



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

**INFLUENCIAS METABÓLICAS Y CIRCADIANAS SOBRE EL
NÚCLEO ARQUEADO**

T E S I S

Que para obtener el título de
Licenciada en Investigación Biomédica Básica

P R E S E N T A
Beatriz Rodríguez Cortés

Director de tesis
Rudolf Marinus Buijs



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

A mi familia por darme la oportunidad de desconstruirme y volverme a construir en lo que más me gusta.

A mis compañeros del laboratorio por hacer más divertida la investigación.

A mis amigos por escucharme y brindarme su compañía en momentos cruciales.

A Ruud por hacerme volver a creer en la ciencia y por brindarme su apoyo real.

A Maricarmen Basualdo por su valiosísima ayuda en tiempos de crisis.

A Sergio E. por ser mi compañero incondicional y cobijarme con su invaluable apoyo.

A innumerables extraños que me encontré a lo largo de este tiempo que de una u otra forma me aportaron algo y/o contribuyeron a que pudiera terminar la carrera.

A la biblioteca del IIB y a todo su personal por brindarme sus excelentes servicios y apoyo. En particular a Lucía Brito Ocampo, a Martha Cariño Aguilar y a Mari.

Y a mi querida Universidad que tan generosamente me dio una segunda casa, una segunda familia y la oportunidad de descubrirme y descubrir mi pasión por la ciencia. Por haber sido durante más de once años mi refugio, mi *alma mater*.

Abreviaturas

2DG-2-desoxiglucosa

III-V-Tercer ventrículo

AGL- Ácidos grasos libres

ACTH-Hormona adrenocorticotrópica

AE-Azul de Evans

AMP-Adenosina monofosfato

AMPK- Proteína cinasa dependiente de AMP

AP-Área postrema

Agrp- Proteína relacionada a agouti

ARC- Núcleo arqueado

ATP-Adenosina trifosfato

ADP-Adenosina difosfato

AVP- Arginina vasopresina

BAT-Tejido adiposo pardo, del inglés *Brown adipose tissue*

BHE-Barrera hematoencefálica

BHH-Barrera hemato-hipotalámica

CASK- Proteína serin-cinasa dependiente de Ca^{2+} (Ca^{2+} -dependent serine protein kinase)

CART- Transcrito regulado por cocaína y anfetaminas, del inglés: *Cocaine and amphetamine-regulated transcript*

CSF-Líquido cefalorraquídeo, del inglés: *Cerebro-spinal fluid*

DMH- Hipotálamo dorsomedial, del inglés: *dorsomedial hypothalamus*

EM- Eminencia Media

CVD- Complejo vagal dorsal

GABA- Gamma amino buteric acid

GCK-Glucocinasa

GE- (neuronas) excitadas por glucosa

GI-(neuronas) inhibidas por glucosa

Glut-Transportador de glucosa

GRP-Péptido liberador de gastrina (Del inglés *Gastrin releasing peptide*)

HRP-Peroxidasa de rábano (Del inglés *Horseradish peroxidase*)

HMIT- Transportador de miositol acoplado a protones (del inglés *Proton-coupled myoinositol transporter*)

I.c.v- intra cerebro ventricular

i.v.- intravenoso

JAM- Moléculas de unión adherente (del inglés *Junctional adhesion molecules*)

LH- Lateral hypothalamus

MAGI- Guanilato Cinasa asociado a membrana (*Membrane-associated guanylate kinase*)

MCT- Transportador de monocarboxilato (del inglés *monocarboxilate transporter*)

NaCl- Cloruro de Sodio

NEFA- Ácidos grasos no esterificados (del ingles *non-esterified fatty acids*)

NPY- Neuropeptido Y

NAD- Nicotinamide adenine dinucleotide

NADH- Nicotinamide adenine dinucleotide

NTS- Núcleo del tracto solitario

OCV-Órgano circumventricular

sOCV-Órgano circumventricular sensorial

OVLT-Órgano vasculoso de la lamina terminalis

PK2- Procineticina2

POMC- pro-opiomelacortin

PVN- Paraventricular nucleus

SCN-Suprachiasmatic nucleus

SFO-Subfornical organ

SGLT1-Transportador de glucosa ligado a Sodio (Del inglés *Sodium-Glucose Linked Transporter1*)

SNA-Sistema nervioso autónomo

SNC-Sistema nervioso central

SNP-Sistema nervioso periférico

SNS- Sistema nervioso simpático

TRH- Tracto retinohipotalámico

VIP-Péptido intestinal vasoactivo, del inglés: *vasoactive intestinal peptide*

VMH-Hipotálamo ventromedial, del inglés: *Ventromedial hypothalamus*

WAT-Tejido adiposo blanco, del inglés: *White adipose tissue*

ZT- Sincronizador, del alemán *Zeitgeber*

ZO-Proteína de la Zonula ocludens

ÍNDICE

Agradecimientos

Abreviaturas

Índice

Resumen

1. INTRODUCCIÓN

2. ANTECEDENTES

3. HIPÓTESIS

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

5. MÉTODO

5.1 ANIMALES

5.2 EXPERIMENTO 1. Evaluación de las diferencias circadianas en la permeabilidad de la BHH

5.3 EXPERIEMENTO 2. Papel del NSQ en las variaciones circadianas de la permeabilidad de la BHH

6. RESULTADOS

7. DISCUSIÓN

8. PERSPECTIVAS

9. REFERENCIAS

10. ANEXO

RESUMEN

En estudios previos se ha demostrado que el reloj biológico, el Núcleo Supraquiasmático (NSQ), interacciona con el núcleo arqueado (ARC) para organizar finamente el ritmo diario en la temperatura. Dado que la regulación de la temperatura depende estrechamente del estado metabólico del animal, la intención del presente estudio es investigar como la información metabólica y circadiana puede influir el ARC.

El ARC es uno de los núcleos clave en la regulación del gasto energético, razón por la cual se piensa que está sometido a una fuerte regulación circadiana. Para monitorear e influir el estado metabólico y por tanto, indirectamente la temperatura, este núcleo depende importantemente de la información que este recibe de la periferia a través de la circulación. Como primer acercamiento al problema, empezamos por investigar si el acceso de la información circulante que llega al ARC está también regulado en el tiempo y en tal caso si el NSQ podría ser el responsable de dicho ritmo.

Mediante Azul de Evans, una molécula de gran tamaño que normalmente no atraviesa la barrera hematoencefálica, investigamos la accesibilidad de sustancias circulantes hacia el ARC en distintos puntos temporales (ZT2, ZT11, ZT22) en ratas Wistar macho adultas. Las primeras observaciones demostraron que el azul de Evans solo penetra hacia los órganos circumventriculares (OCV's): ARC, el órgano vascular de la lamina terminal (OVLT), el órgano subfornical (SFO) y el área postrema (AP). Consecuentemente, demostramos que solo los OCV's en las áreas hipotalámicas (ARC, OVLT y SFO) presentan cambios en su estado de permeabilidad a lo largo del día. La Barrera hemato-hipotalámica (BHH, por sus siglas en inglés) en la interface ARC/ME se encuentra más abierta en el punto temporal ZT2 (Del alemán, Zeitgeber Time, ZT) que en ZT11 donde los niveles de penetración fueron los menores observados, mientras que el nivel de penetración en ZT22 es menor que ZT2, pero mayor que ZT11; dando como resultado un ritmo diario en la variación de la permeabilidad.

La apertura de la BHH en ZT2 es abatida con una lesión bilateral del NSQ mientras que una lesión unilateral del NSQ induce un cierre de la BHH en la interfaz ARC/ME, así como en el OVLT. Esto señala al NSQ como controlador neuronal de los cambios diarios

en la permeabilidad y por lo tanto controlador de los cambios diarios en el acceso de información circulante hacia el ARC.

Interesantemente, los otros órganos circumventriculares dentro del hipotálamo como el OVLT y el SFO también varían su estado de permeabilidad de la misma manera, no así en el AP donde no hay fluctuaciones en el nivel de irrigación a lo largo del día.

El control temporal de la accesibilidad a señales periféricas al ARC, OVLT y SFO tiene importantes implicaciones para fisiología. Estudios anteriores han demostrado que el acceso de la glucosa circulante hacia el ARC es incrementada cuando los animales se encuentran en ayuno. Curiosamente, los cambios en el estado de la BHH que observamos en el presente estudio correlacionan en la misma manera con cambios circadianos en niveles de glucosa y corticosterona que como se ha demostrado con anterioridad, tienen sus niveles más bajos en ZT2 los más altos en ZT11. De esta manera se abre la posibilidad de que los cambios en la permeabilidad de la BHH estén relacionados de manera causal con la dinámica circadiana en los niveles de glucosa.

Pensamos que mediante la modificación del nivel de irrigación de sitios específicos del hipotálamo (OCV's), el NSQ puede modificar la exposición de estos núcleos a niveles altos o bajos de moléculas circulantes para responder a retos metabólicos de acuerdo con la hora del día en la cual se encuentre el organismo. Lo que reportamos en esta tesis ilustran aún más como el NSQ a través de diferentes estrategias puede organizar los procesos en el tiempo para y armonizar cascadas de eventos metabólicos y sincronizarlas con las fases de luz/oscuridad.

1. INTRODUCCIÓN

El hipotálamo coordina funciones autonómicas y endócrinas con el comportamiento, especialmente aquellas actividades asociadas a requerimientos endocrinos de la vida cotidiana¹.

Hay cinco versiones fisiológicas básicas gobernadas por el hipotálamo 1. La regulación de la presión arterial y la composición electrolítica 2. La temperatura corporal 3. energía metabólica 4. reproducción y 5. respuestas emergentes de estrés¹.

Para ejercer su función reguladora, el hipotálamo recibe información sensorial proveniente de todo el cuerpo y la compara con puntos de ajuste biológicos para ajustar las respuestas autonómicas, endócrinas y conductuales, con la finalidad de mantener la homeostasis.

Sistema circadiano

Los cambios periódicos en el medio ambiente causados por el movimiento de rotación de nuestro planeta fueron internalizados a través de la evolución en un reloj biológico central y en osciladores circadianos en prácticamente todos los tejidos y órganos del cuerpo (referidos como osciladores periféricos)².

En mamíferos, el núcleo supraquiasmático (NSQ) constituye el reloj maestro que coordina a todos los osciladores periféricos por medio de conexiones neuronales polisinápticas y la liberación rítmica de péptidos neuroactivos y hormonas³.

El NSQ impone su señal circadiana sobre el cuerpo valiéndose de tres vías diferentes: vía la secreción de hormonas, la entrada neuronal autonómica y la entrada simpática a todos los órganos que éstas inervan⁴.

La influencia del NSQ sobre la secreción hormonal es una de las más importantes rutas por las cuales el NSQ sincroniza la fisiología del cuerpo. La secreción de distintas hormonas es influida por el NSQ, por ejemplo, la secreción de corticosterona y melatonina⁵.

El NSQ, a través de conexiones separadas, ya sea conexiones simpáticas o parasimpáticas, no solo prepara al cuerpo para cambios venideros en el ciclo de

actividad, sino también prepara al cuerpo y a sus órganos para las hormonas asociadas a dichos cambios.⁴

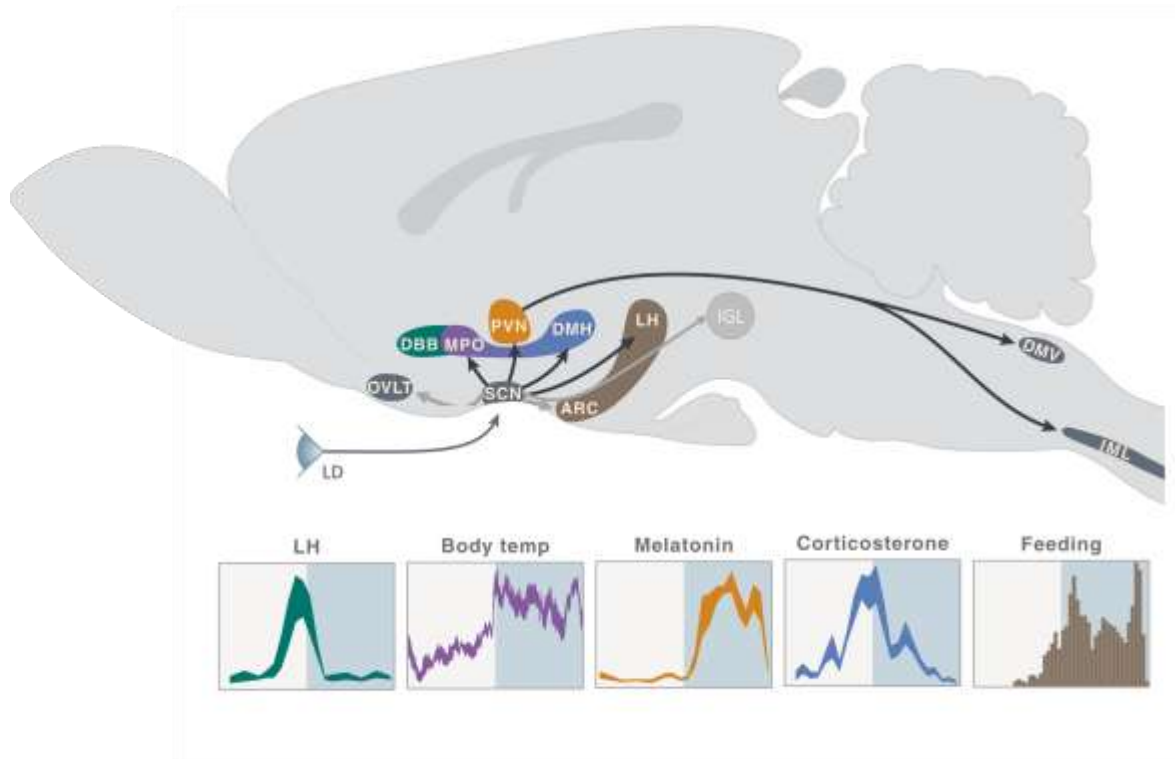


Fig. 1 El núcleo supraquiasmático dispersa su señal circadiana a través de su comunicación con otros núcleos. El reloj central se comunica neuralmente con otros núcleos hipotalámicos, influyendo sobre la liberación de hormonas, temperatura corporal y conductas que estos núcleos regulan; otorgándoles un perfil de expresión circadiana. Tomado de R.M. Buijs, A. Kalsbeek (2001).

