trayectoria. De esta trayectoria pueden obtenerse distintas variables relacionadas con el movimiento del animal. Se realizaron registros de entre 3 y 5 días de animales sometidos a LO, OO, y de animales LL y NSQx (**Artículo 5**).