Por ejemplo, justo antes del inicio del periodo de actividad, la glándula adrenal es más sensible a la hormona adrenocorticotrófica (ACTH). Esto es debido a la activación de la entrada simpática hacia la glándula adrenal dirigida por el NSQ, en la cual se induce un incremento circadiano en la sensibilidad a la ACTH⁶

Con la misma cantidad de ACTH, la corteza adrenal libera más corticosterona al final del periodo de sueño que al inicio del periodo de sueño

La transferencia sináptica directa de información para transmitir todas las señales desde el NSQ hacia el cuerpo ha sido cuestionada por trabajos experimentales clásicos, donde se describe que la difusión de transmisores peptídicos pueden proveer la señal circadiana^{7,8};

Sin embargo la difusión de estos factores no fue suficiente para restaurar todos los ritmos circadianos⁹, de igual manera, se desconoce si estos transmisores peptídicos juegan algún papel importante en la fisiología normal⁴.

El sistema circadiano tiene la capacidad de oscilar autónomamente, sin embargo también puede ser entrenado por señales externas como señales fóticas (ciclo luz/oscuridad) y no fóticas (ingesta de alimento o señales sociales)¹⁰.

Las bases moleculares de los ritmos circadianos recaen en asas autoregulatorias de retroalimentación transcripción/traducción con elementos regulatorios positivos y negativos, que interesantemente muestran un extraordinario grado de conservación evolutiva¹¹.

Con solo 20, 000 neuronas, el NSQ logra mantener al organismo oscilando de manera circadianas e impone una organización robusta del curso temporal en la fisiología del organismo.

El NSQ es generalmente dividido en dos regiones: la ventrolateral y la dorsomedial. Esta distinción es hecha con base en sus distintas poblaciones neuronales. La parte ventrolateral del NSQ expresa el péptido liberador de gastrina (GRP), el péptido intestinal vasoactivo (por sus siglas en inglés, VIP) y recibe directamente la entrada lumínica a través del tracto retinohipotalámico (TRH)¹². Las neuronas en la región ventrolateral son las que proporcionan la señal de luz/oscuridad al resto de las neuronas del NSQ.

Particularmente, la liberación de VIP por las neuronas del NSQ como función del tiempo circadiano y la intensidad luminosa, juegan papel en la sincronización circadiana muy importante. En ausencia de VIP o su receptor, las neuronas del NSQ son incapaces de sincronizarse entre ellas y en consecuencia muchos de los ritmos circadianos del organismo son abolidos^{13,14}.

La región dorsomedial del NSQ está compuesta por neuronas que expresan arginina vasopresina (AVP) y proquinesina 2 (PK2)¹⁵.

Esta parte del NSQ está fuertemente asociada a la generación de ritmos circadianos robustos. Así mismo, las neuronas que expresan el ácido γ -aminobutírico (GABA, por sus siglas en inglés), coexpresado en neuronas GRP, VIP y AVP, es esencial para

sincronizar a las neuronas del NSQ, adaptando su actividad a través tanto de la modulación excitatoria como inhibitoria¹⁶.

Adicionalmente, neuromedina S, otro neurotransmisor es expresado en la mayoría de las neuronas VIP y AVP, ha mostrado ser también importante para la sincronía interna en el NSQ¹⁷.

Tanto la región ventral como la región dorsal del NSQ están íntimamente interconectadas, enfatizando la importancia de la comunicación interna del NSQ.

Las neuronas del NSQ presentan un ritmo sostenido autónomo en el patrón de su actividad eléctrica, y es este fenómeno, la base de la liberación rítmica de los neurotransmisores característicos; sin embargo los neurotransmisores del reloj maestro no están involucrados en mantener el ritmo endógeno entre sus neuronas marcapaso, sino más bien están involucrado en transmitir la señal circadiana a las neuronas blanco a lo largo del hipotálamo¹⁸.

La mayoría de las neuronas SCN son más activas durante el período de luz que durante el período de oscuridad¹⁹. La luz es el estímulo más importante que sincroniza el marcapasos circadiano con el ciclo ambiental y es un estímulo muy potente para la activación neuronal de la porción retino-receptora del SCN tanto durante el día como durante la noche, donde la respuesta de luz muestra una fuerte dependencia del tiempo de exposición a la luz²⁰.

La coordinación de la ritmicidad entre las diferentes neuronas del SCN se logra a través de diversos mecanismos como la codificación de la red glial, las uniones gap, la señalización parácrina y la comunicación glutamatérgica entre el lado izquierdo y derecho del NSQ¹⁶.

La salida neural desde el NSQ hacia las neuronas blanco dentro del hipotálamo permite al organismo anticipar cambios en las condiciones ambientales por medio de la producción hormonal y autonómica, aspecto de alta relevancia para su supervivencia. Por ejemplo, la reproducción exitosa en mamíferos implica una variedad de eventos cuidadosamente programados que ocurren dentro de un programa temporal bien definido.

Existe una íntima interacción entre el sistema reproductivo y el sistema circadiano que lo regula a distintos niveles. Por ejemplo, la sincronización de diversos eventos asociados

con la ovulación ocurre en un momento específico del día, además de que el NSQ organiza el patrón diario de liberación de hormonas reproductivas de la glándula pituitaria y gónadas. Así mismo, el reloj biológico está involucrado en el momento de los eventos asociados con el parto y la medición de la duración del día en las especies animales estacionales con el fin de establecer la actividad reproductiva a la temporada adecuada del año²¹..

Entre una de las muchas preguntas que aún no se han podido contestar acerca de la regulación circadiana de los sistemas fisiológicos, es si el NSQ necesita retroalimentación sobre el estado actual de los sistemas a los que regula para ejercer su regulación en condiciones óptimas. Varios estudios ahora muestran que el NSQ también es sensible a la información metabólica e incluso recibe retroalimentación sobre el estado de reposo del animal²². En este sentido, SCN podría no sólo ser un núcleo dador de tiempo unidireccional, si no que su respuesta podría estar siendo influida por los sistemas que están bajo su control.

Regulación central del metabolismo

El control del comportamiento de alimentación y la homeostasis de la glucosa se basa en la capacidad del cerebro para integrar diversas señales periféricas que reflejan el estado energético del organismo, tales como hormonas que incluyen leptina, insulina, grelina; o señales de moléculas de valor energético como la glucosa. Esta integración se traduce en la regulación del comportamiento de alimentación, la producción de glucosa, el gasto energético y la actividad metabólica de las células²³.

Los primeros estudios *in vivo* que sugieren la existencia de dicha regulación central demostraron que la destrucción de núcleos o regiones hipotalámicas, incluyendo el VMH, induce hiperfagia y obesidad, mientras que la ablación del hipotálamo lateral (LH) conduce a hipofagia y pérdida de peso corporal^{24,25}

Consecuentemente, con la finalidad de entender este fenómeno, en 1964 se propuso la existencia de neuronas sensoras de glucosa por dos grupos independientes de investigación; uno usando gatos y el otro usando perros^{26,27}.

Más tarde, estudios electrofisiológicos realizados en cortes de cerebro y efectivamente se demostró la presencia de neuronas capaces de incrementar o reducir su frecuencia de disparo eléctrico en función de la concentración de glucosa²⁷ y lactato²⁸. Estas neuronas han sido clasificadas como neuronas excitadas por glucosa (GE) o neuronas inhibidas por glucosa (GI)^{29,30,31}

Las neuronas sensibles a glucosa están localizadas en varios sitios dentro del cerebro, sin embargo son especialmente abundantes en el hipotálamo y en el tallo cerebral. En el hipotálamo, las neuronas sensibles a glucosa se localizan principalmente en el núcleo arqueado (ARC) y en los núcleos ventromedial (VMN) y lateral (LH); mientras que en el tallo cerebral estas neuronas se encuentra en el complejo dorsal del nervio vago (CVD)³²

A pesar de que los resultados derivados de los estudios electrofisiológicos son consistentes entre sí, existe un problema metodológico/fisiológico con el enfoque experimental utilizado para evaluar la capacidad de las neuronas para detectar la glucosa. Las concentraciones fisiológicas de glucosa en el parénquima cerebral (1.4 mM en ratas normoglucémicas y 3.3 mM en ratas hiperglicémicas) nunca podrían alcanzar las concentraciones utilizadas en la mayoría de los estudios que se realizaron para identificar las poblaciones neuronales que modifican su frecuencia de disparo en función de la concentración de glucosa^{33,34,35}. Por esta razón, la capacidad de las neuronas para responder a concentraciones variantes de glucosa sigue siendo motivo de debate³⁶.

Dado que la producción y la absorción de glucosa están reguladas de manera importante por la actividad del sistema simpático (SNS) y parasimpático (SNP), un papel clave de estas neuronas centrales en la detección de glucosa es influir en la actividad tanto del SNS como del SNP del sistema nervioso autónomo (ANS). Las funciones fisiológicas influidas por la regulación dependiente de glucosa del ANS, incluye la inducción de la proliferación de células β - pancreáticas y la secreción de insulina, así como la secreción de glucagón cuando los niveles glucosa caen por debajo de los 5 mM.³²

La actividad de SNS estimula la secreción de glucagón e inhibe la secreción de insulina³⁷, incrementa la termogénesis en el tejido adiposo pardo (BAT)³⁸, estimula la secreción de

epinefrina actuando sobre las glándulas adrenales, también mejora la lipólisis en el tejido adiposo blanco (WAT), y regula la salida de glucosa hepática^{32,39,40}

La optimización de la adquisición y almacenaje de energía metabólica constituye uno de los sistemas que están regulados de manera circadiana y la evidencia apunta a que existe un constante comunicación entre la periferia y el reloj central⁴¹.

El control circadiano del metabolismo ocurre en el nivel central así como local e implica procesos metabólicos dentro de una serie de tejidos periféricos incluyendo el hígado, el páncreas, el músculo esquelético, el intestino, el tejido adiposo etc⁴². En estos sistemas, los ritmos de los genes reloj dirigidos por SCN, el comportamiento y las hormonas forman la base para un metabolismo equilibrado. Esta perspectiva es apoyada por conexiones estratégicas entre el reloj maestro y algunos núcleos dedicados a la integración de procesos metabólicos en el sistema nervioso central (SNC), dentro del hipotálamo y el tronco encefálico. De esta manera, las conexiones entre el núcleo del tránsito solitario (NTS) en el tallo encefálico y los centros hipotalámicos asociados con la regulación del equilibrio energético, tales como el ARC, el DMH, el PVN, los núcleos de VMH y el hipotálamo lateral LH pueden servir para adaptar es estado circadiano de la fisiología a las condiciones metabólicas.

Por ejemplo, la concentración de uno de los sustratos metabólicos más relevantes para el organismo, la glucosa, muestra claras fluctuaciones en su concentración a lo largo del día².

La concentración neta de glucosa en el plasma sanguíneo proviene de la regulación coordinada de la entrada de glucosa al sistema (ingesta de comida y producción hepática de glucosa) y su utilización (toma de glucosa por músculos cardíacos y esqueléticos, y/o tejido adiposo etc.)⁴³.

La primera evidencia de la participación del NSQ en la homeostasis de la glucosa provino de lesiones bilaterales de NSQ donde los ritmos de glucosa y insulina en plasma se vieron abolidos; de igual manera, la respuesta diferencial diurna y nocturna a 2-desoxiglucosa (un inhibidor de la utilización de glucosa), desapareció^{43,44}.

Debido a que los ritmos de glucosa en plasma e insulina son coincidentes con el ritmo en la ingesta de alimento, y que la secreción de insulina es provocada principalmente en

respuesta a la ingesta de alimentación; se pensó por mucho tiempo que los ritmos de glucosa e insulina eran regulados más bien por el ritmo de alimentación⁴³.

Uno de los estudios que desafiaron este punto de vista provino de ratas entrenadas a un horario de alimentación de 6 comidas por día (es decir, el acceso al alimento era de 10 min cada 4 h). En estos animales la respuesta a la glucosa y a la insulina fue mayor en la noche⁴⁵, tal como sucede en animales en condiciones normales de alimentación. La persistencia del ritmo diario en la concentración plasmática de glucosa en ratas ayunadas o entrenadas a las 6 comidas, es abolida después de lesiones del NSQ. Estos resultados experimentales demostraron claramente la implicación del NSQ en la regulación de la concentración plasmática de glucosa independientemente de la alimentación⁴⁶.

Por otro lado, las concentraciones plasmáticas de insulina y glucagón aumentan proporcionalmente después de cada comida en los animales sometidos al entrenamiento de 6 comida por día, lo cual indica que estas hormonas no contribuyen a la génesis del ritmo de la glucosa⁴⁶.

El ritmo diario de la concentración de glucosa en plasma en ratas presenta su acrofase hacia el final del periodo de luz, anticipando de esta manera el incremento en la actividad locomotora que surge en el periodo de oscuridad^{46,47}

Pruebas intravenosas de tolerancia a la glucosa a diferentes horas del día demostraron que el aclaramiento de glucosa a lo largo del día muestra claras fluctuaciones circadianas en el que la disponibilidad de glucosa es mayor al inicio del periodo de oscuridad⁴⁸

Las conexiones sinápticas entre el NSQ y el hígado a través de ambas ramas del sistema nervioso autonómico son parte del mecanismo por el cual el NSQ organiza el ritmo de glucosa. Uno de los experimentos que ilustra lo anterior es que tras estimular eléctricamente el NSQ se induce un estado hipoglucémico en los animales, apoyando la idea de que el NSQ a través de su influencia neuronal está involucrado en la regulación de la homeostasis de la glucosa^{49,47}. El efecto de denervaciones hepáticas en rata confirman el papel del NSQ en la generación del ritmo diario en la concentración de glucosa en plasma a través de su efecto de la inervación autonómica sobre el hígado⁴⁷.

El NSQ no afecta de manera directa a las neuronas motroas autonómicas, sino que, el NSQ transmite su señal circadiana hacia las ramas autonómicas a través de estructuras relevo. El núcleo paraventricular (PVN) es uno de los puntos hipotalámicos de relevo más importantes que provee la señal del NSQ hacia los órganos periféricos a través de sus proyecciones autonómicas hacia el tallo cerebral y médula espinal⁵⁰

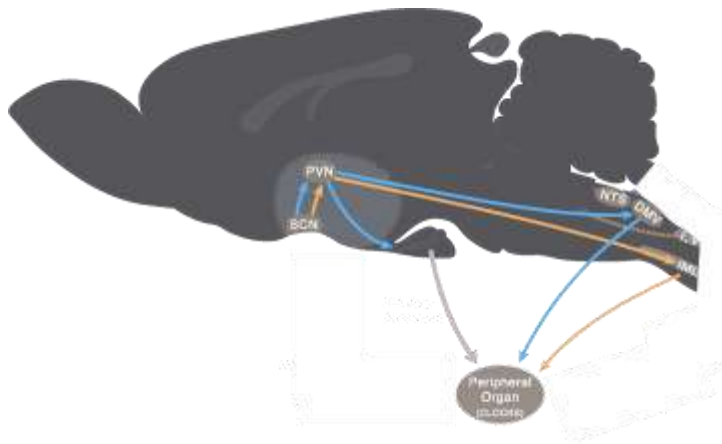


Fig. 2 El núcleo supraquiasmático influye a los órganos periféricos a través de su innervación a las neuronas simpáticas y parasimpáticas del PVN. Las ramas Simpática y Parasimpática del sistema nervioso Autónomo llegan a prácticamente todos los órganos del cuerpo humano, influyendo en su función. El NSQ es capaz de influir sobre los órganos periféricos a través de esta vía neural. Tomado de RM. Buijs y Kalsbeek (2001)

El ARC se considera particularmente crítico para la regulación de la ingesta de alimento y la homeostasis de la glucosa, ya que integra señales del tallo encefálico y la periferia^{51,52}.

Las neuronas ARC reciben señales metabólicas de la circulación que son traducidas y comunicadas a núcleos hipotalámicos como el DMH, PVN, VMH y LH LH⁵³. Las neuronas ARC tienen la posibilidad de responder a señales circulantes de hambre y saciedad, como hormonas (por ejemplo, Grelina, insulina y leptina) y metabolitos (por ejemplo, glucosa, ácidos grasos libres, aminoácidos etc.). Gracias a esta capacidad el ARC tiene la capacidad de monitorear tanto el estado energético a corto plazo, así como los almacenes de energía a largo plazo⁵⁴.

Al menos dos poblaciones neuronales que controlan el apetito están presentes en el ARC: 1. Neuronas que coexpresan la el neuropeptido Y (NPY), la proteína relacionada con agouti (AgRP) y el ácido gamma amino butírico (GABA); y 2. neurons que coexpresan el gen de la pro-opiomelacortina (POMC) y el transcrito regulado por cocaína y anfetamina (CART).

De manera general, las neuronas NPY/AgRP/GABA estimulan la ingesta de alimento⁵⁵⁵⁶, mientras que las neuronas POMC/CART lo inhiben⁵⁷.

La suficiencia en las condiciones energéticas del organismo conduce a una baja expresión de NPY/AgRP y una alta expresión de POMC/CART, lo cual promueve la saciedad⁵⁸; cuando hay insuficiencia energética sucede lo contrario en las neuronas del ARC.

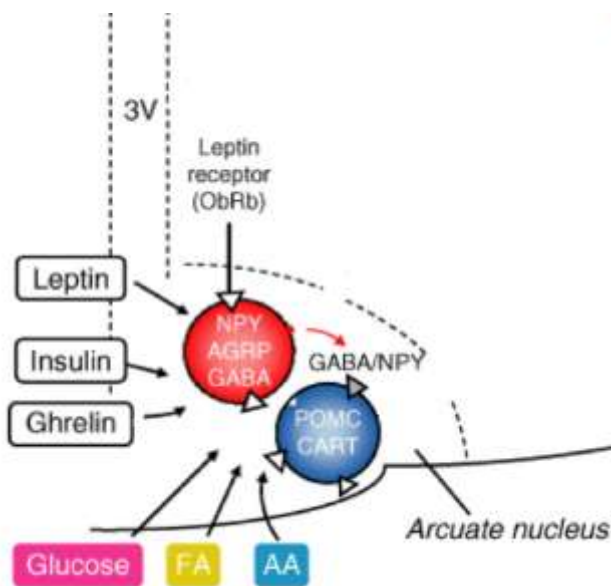


Fig. 3 El núcleo arqueado (ARC) está constituido por dos poblaciones principales de neuronas (NPY/AGRP/GABA) y (POMC/CART). Las neuronas de ARC son receptoras a señales metabólicas de la periferia, como leptina, insulina o grelina; o incluso moléculas energéticas directas como glucosa, ácidos grasos (FA), y aminoácidos (AA)

Estudios en cortes de cerebro de rata, mostraron que 40% de las neuronas NPY son neuronas GI, sin embargo la identidad del restante 60% queda sin confirmar⁵⁹.

Por su parte, la identidad de las neuronas GE no está completamente determinada y podría corresponder a neuronas POMC^{60,61}.

El neurotransmisor fenotípico de las neuronas GE del ARC es desconocido y a la fecha existen múltiples reportes contradictorios sobre si las neuronas POMC son neuronas GE⁶²

Se sabe que el ARC está densamente interconectado con el NSQ⁶³. Esta comunicación tan íntima deriva en la imposición de un ritmo circadiano en la actividad eléctrica de las neuronas α -MSH, con una acrofase en ZT22⁶³.

La comunicación entre el NSQ y el ARC no sólo da lugar a una influencia sobre el ARC sino también a una influencia sobre el NSQ procedente del ARC, la cual es esencial para que el SCN controle todos los ritmos circadianos. Cuando se elimina la comunicación neural entre el ARC y el NSQ, a pesar de que el NSQ no pierde su ritmo intrínseco, los ritmos como la actividad locomotora, la temperatura y la corticosterona, son abolidos ⁴¹.

La barrera hematoencefálica y la entrada de glucosa al cerebro

El paso libre de sustancias de la periferia al tejido cerebral está restringido por la presencia de la barrera hematoencefálica (BHE). Esta estructura es una barrera altamente dinámica y selectiva formada por las células endoteliales que recubren los microvasos cerebrales. Sus uniones estrechas entre las células endoteliales adyacentes forzan un tráfico molecular transcelular a través de la BHE, en lugar de desplazarse paracelularmente a través de las uniones entre célula-célula⁶⁴ (fig. 1). Éste fenómeno da origen a un transporte selectivo, permitiendo o facilitando la entrada de moléculas requeridas, o expulsando compuestos potencialmente dañinos. Adicionalmente, las células endoteliales que conforman los microvasos en el cerebro son densamente recubiertas por los procesos astrocitarios, proveyendo así otro filtro para sustancias periféricas nocivas⁶⁴.

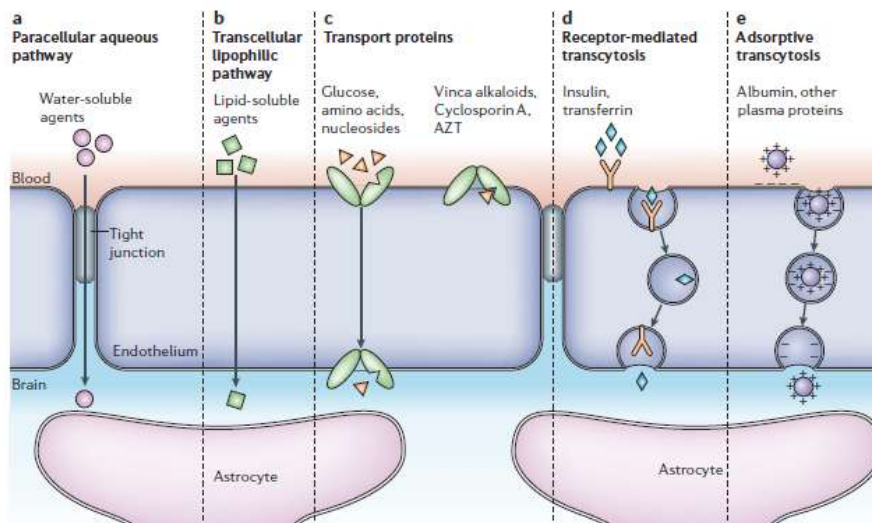


Fig. 4 Mecanismos moleculares que sustentan la función de la barrera hematoencefálica. Esquema general presenta las distintas estrategias de transporte que circunventan a la barrera. A) Vía paracelular acuosa: por medio de esta vía los agentes hidrosolubles pueden atravesar las uniones estrechas (tight junctions). B) Vía transcelular lipofílica: A través de esta vía, moléculas lipofílicas pueden atravesar la BHE. C. El endotelio contiene proteínas transportadoras para diversas moléculas, como glucosa, aminoácidos y nucleósidos; algunos de estos transportadores son dependientes de energía. La vía D) permite a proteínas como la insulina o la transferrina, atravesar la BHE a través de endocitosis y transcitosis. E) Proteínas plasmáticas como la albumina son pobremente transportadas, sin embargo su cationización puede incrementar su translocación hacia el tejido cerebral. Imagen tomada de la Ref 64.

La BHE tiene acciones metabólicas sobre varios compuestos. Las enzimas extracelulares tales como ecto-enzimas, peptidasas y nucleotidasas, son capaces de metabolizar péptidos y ATP, respectivamente, mientras que las enzimas intracelulares como la monoaminoxidasa y el citocromo P450 pueden inactivar muchos compuestos neuroactivos y tóxicos⁶⁵.

Uno de sus roles también relevantes es la protección que ésta barrera otorga al cerebro, evitando que fluctuaciones drásticas en la composición iónica (que ocurren después de la alimentación y el ejercicio), perturben la sinapsis y la señalización axonal⁶⁶. En este sentido, la barrera ayuda a separar las pozas de neurotransmisores y agentes neuroactivos que actúan tanto en el cerebro como en la periferia, permitiendo que moléculas similares puedan ser utilizadas en los dos sistemas sin tener efectos cruzados⁶⁴.

Las proteínas de unión estrecha que participan en la formación de la BHE son principalmente las occludinas y las claudinas. La occludina es capaz de enlazarse con la proteína zonula occludens 1 (ZO-1). La función principal de la occludina parece ser la regulación de las uniones estrechas⁶⁷. En la BBB, la expresión de las proteínas claudina 3, claudina 5 y posiblemente claudina 12 parece contribuir a la alta resistencia eléctrica transendotelial eléctrica⁶⁸.

Las moléculas de adhesión-unión, JAM-A, JAM-B y JAM-C están presentes en las células endoteliales de la microvasculatura en el cerebro y están implicadas en la formación y mantenimiento de las uniones estrechas. Las proteínas transmembranales están conectadas en el lado citoplasmático formando una matriz compleja de proteínas de membrana periféricas, las placas citoplasmáticas. Dentro de las placas existen proteínas adaptadoras con varios dominios de interacción proteína-proteína, incluyendo ZO-1, ZO-2 y ZO-3; La proteína serin cinasa dependiente de Ca^{2+} (CASK); MAGI-1, MAGI-2 y MAGI-3 (guanilato cinasa asociada a la membrana con orientación inversa de los dominios de interacción proteína-proteína)⁶⁴. Las interacciones célula-célula en la zona de unión se estabilizan mediante uniones adherentes. Por su parte, las uniones estrechas tienen la importante función de segregar y diferenciar los dominios apical y basal de la membrana celular.

El paso de moléculas metabólicas relevantes al cerebro está regulado por transportadores específicos, en el caso de la glucosa; su entrada está mediada por diferentes transportadores de glucosa (Gluts). La mayoría de los Gluts catalizan la transferencia bidireccional facilitada (independiente de la energía) de sus sustratos a través de las membranas y pueden exhibir una cinética de transporte simétrica o asimétrica⁶⁹. Hay más de 13 Gluts en todo el cuerpo pero sólo 5 isoformas se expresan en el cerebro. Uno de ellos es Glut2. Este transportador tiene un K_m exclusivo para la glucosa ($\sim 17mM$). Estudios con ratones *knockout* han indicado que Glut2 es esencial para la función sensora de glucosa en la zona de la vena hepatoportal, de igual manera, es de gran importancia en el sistema nervioso central. Su papel se revisará con más detalle en secciones posteriores de esta tesis.

El Glut3 también se expresa en el cerebro. Tiene una alta afinidad por la glucosa ($K_m \sim 1,5 mM$) garantizando la absorción eficiente de glucosa por las neuronas. Glut5 está

presente en niveles inferiores en el cerebro y está regulado por el ritmo diurno, la disponibilidad de sustrato y otros factores⁶⁹.

Por su parte, Glut1 tiene un importante rol en la catálisis del transporte facilitado de glucosa hacia el cerebro. Esta proteína se encuentra diferencialmente expresada en el lado luminal respecto al lado abluminal, tanto en cantidad como en el tipo de isoforma presente^{70,71}.

Glut13, también llamado HMIT (transportador de mioinositol acoplado a protones), es un transportador de mioinositol expresado principalmente en el cerebro y es la única proteína Glut que parece funcionar como un simportador acoplado a protones. Su función precisa en el metabolismo del mioinositol cerebral aún no se ha establecido, pero se ha asociado con trastornos del estado de ánimo⁷².

Los órganos circumventriculares.

Los órganos circumventricular (OCVs) son pequeñas estructuras que bordean los ventrículos, y que se encuentran altamente vascularizadas. En estas estructuras las funciones de la BHE han delegado a células endocelulares especializadas que recubren estas estructuras periventriculares, llamadas tanicitos⁷³. La disposición específica de las células y las moléculas que componen la barrera a este nivel resulta en interfaces más permeables en la que los capilares fenestrados permiten a las neuronas de los OCVs tener un contacto directo con las sustancias contenidas en el torrente sanguíneo. De allí que los OCVs se hayan ganado el nombre de "ventanas del cerebro".

Estas "ventanas de cerebro" pueden servir a dos propósitos, (1) permitir que los péptidos y proteínas secretadas por el tejido neural alcancen el torrente sanguíneo, y (2) permitir que las células neuronales perciban la composición de la sangre⁷³.

Los principales OCVs de los mamíferos son la eminencia media (EM), el órgano vascular de la lámina terminal (OVLT), el órgano subfornical (SFO), y el área postrema (AP)⁷⁴

Es importante destacar que la capa subependimial en el EM forma un continuo con la porción ventral del ARC. Esta disposición anatómica especial apunta a que la EM junto con el ARC forma un complejo estructural, que es sabido, tiene importantes funciones en la regulación metabólica⁷⁵.

Para llevar a cabo su función como regulador metabólico, el ARC necesita monitorear en tiempo real el estado nutricional del organismo, sin embargo hoy en día aún no se tiene claro si las neuronas ARC podrían estar en contacto directo con sangre o el CSF. Algunos autores han mostrado parcialmente que el medio interno del ARC presenta una compartimentalización tal que resulta estar aislado a señales transmitidas por la sangre, evitando así el flujo retrógrado de las hormonas que se secretan en la EM^{76,77}.

Dado que el ARC rodea la eminencia media y la eminencia media posee un endotelio fenestrado, se ha asumido que los niveles de glucosa en el ARC son más similares a los de la sangre. Sin embargo, el acceso directo de las señales homeostáticas periféricas a través de los microvasos en la ME hacia el ARC aún es materia de debate^{78,79,80}.

Adicionalmente, observaciones realizadas tras la inyección i.c.v. de azul de Evans, un colorante vital, mostraron que el ARC cuenta con una barrera propia que impide la diseminación del colorante fuera de este núcleo, evitando de esta manera que las regiones del la VMH se tiñan⁸¹.

A pesar de la presencia del Glut1 y Glut2, particularmente en los microvasos que perfunden el ARC⁸⁰, aparentemente la regulación de la entrada de glucosa a este sitio regulador es más complicada que el transporte facilitado de glucosa por los Gluts y sugiere la participación de distintas barreras de difusión en la EM y el ARC^{81,82,80}.

Mullier y colaboradores mostraron por medio de técnicas de inmunohistoquímica y análisis 3D que existe una organización diferencial en la expresión de proteínas de unión estrecha por las células endoteliales que componen la barrera en los OCVs, incluyendo la EM. Este arreglo especial da lugar a distintos patrones de difusión de factores contenidos en sangre a algunos núcleos que participan en la regulación metabólica, como el complejo ARC/EM⁸¹.

Interesantes observaciones realizadas por Langlet y su equipo de trabajo indican que estas barreras no son constantes en todas las condiciones fisiológicas. Durante el ayuno y la glucoprivación, la organización estructural de la barrera se modifica dramáticamente. En contraste, bajo las mismas condiciones catabólicas, la expresión de Glut1 se mantiene igual que en condiciones basales, mientras que la expresión de Glut2 sólo aumenta en condiciones de ayuno pero no durante el estímulo glucoprívico⁸⁰. Estas observaciones no solo señalan a la BHE como una entidad plástica capaz de responder

a cambios en los niveles de glucosa, sino también señala un aspecto de alta relevancia: a la eminencia media como un conducto masivo privilegiado de glucosa a través de la cual, este metabolito puede alcanzar al ARC, el principal regulador del gasto energético. Estas observaciones colocan en segundo término la importancia del transporte de glucosa a través de las GLUTs como mecanismo de monitoreo de las concentraciones de glucosa en tiempo real y señalan la entrada a través de la ME como una ruta importante para una respuesta contragulatoria.

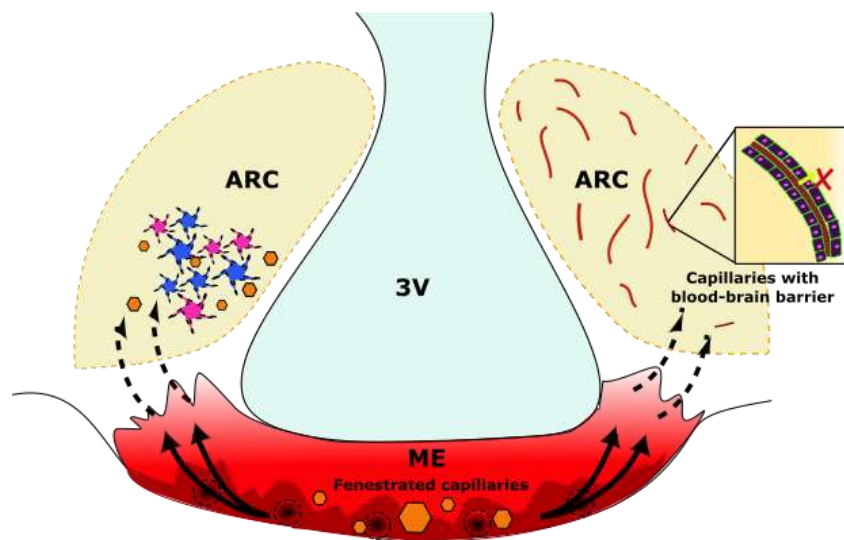


Fig. 5. La entrada de factores circulantes desde la periferia hacia el ARC es favorecido por su posicionamiento estratégico por arriba de la eminencia media (EM). Los vasos sanguíneos que irrigan en ARC se encuentran revestidos por la barrera hematoencefálica, por lo que la penetración de sustancias desde la periferia se ve ralentizado y restringido, contrastantemente, el paso de sustancias a través de la EM representaría un acceso masivo de sustancias perifericas a ARC debido a la presencia de capilares fenestrados en ésta estructura.

Se ha sugerido a la glucosa no sólo como sustrato metabólico sino también como una molécula de señalización que refleja el estado energético del organismo⁸³. Interesantemente, los cambios en la permeabilidad BHH debido al ayuno se revierten al estado basal, cuando las condiciones metabólicas vuelven a los niveles normales⁸⁰. Así pues, los niveles de glucosa parecen desempeñar un papel clave en la inducción de estos cambios estructurales en BHH y en la barrera cerebro-espinal⁸⁰.

Barrera hemato-hipotalámica

Los tanicitos son un tipo especializado de célula endotelial, localizada en las partes inferiores de las paredes ventriculares y el piso del tercer ventrículo (III-V). Estas células tienen una morfología alargada, no están ciliadas⁸⁴ y se clasifican en función de su distribución en la pared ventricular hipotalámica⁸⁵.

Los procesos basales de los tanicitos α_1 se proyectan hacia el VMN, mientras que los pies tanicitarios de los α_2 se proyectan hacia el núcleo del ARC, formando una interfaz entre el CSF y estos núcleos neuronales, permitiendo el intercambio de molecular entre estas dos entidades⁸⁶. Los tanicitos β_2 cubren el piso del III-V y extienden sus proyecciones dentro del ME.

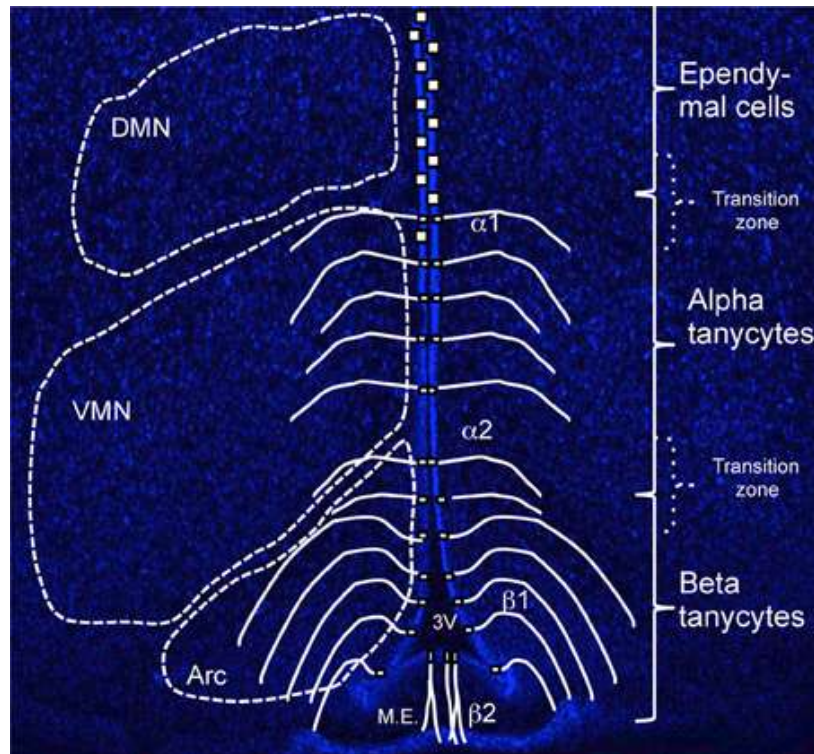


Fig. 6 Organización y distribución de tanicitos hipotalámicos. Corte coronal de un hipotálamo adulto cuyos núcleos celulares, se encuentran marcados con Hoechst. Superimpuesto en color blanco se encuentran marcados los dominios tanicitarios. Los tanicitos α_1 envían sus procesos celulares hacia el VMN, mientras que los tanicitos α_2 proyectan hacia el ARC. Por su parte los tanicitos β_1 extienden sus procesos a lo largo del borde entre el ARC y la EM. Los tanicitos β_2 tanocytes están localizados principalmente en el piso del III-V. Eminencia media (EM), núcleos Dorsomedial (DMN), y Ventromedial (VMN); núcleo arqueado (ARC). Imagen tomada directamente de Ref. 150.

El tráfico molecular de información entre la periferia y el ARC está restringido por una interfaz estructural dinámica constituida por tanicitos β_1 que bordean el receso infundibular. Sus proyecciones basales alcanzan las regiones laterales de la EM y el ARC⁸⁰. Esta barrera se encuentra entre el ARC y la eminencia media y recibe el nombre de barrera hemato-hipotalámica (BHH)^{87,88 80}.

Esta barrera fue propuesta con la idea de que para que el sistema neuroendócrino funcionara correctamente, debía forzosamente existir una barrera entre la EM y el ARC^{89,73}. Dado que los procesos basales de los tanicitos β_1 se extienden a lo largo de la frontera entre la eminencia mediana y el ARC se consideraron como buenos candidatos para participar en un mecanismo de barrera en esta área.

Los tanicitos β_1 tienen otras características especiales que realzan su papel como barrera. Sus cuerpos celulares están unidos por uniones adherentes, mientras que sus procesos, que establecen el borde entre el ARC y la EM, están unidos entre sí por proteínas de zonula y macula adherentes localizadas a lo largo de la superficie lateral del cuerpo celular, así como en sus procesos⁷³. Esta característica única de los tanicitos β_1 se correlaciona con la formación de ramilletes de procesos tanicitarios observados a través en estudios con microscopía electrónica, en los que se revelaba la existencia de uniones adherentes y uniones estrechas entre los procesos tanicitarios β_1 así como entre los axones de las neuronas neurosecretoras⁸⁹. De igual manera, los axones provenientes del ARC y otros núcleos que penetran a la eminencia media están densamente rodeados por procesos de tanicitos β_1 .

Tras inyectar colorantes vitales en el fluido cerebro espinal (CSF por sus siglas en inglés) se tiñe el ARC pero no la EM⁹⁰, en el caso contrario en el que los colorantes vitales son administrados intravenosamente si penetran a la EM pero no al ARC⁸¹.

De igual manera, la peroxidasa de rábano (HRP) logra fácilmente acceder al ARC sin llegar a la EM únicamente cuando se administra intracerebroventricularmente^{91,90} y la marca se restringe de manera clara en ambos bordes de la EM, justo donde se localizan los tanicitos β_1 y sus procesos basales.

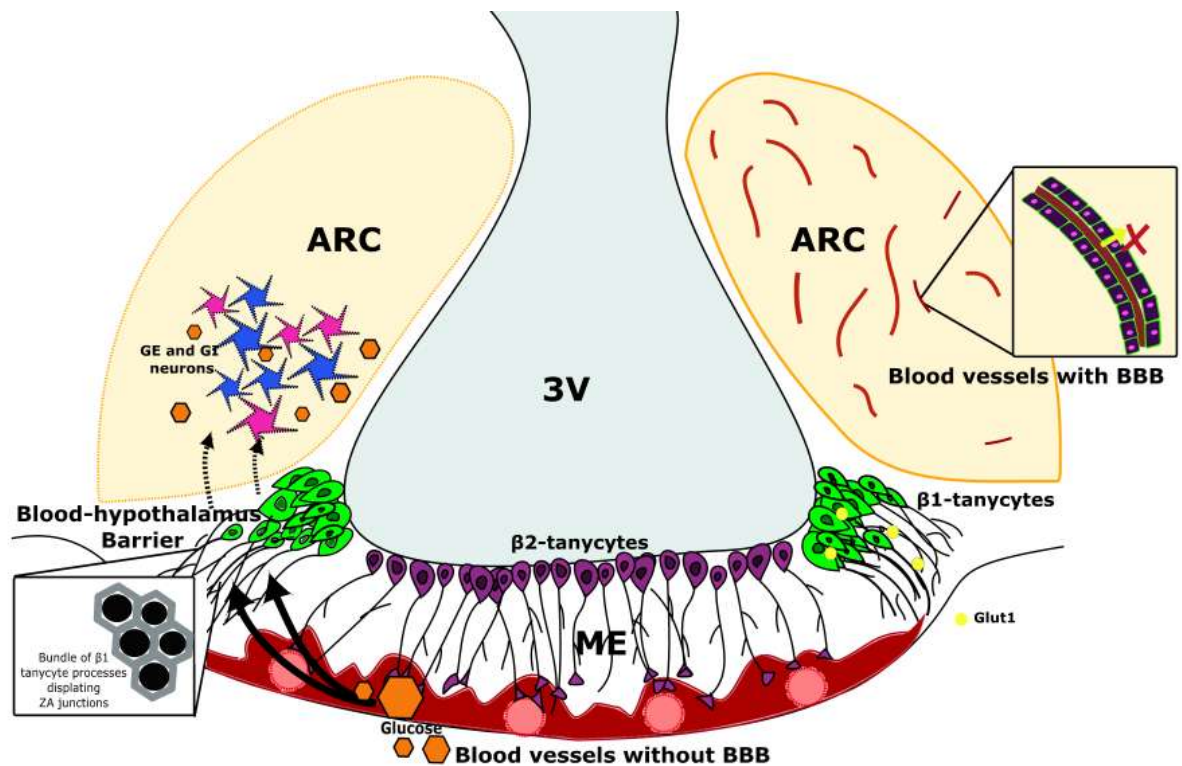


Fig. 7 Representación esquemática de la atquitectura de la barrera hemato-hipotalámica. Los procesos basales de los tanocitos β_1 se extienden a lo largo de la interfaz ARC-EM actuando como barrera física que restringe el paso de sustancias humorales desde la EM hacia el ARC. Además, los procesos celulares de los tanocitos β_2 se posicionan sobre los capilares fenestrados, regulando el paso de sustancias como la leptina hacia el CSF¹⁵⁰ o bien modificando la accesibilidad de axones neuroendocrinos hacia el lumen capilar, regulando así secreción hormonal.

En la EM, Glut1 no está presente en los vasos sanguíneos del sistema porta hipofisario y ni en los tanocitos β_2 , pero si en los tanocitos β_1 . Glut 1 se distribuye a lo largo de toda la membrana de tanocitos β_1 , delineando el cuerpo celular, los procesos basales, y sus terminaciones en la región lateral de la eminencia media⁹².

Otra asombrosa observación que enfatiza la importancia de la BHH se basa en la administración subcutánea de glutamato monosódico (MSG) a ratas recién nacidas. Es sabido que este compuesto induce una destrucción severa y selectiva de las neuronas del ARC^{93,94}. Poco se sabe acerca de los mecanismos responsables de este daño neuronal selectivo, pero abre la posibilidad de que los tanocitos de la EM estén de alguna manera implicados⁹⁵. Curiosamente, el desarrollo postnatal de la inmunoreactividad de Glut1 de los tanocitos es proporcional a la susceptibilidad de las neuronas del ARC al

tratamiento con MSG⁹². De hecho, el daño máximo de las neuronas del ARC se produce cuando el MSG se administra durante la primera semana posnatal^{96,94,93}, período el cual la inmunoreactividad de Glut1 de los tanicitos β_1 apenas se detecta y la BHH aún no se ha desarrollado, lo cual permitiría que el MSG sistémico gane acceso al ARC. Una vez que la BHH está completamente desarrollada, alrededor de la cuarta semana posnatal, la administración sistémica de MSG no afecta al ARC⁹².

Detección de glucosa en el cerebro

Los mecanismos por los cuales las neuronas GE y GI pueden 'detectar' la concentración de glucosa aún no han sido completamente caracterizados, pero se han descrito una variedad de mecanismos putativos³⁶. La mayoría de los modelos que tratan de explicar el mecanismo de detección de glucosa en las neuronas GE han tomado a las células β pancreáticas como un modelo en el que la señalización se inicia por la captación de glucosa a través del transportador de glucosa Glut2, seguido por la fosforilación de la glucosa por acción de la glucocinasa (GCK), una enzima que cataliza la liberación de insulina estimulada por la glucosa³². Los siguientes pasos involucran un aumento de la proporción de ATP/ADP, que induce el cierre de los canales de K^+ sensibles a ATP, la despolarización de la membrana y la entrada de Ca^{2+} a través de canales de Ca^{2+} controlados por voltaje en la célula β para desencadenar la exocitosis de gránulos de insulina³².

Esta vía de señalización Glu2/GCK/ K_{ATP}^+ es un modelo para la activación de neuronas GE. Cada una de las proteínas involucradas en esta vía de señalización se expresa en el cerebro, sin embargo, sólo con una colocalización parcial. Glut2 es producido en pequeñas poblaciones celulares del tallo cerebral, el área talámica y el hipotálamo⁹⁷. La expresión de GCK es alta en el hipotálamo, en particular en el ARC, VMN y en el tallo cerebral⁹⁸; contrastantemente, el canal K_{ATP}^+ se expresa en la mayoría de las neuronas⁹⁹.

La distribución heterogénea de estas proteínas sugiere que la manera en la que se detentan los cambios en la concentración de glucosa es distinta y es necesario considerar elementos adicionales específicos de cada población neuronal³². Se ha encontrado que algunas neuronas hipotalámicas coexpresan Glut2 y GCK¹⁰⁰. Igualmente importante es considerar que las neuronas GE pueden ser activadas después de la captación de glucosa por el SGLT1, un cotransportador electrogénico de Na⁺/glucosa que induce la despolarización de la membrana¹⁰¹.

La activación de las neuronas GI por una baja en la concentración de glucosa es un problema aún más difícil de abordar, porque en principio estas neuronas estarían percibiendo "la ausencia". Originalmente, se propuso despolarización de las neuronas GI como consecuencia de bajos niveles en glucosa era un efecto secundario de una disminución en la producción de ATP, lo que a su vez conduciría a una reducción de la eflujo de sodio por la Na⁺/K⁺ ATPasa, con la consecuente despolarización membranal y el cierre de un canal de Cl⁻¹⁰². Recientemente, se ha propuesto que la activación de las neuronas GI del hipotálamo ventromedial (que incluye el VMN y el ARC) involucra la participación de la proteína quinasa dependiente de AMP (AMPK), el aumento de la producción de óxido nítrico (NO) y GMPc que contribuye aún más a la activación de la AMPK, que eventualmente suprimirá la actividad del canal de cloro (CFTR, del inglés *cystic fibrosis transmembrane regulator*)¹⁰³.

El OVLT, SFO y el AP como órganos circumventriculares

El OVLT, SFO y el AP han sido catalogados como OCVs sensoriales (sOCVs) y se considera que el control central de la composición osmótica del medio corporal está regulada por estos^{104,105}. Por ejemplo, el SFO es el principal sitio para la detección de los niveles de Na⁺, que promueve la evasión de ingesta de sal en animales deshidratados^{106,107}.

El cuerpo celular y las dendritas del SFO están expuestos a los componentes de la sangre debido a la ausencia de BHE propiamente, de modo que sus neuronas pueden responder a señales transmitidas por la sangre, tales como los niveles plasmáticos de angiotensina II.

El OVLT es también uno de los núcleos que ha sido ampliamente caracterizados. Este núcleo tiene importantes funciones como osmoreceptor central y detector de sodio^{108,109,110}. Muchas de las neuronas en este núcleo son intrínsecamente sensibles al NaCl hipertónico o al manitol. Las neuronas que conforman al OVLT exhiben cambios en la tasa de disparo de potenciales de acción y son proporcionales a la osmolalidad del fluido extracelular^{111,112,113}. Las neuronas de sodio u osmosensibles en el OVLT contribuyen a la homeostasis de los fluidos corporales a través de proyecciones axonales a muchas estructuras homeostáticas centrales, incluyendo el PVN y el núcleo supraóptico¹¹⁴, el núcleo preóptico medial^{115,116} y las neuronas del tálamo proyectándose a zonas frontales de regulación de la sed^{117,118}. En este sentido tanto el OVLT como el SFO desempeñan papeles similares en la osmorregulación.

Por otro lado, el AP desempeña un papel importante en el control del sistema cardiovascular¹¹⁹. Para asegurar que el corazón lata lo suficientemente fuerte y rápido como para proporcionar la perfusión de los tejidos a un nivel apropiado, es necesario que los sistemas autónomos supervisen constantemente ciertas variables periféricas, utilizando estructuras sensoriales conectadas al cerebro por aferentes autonómicos¹²⁰. El AP proporciona información cardiovascular al cerebro como consecuencia ubicación medular única dentro del SNC pero fuera del BHE.

Interesantemente, éste sOCV está íntimamente asociada con el núcleo del tracto solitario (NTS), una región de la médula que recibe información de barorreceptores arteriales, proporcionándole una cantidad significativa información al AP¹²¹. Los efectos de las lesiones AP sobre la frecuencia cardíaca y la presión arterial tienen efectos hipertensivos claros¹²².

De experimentos realizados anteriormente⁴¹ se sabe que el NSQ necesita la retroalimentación de la periferia para regular finamente el ritmo en el cuerpo, sin embargo, no se entiende completamente cómo se transmite la información periférica al NSQ. Aparte de la luz y la melatonina, poco se sabe sobre otros factores que puedan proporcionar información desde la periferia al NSQ⁴. Se ha sugerido a los órganos circumventriculares como buenos candidatos mediante los cuales se proporcionaría información periférica al SCN. Por ejemplo, el ARC, el OVLT y el SFO^{123,124,125} proyectan al NSQ. Congruente con este punto, se ha visto que las funciones fisiológicas que

regulan estos OCVs presentan un claro ritmo circadiano OCVs¹²⁶. Del mismo modo, nuestro equipo de trabajo ha propuesto al complejo ARC/EM como fuente de retroalimentación periférica hacia el NSQ, que en este caso ayudarían al NSQ a llevar a cabo su función de regulador circadiano, de una manera más fina, conociendo constantemente la condición en la que se encuentran los sistemas que están bajo su control, tal como las concentraciones de glucosa y corticosterona ¹²⁷ en la periferia.

Papel de los tanicitos en la detección y respuesta a la concentración de glucosa.

Las neuronas del ARC están en estrecho contacto con los tanicitos, principal población celular glial presente en el hipotálamo basal^{128,129}. Como se ha explicado anteriormente, su cuerpo celular en la pared ventricular, mientras que su largo proceso celular se proyecta hacia el hipotálamo ventromedial. Los tanicitos α_2 y β_1 tienen procesos celulares extendidos que entran en contacto con las neuronas en el ARC, en particular, se han encontrado frecuentemente cerca de neuronas NPY^{129,130,131} y neuronas POMC¹³². Por su parte, los tanicitos β_2 que forman la barrera de CSF-ME, extienden sus procesos de tal manera que entran en contacto con vasos sanguíneos fenestrados presentes en la EM⁸⁶. Los tanicitos expresan las proteínas implicadas en las células β pancreáticas, incluyendo GLUT2, glucocinasa (GK) y canales de K^+ sensibles a ATP^{133,134}, lo cual sugiere una posible participación en la detección hipotalámica de la glucosa y su consecutiva influencia sobre neuronas del ARC y/o del VMN¹³⁵.

Los tanicitos se han propuesto como sensores de glucosa debido a su expresión de Glut2. Este transportador se localiza en el polo proximal de tanicitos, mismo que está en contacto directo con el CSF en el tercer ventrículo¹³⁴. Esta propuesta se ve apoyada por evidencia de que mostró que el aumento en la concentración de glucosa induce un aumento de Ca^{2+} intracelular en cultivos de tanicitos. Estos cambios fueron inducidos por el aumento en ATP, consecuencia de la captura y el consecuente metabolismo de la glucosa. Estudios en cortes de cerebro, mostraron que la estimulación selectiva de los

cuerpos celulares de tanicitarios por la glucosa o por análogos no metabolizables de glucosa, evocan fuertes respuestas de Ca^{2+} mediadas por ATP¹³⁶.

Interesantemente, los tanicitos liberan lactato en respuesta a la glucosa. La liberación de ATP o lactato por los tanicitos podría en principio, modular la actividad neuronal en áreas hipotalámicas asociadas con la conducta de alimentación, incluyendo ARC y VMN, cuyas neuronas están en estrecho contacto con los tanicitos¹³⁵. El lactato y su posterior liberación hacia las neuronas vecinas a través del transportador de monocarboxilato (MCT) puede inducir un aumento en la síntesis de ATP, el cierre de los canales de K^+ _{ATP} y la consecuente despolarización neuronal¹³⁵.

Coincidentemente, MCT1 y MCT4, dos isoformas del transportador de monocarboxilato, que están implicadas en el flujo de salida de lactato¹³⁶, se expresan en los tanicitos. Además, las neuronas orexigénicas y anorexigénicas en el ARC presentan una alta inmunoreactividad para MCT2, que está implicada en internalización de lactato¹³², sugiriendo una participación activa de los tanicitos en el control indirecto de la actividad neuronal por la glucosa.

Tanto estudios *in vitro* como *in situ* demostraron que los tanicitos detectan y responden a la glucosa extracelular a través de una vía de transducción de señales activada por glucosa, mediada por lactato y/o ATP. Dado que toda la evidencia que se tiene hasta el momento ha sido recabada de estudios *in vitro*, harían falta futuros estudios *in vivo* que determinen si efectivamente los tanicitos podrían detectar cambios extracelulares en la concentración de glucosa¹³⁵.

2. ANTECEDENTES

Recientemente se demostró que la BHH es una entidad plástica capaz de responder a los cambios en los niveles de glucosa en ayunas. Bajo condiciones catabólicas, la organización estructural de la barrera se modifica dramáticamente, resultando en un mayor acceso de los sustratos metabólicos al ARC; Aumentando el acceso circulante de glucosa selectivamente a esta región. Estos cambios en la permeabilidad BHH se revierten cuando las condiciones metabólicas vuelven a los niveles basales⁸⁰. La capacidad de la BHH para responder a condiciones metabólicas cambiantes, indican

que podría desempeñar un papel activo no sólo en la respuesta a desafíos metabólicos; sino también en devolver el sistema a valores fisiológicos. Adicionalmente, Herrera-Moro et al., 2016, encontraron que la elevación de la glucosa en respuesta a la hipoglucemia en diferentes puntos temporales, inducida con un bloqueador del metabolismo de la glucosa, 2-desoxiglucosa (2DG), se ajusta de forma circadiana sólo cuando se administra la 2DG i.v., pero no así cuando se administra i.c.v.¹³⁷. Esto señala que la periferia e, importantemente, la BHH están involucrados en el establecimiento de la respuesta circadiana de contra-regulación en los niveles plasmáticos de glucosa.

Bajo estas condiciones catabólicas de glucoprivación, se observó un interesante fenómeno: una activación diferencial de las neuronas ARC dependiendo de la hora del día. La acrofase se sitúa en ZT11, mientras que los niveles más bajos de activación neuronal del ARC están en ZT2.

No se tiene explicación sobre las causas que originan estas diferencias en la respuesta del ARC frente a un reto metabólico, sin embargo, si consideramos que la respuesta del ARC podría ser afectada por la cantidad de información que recibe este núcleo; resulta tentador proponer la siguiente idea: estas diferencias circadianas en la actividad neuronal de la ARC, inducidas por 2DG circulante podría explicarse a través de diferencias en la cantidad de información que recibe el ARC, que esto a su vez implicaría un estado de permeabilidad de BHH diferencial dependiendo de la hora del día.

En la presente tesis se estudió si la BHH fluctuaba a lo largo del día, y de ser así, si el NSQ estaba involucrado.

3. HIPÓTESIS

La BHH presenta cambios en su estado de permeabilidad a lo largo del día y estos cambios están influidos por el NSQ.

4. OBJETIVO GENERAL

Investigar si la BHH presenta cambios diarios en su permeabilidad

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- A. Determinar si la permeabilidad de la BHH cambia diariamente
- B. Evaluar si el NSQ puede afectar la permeabilidad de la BHH.

5. MÉTODOS

5.1 ANIMALES

Ratas Wistar macho adultas (250-300 g) se alojaron individualmente en jaulas acrílicas individuales, bajo un ciclo luz-oscuridad 12:12 h (la luz se enciende a las 7:00 am y se apaga a las 7:00pm), con acceso ad libitum al agua y alimento. La temperatura fue lo más constante posible (~ 22 ° C). Los experimentos que aquí se muestran fueron aprobados por el Comité de Ética del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, de conformidad con el Reglamento Federal de Cuidado y Uso de Animales (NOM-062-ZOO-1999). Los animales se obtuvieron del bioterio de la Facultad de Medicina.

Los experimentos se realizaron de forma independiente como se detalla en los párrafos siguientes.

5.2 EXPERIMENTO. Evaluación de las diferencias diarias en la permeabilidad BHH.

Con el objetivo de determinar si la permeabilidad de BHH cambia diariamente, se utilizaron los siguientes procedimientos

Canulación Intrajugular: La cirugía se realizó bajo anestesia, inyección i.p. de una mezcla de Ketamina (Anesket, PiSA, México, 50 mg / kg) y Xilazina (Procin, PiSA, México, 8 mg / kg) 2: 1. Se implantó una cánula de silicio (0,025 pulgadas, diámetro interno X 0,047 pulgadas de diámetro externo X 10 cm de largo, Intech, EE.UU.) en la rama derecha de la vena yugular interna, introduciéndola 3 cm hacia el corazón; El resto de la cánula se exteriorizó subcutáneamente a través de la cintura escapular y se llenó con una mezcla de glicerol (60% JT Baker, EE.UU.), heparina (PiSA, EE.UU., 20%), solución salina estéril 0.9% y antibiótico (anfotericina B, penicilina , estreptomicina, GIBCO, USA, 10%) con el objetivo de mantener la permeabilidad de la cánula.

Las ratas se dejaron recuperar durante una semana en las mismas antes condiciones mencionadas, previo a la sesión experiemntal. Después del período de recuperación, se inyectó i.v. a los animales i.v. con una solución de azul de Evans (AE) (Sigma Aldrich, EE.UU. 5%) y 5 minutos más tarde, a través de la misma cánula, se administró una dosis letal de pentobarbital a la rata (200 µl, Pisabental, PiSA, EE.UU.). La rata se perfundió inmediatamente de manera intracardial con una solución de paraformaldehído amortiguada con fosfatos (PFA) 0.1M, pH 7.2. Se extrajo el cerebro inmediatamente y se sumergió en PFA durante 48 h para una postfijación, tras lo cual el cerebro se colocó en una solución de sacarosa al 30% en solución amortiguada por fosfatos 0,1 M, otorgándole al tejido una crioprotección para el posterior procesamiento del cerebro. Los cerebros se cortaron coronalmente a 30µm, a -28°C en un criostato y se recogieron en portaobjetos gelatinizado para su posterior análisis con microscopía confocal

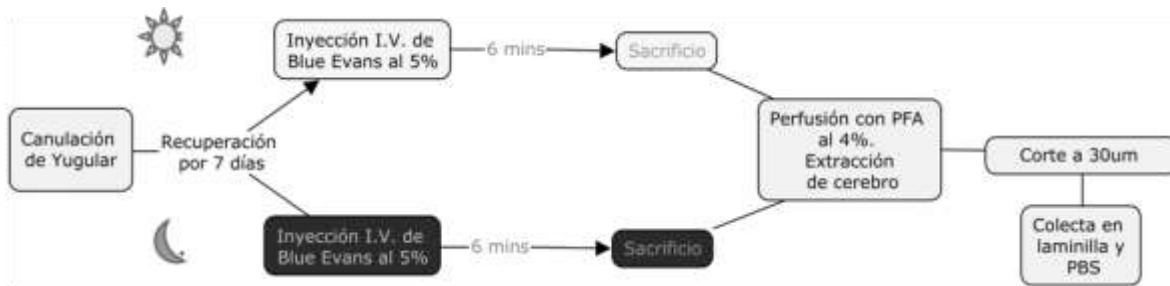


Fig.8 Resumen gráfico del diseño experimental empleado para analizar las posibles diferencias circadianas en la permeabilidad BHH

5.2.1 EXPERIMENTO 2. El papel del SCN en las fluctuaciones diarias de la permeabilidad BHH

Los animales se alojaron en las mismas condiciones que las descritas en el "Experimento 1".

Lesión del núcleo supraquiasmático

Las lesiones electrolíticas bilaterales o unilaterales del NSQ se realizaron a través de estereotaxia bajo anestesia con ketamina/xilazina (60: 6 mg / kg de peso corporal). Se suministró una corriente constante de 0.3 mA durante 45 segundos a través de electrodos de acero inoxidable en el NSQ. Las coordenadas fueron tomadas a partir de Bregma fueron las siguientes: 0,2 mm posterior y 8,4 mm ventral desde la superficie del cerebro; Para el seno de coordenadas laterales se utilizó como referencia, poniendo el

electrodo 0,2 mm desde el borde de la vena hacia la línea media. Después de la cirugía, todos los animales tuvieron libre acceso al agua y los alimentos. Y después de un período de recuperación de diez días, los experimentos se realizaron bajo un ciclo de 12:12h luz-oscuridad (luces encendidas a las 7:00 a.m). Se implantó una cánula de silicón e inmediatamente después se realizó la lesión, tal como se describió anteriormente.

La totalidad de la lesión NSQ se evaluó con un análisis post-mortem a través de la inmunohistoquímica del péptido intestinal vasoactivo (VIP). Después del tratamiento de post-fijación por inmersión en paraformaldehído al 4% durante 48 horas, los cerebros se transfirieron a una solución de sacarosa al 30% durante 3 días para crioprotección. Los cerebros fueron congelados y cortados en secciones corales de 30 μ m, mismo que se trataron durante 10 min en H₂O₂ al 0,5% y se incubaron posteriormente en una dilución de anticuerpo primario anti-VIP de conejo 1: 2000 (Millipore), anti-conejo biotinilado 1:500 (Jackson ImmunoResearch), complejo de avidina-biotina-peroxidasa (Vector laboratories), y la reacción se reveló con tetrahidrocloruro de 3,3-diaminobencidina. Sólo los animales con la eliminación completa de la inmunoreactividad para VIP en el área del NSQ se tuvieron en cuenta para la cuantificación de fluorescencia.

6. RESULTADOS

La permeabilidad de la BHH a sustancias periféricas cambia diariamente en el OVLT, SFO y ARC/EM

Con la finalidad de investigar los posibles cambios diarios en la permeabilidad de la BHH se comparó la cantidad de Azul de Evans (AE) que podía pasar a través de EM y llegar al ARC, en diferentes momentos del día. La selección de los puntos temporales se hizo con base en datos previamente reportados sobre la dinámica circadiana de los niveles de glucosa y corticosterona en circulación. Se escogió ZT2, momento en el que la concentración tanto de glucosa, como de corticosterona son la mínimas, ZT11 donde se encuentran las acrofases de ambos ritmos y ZT22 como punto intermedio).

Los niveles más altos de penetración de AE hacia el ARC y la EM se presentaron en ZT2, seguido por la penetración a ZT22; mientras que la permeabilidad a ZT11 fue la más baja (fig. 6.) La fluctuación en la permeabilidad de la BHH es coincidente de manera

inversamente proporcional con el ritmo de glucosa y corticosterona, antes reportados antes^{138,139}. Curiosamente no sólo el ARC, sino también la zona interna EM mostraron menos penetración de Evans Blue. De la misma manera, la microvasculatura que constituye la BHH en el SFO y el OVLT es diferencialmente permeable a AE dependiendo del momento del día (Fig. 7, 8). Contrastantemente, el Área postrema (AP), órgano circumventricular no hipotalámico, no presenta variación en la permeabilidad de su BHE.

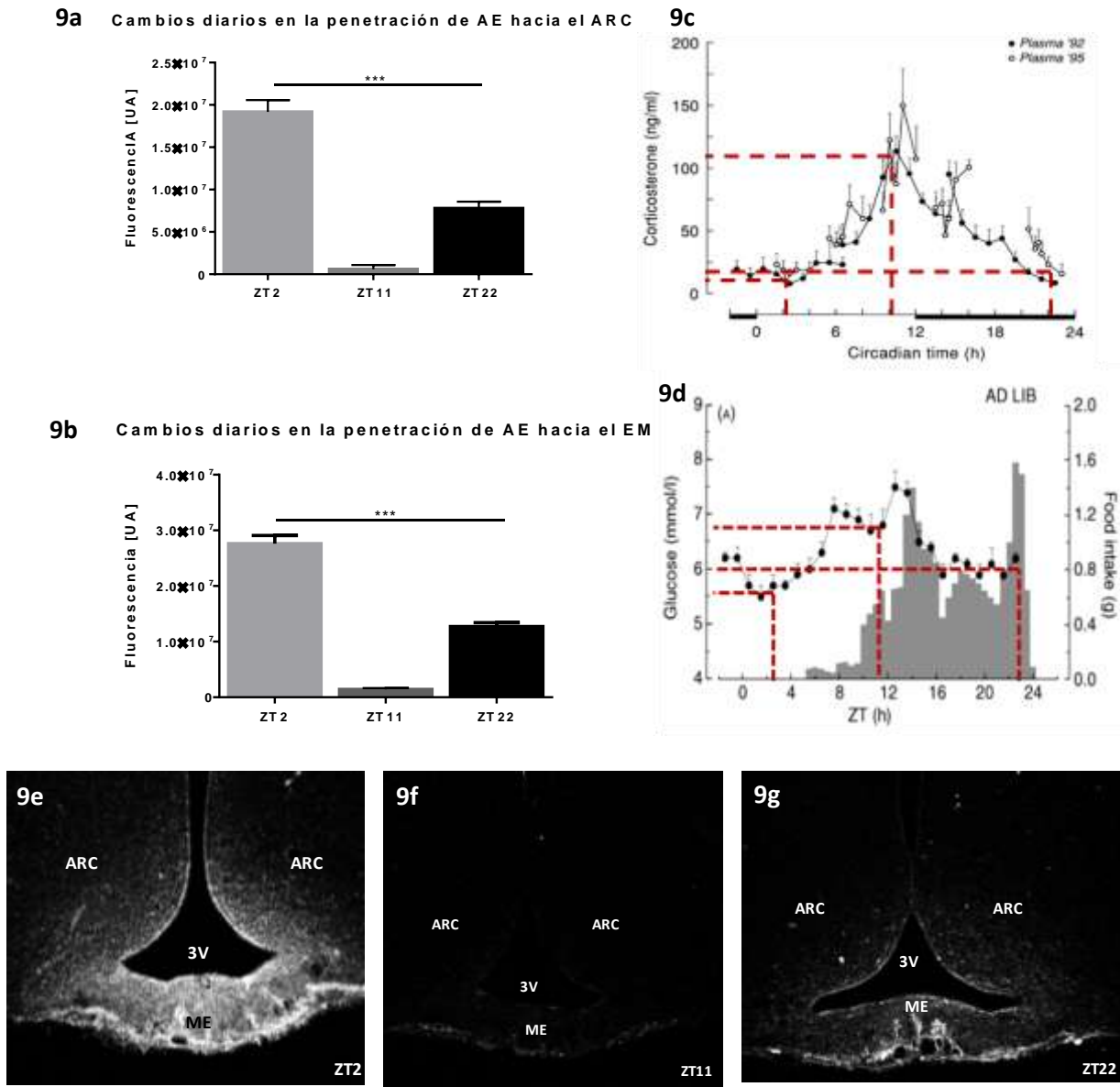
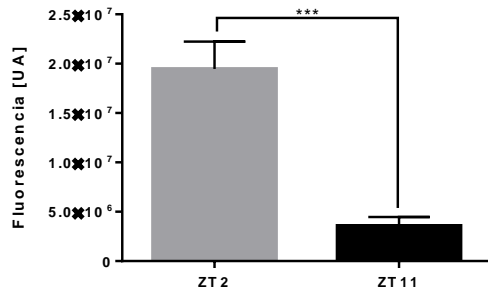
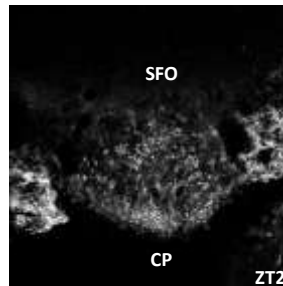


Fig. 9 Cambios diarios en la permeabilidad de la BHH . Análisis cuantitativo de la penetración de AE hacia la EM y el ARC en los tiempos ZT2, ZT11 y ZT22 (9a, 9b). La penetración hacia la EM es estadísticamente diferente a las ZT2 de las ZT22 y ZT11 (9a), también, la cantidad de AE que pudo llegar al ARC es diferente entre todos los puntos temporales (ZT2 n=3, ZT11=7, ZT22=4)(9b). 9e, 9f, 9g, Micrografías obtenidas por microscopía confocal de ratas sacrificadas a diferentes puntos temporales. Marca color blanca: Azul de Evans (AE). Gráficas del lado derecho (9c,d) muestra datos obtenidos de otros estudios¹³⁹¹³⁸. En 9c,9d se puede observar un correlación inversamente proporcional al estado de permeabilidad de la BHH.

10a
Cambios diarios en la penetración de AE hacia el SFO



10b



10c

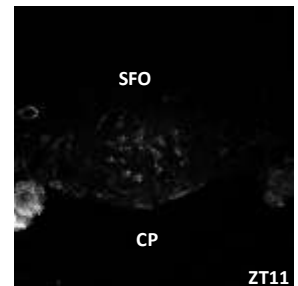
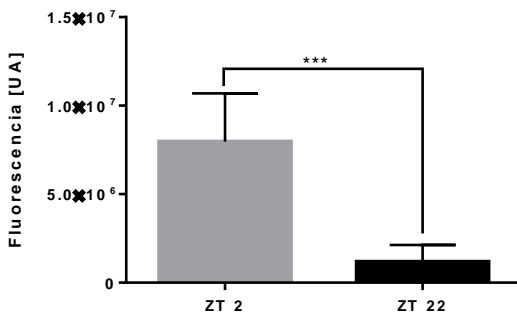
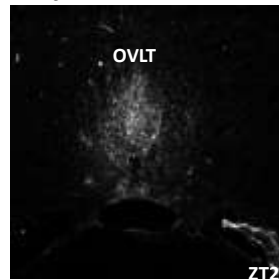


Fig. 10 Acceso de Azul de Evans al SFO, otro órgano circumventricular, también es diferente de acuerdo a la hora del día. 10a Cuantificación de la densidad óptica integrada del Azul de Evans dentro del SFO. 10b y 10c son imágenes representativas obtenidas por microscopía confocal. n=3 en cada punto temporal.

11a
Cambios diarios en la penetración de AE hacia el OVLT



11b



11c

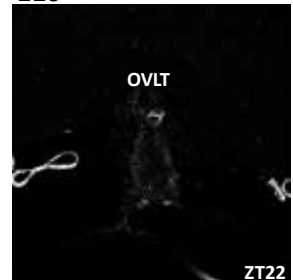


Fig. 11 Diferencias diarias en la penetración de Azul de Evans circulate hacia el OVLT. Análisis cuantitativo de la penetración del Azul de Evans hacia el OVLT 11a muestra que la barrera en el OVLT está más abierta en ZT2 que en ZT11. Lado derecho, micrografías representativas obtenidas por microscopía confocal donde la señal en blanco se encuentra más dispersa en ZT2 que en ZT22. Análisis estadístico realizado con t-student $p < 0.0001$ (ZT22 n=4, ZT2 n=3)

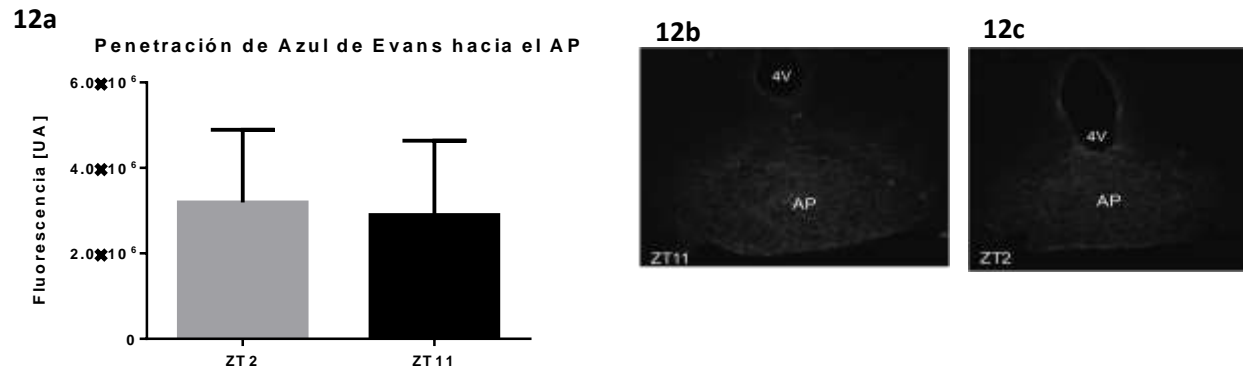


Fig. 8 Acceso de Azul de Evans desde la periferia hacia el Área Postrema no muestra diferencias día/noche. Cuantificación de densidad integrada de Azul de Evans entre ZT2 y ZT11 no presenta diferencias día noche. (ZT2 n=2 ZT11 n=2.) Lado derecho, imágenes representativas obtenidas por microscopía confocal donde la marca en blanco representa Azul de Evans.

La ablación bilateral del NSQ induce un cierre en la BHH de ARC/EM, así como la disminución de la permeabilidad en el OVLT

Con la finalidad de examinar el posible papel del NSQ en el cierre y la apertura del BHH, se realizaron lesiones electrolíticas bilaterales del NSQ (NSQxx) y posteriormente se examinó la penetración de AE en el cerebro. En la condición NSQxx se observa un cierre bilateral del BHH del complejo ARC/EM. Congruentemente, esta lesión tuvo el mismo efecto sobre la BHH del OVLT. Por cuestiones técnicas, el SFO no se analizó.

10a BHB permeability in SCNxx animals at ZT2

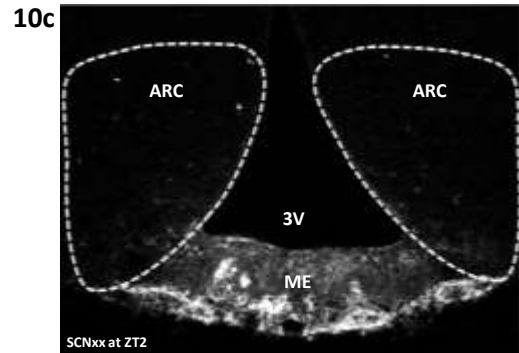
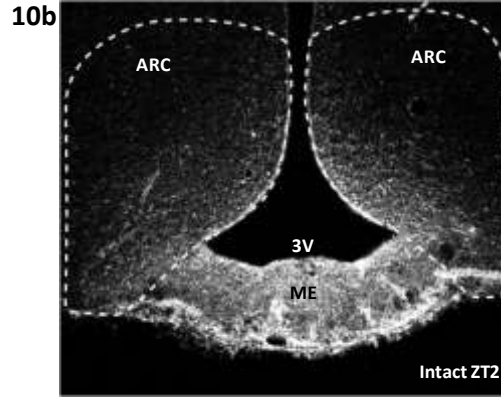
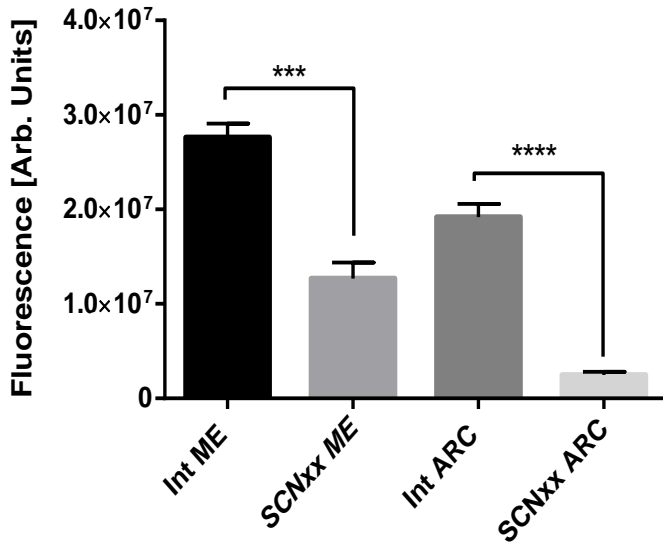


Fig. 9 BHB is bilaterally closed in bilateral lesion of the SCN. Graph in 10a shows the quantification of the Blue Evans' integrated density in each structure, after a bilateral lesion of the SCN. 10b and 10c are representative images obtained by confocal microscopy. Int ME and SCNxx ME: Median eminence from an intact animal, and from animals with the SCN bilaterally lesioned, respectively. Int ARC and SCNxx ARC, arcuate nucleus from an intact and from bilaterally lesioned animals. n=3 SCNxx and n=4 Int.

11a Permeability of OVLT in SCNxx animals

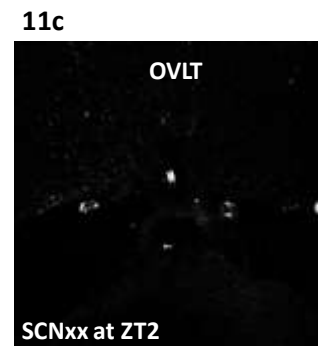
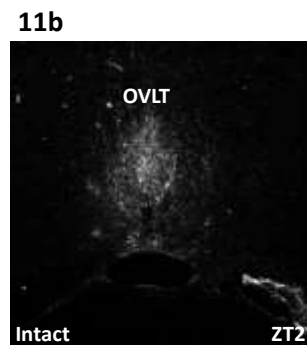
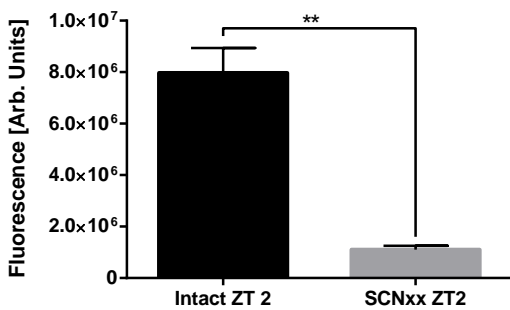


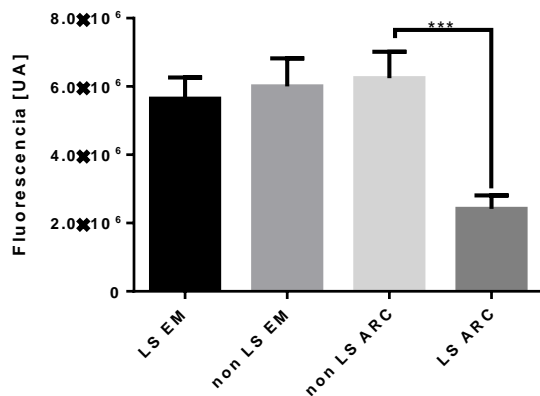
Fig. 10 Penetration into the OVLT is diminished dramatically after a bilateral lesion of the SCN. 11a. Quantification of the Integrated density of Blue Evans in the OVLT. 11b and 11c Representative images from a control and an experimental animal, respectively.

La lesión unilateral de la SCN induce un cierre ipsilateral de la BHH en la interfaz ARC/EM

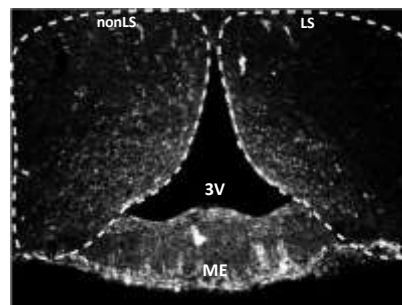
Para examinar cuales son los posibles mecanismos a través de los cuales el NSQ podría modificar la BHH se realizaron lesiones unilaterales del núcleo supraquiasmático. La eficacia de la lesión se determinó por detección de inmunoreactividad de GRP o VIP en el NSQ, usando la técnica de inmunohistoquímica post mortem (figura 12c). Después de la ablación unilateral del NSQ, la cantidad de AE que pudo penetrar en el ARC disminuyó significativamente en comparación con el lado no lesionado (non LS) en la misma rata (Fig. 12a, 12b)

12b

Permeabilidad de la BHH en ARC y EM en animales SCNx-ZT2



12b



12c



12d



Fig. 11 Eliminación electrolítica unilateral del NSQ induce un cierre ipsilateral de la BHH en ZT2. La gráfica en 13a. muestra la cuantificación del Azul de Evans que penetró hasta el ARC o EM del lado lesionado (LS) VS en lado no lesionado (nonLS). Los lados lesionados de el ARC tienen una cantidad menor de Azul de Evans en comparación con su igual contralateral. 13b. Microfotografía representativa obtenida por microscopia confocal. 13c y d. Son imágenes representativas de la lesión. Superior corte de cerebro fresco que muestra el tracto del electrodo, así como la terminal de daño encima del quiasma óptico. Fig.13d Inmunohistoquímica para GRP, uno de los neurotransmisores característicos del NSQ. Se puede apreciar cómo el lado lesionado (que correlaciona con el lado del tracto del electrodo) ha perdido reactividad para este neurotransmisor, indicando la pérdida de las neuronas de este lado del NSQ. Prueba estadística aplicada: ONE-way ANOVA, $p=0.0001$, $n=4$.

7. DISCUSIÓN

El SCN como responsable del ritmo diario en la permeabilidad de la BHH

La tarea principal del SCN es sincronizar los procesos fisiológicos del cuerpo de acuerdo al estado de actividad del individuo. Uno de los procesos importantes que el NSQ regula es la organización del flujo metabólico a lo largo del día. En la presente tesis se muestra que el acceso de una molécula circulante (AE) hacia el ARC muestra un claro patrón diario, en el que la penetración es la más alta cuando los niveles circulantes de glucosa/corticosterona (cort) son bajos (ZT2); mientras que, cuando los niveles circulantes de glucosa/cort son altos, la penetración de AE hacia el ARC es la menor (ZT11). Por último, los niveles de penetración son medios en ZT22, coincidiendo nuevamente con los niveles de glucosa o corticosterona^{2, 138}.

La penetración de EB de ME a ARC parece ser regulada por separado y no sólo por la difusión de moléculas periféricas hacia la ME en el ARC.

A través de lesiones electrolíticas unilaterales y bilaterales del NSQ, confirmamos la hipótesis de que el NSQ es capaz de influir la BHH.

Es importante enfatizar que tras una lesión unilateral, el animal sigue presentando ritmicidad en sus procesos fisiológicos de acuerdo al ciclo luz/oscuridad, mientras que tras una lesión bilateral, el ritmo circadiano de las variables fisiológicas se ve abatido⁶³. En este estudio se demostró que la eliminación unilateral del NSQ induce un cierre ipsilateral en la BHH de la interfaz ARC/EM, indicando que el NSQ puede influir sobre la barrera de manera neural (ver fig.12). Interesantemente, no sólo la cantidad de AE que logra penetrar hacia el ARC a lo largo del día cambia, sino también la cantidad de AE que entra a la EM, sugiriendo un cambio en el estado de los vasos fenestrados. Esto se ilustra por el hecho de que en ZT11, el AE es apenas detectable incluso sobre la vasculatura (ver figura 6e, g).

Por su parte, la eliminación bilateral del NSQ induce una disminución bilateral en la penetración de AE hacia la EM y el ARC en ZT2 comparado con condiciones control a la misma hora. No obstante, a pesar de que la cantidad de AE que penetró al ARC disminuyó dramáticamente comparación al animal control, no alcanza los niveles

observados en ZT11. Sin embargo, si se compara la penetración de AE al ARC/EM entre la condición ZT2 NSQxx y ZT11intacto, se observa que la eliminación total del NSQ resulta en un aumento de la penetración de AE (Fig.10).

Esto indica que aparte de abrir la BHH, el NSQ podría también ser capaz de cerrarla. Para poder saber si el NSQ es también capaz de cerrar la barrera, haría falta realizar lesiones unilateralmente del NSQ, en el que se sacrifique al animal en ZT11. Bajo estas condiciones se esperaría que en un animal ZT11-NSQxx haya más penetración de AE al ARC. De esta manera demostraríamos que el cierre de la BHH es un proceso activo y no mera consecuencia de dejar de estimular la apertura.

Ahora bien, si el NSQ fuese el único regulador actuando sobre la BHH, al eliminar bilateralmente este núcleo, se debería observar el cierre completo; sin embargo esto no sucede, indicando que existe un otra fuente distinta de regulación. Uno de los candidatos hipotéticos para llevar a cabo este otro nivel de regulación son algunas moléculas de relevancia metabólica que también fluctúan circadianamente. Entre las moléculas que podrían estar influyendo a la BHH, que también son susceptibles a la eliminación del NSQ, están por ejemplo, la corticosterona, la melatonina y glucosa. El estudio de Langlet *et. al*, refuerza esta perspectiva. En su trabajo, se observó que niveles bajos de glucosa, inducidos por 48 h de ayuno, son capaces de abrir la barrera, mientras que la infusión directa de glucosa, devuelve la permeabilidad a su estado basal⁸⁰. Sin embargo, es importante señalar que esta "apertura de la barrera" se basa en meras reorganizaciones estructurales de los capilares y sus fenestraciones. No se observaron cambios en el borde ARC/EM.

En el trabajo llevado por Langlet y colaboradores, también se muestra que la remodelación de la BHH desencadenada por cambios en la concentración plasmática de glucosa orquestados por la producción de VEGF-A tanicitario, una proteína asociada con la angiogénesis y el remodelamiento de proteínas relacionadas con las fenestraciones en los capilares⁸⁰. Múltiples enfoques adicionales podrían dársele a estos resultados. Por ejemplo, las modificaciones de la barrera también incluyen cambios en la densidad de los tanicitos β_2 , que puede ser visto en el posicionamiento de sus procesos tanicitarios sobre los capilares fenestrados. Contrastantemente, la población de tanicitos

β_1 que constituye la barrera ARC/EM no presentó cambios bajo las condiciones catabólicas, dejando la BHH intacta.

Ya que, tanto la señal circadiana del NSQ, como los factores metabólicos que llegan a la BHH, presentan un patrón temporal coincidente, resulta lógico proponer que la dinámica circadiana de los factores circulantes metabólicos refuerza el ritmo diario impuesto neuralmente por el NSQ sobre la BHH. Esto podría explicar por qué la fluctuación en la permeabilidad de la BHH es tan drástica a lo largo del día, además de que estos cambios no solo se manifiestan sobre el ARC sino sobre la EM misma.

De esta manera, el NSQ podría ser capaz de influir a la BHH a dos niveles diferentes: una vía neuronal actuando sobre el borde del ARC/EM, y la otra hormonal/metabólica a través de los efectos del NSQ sobre los niveles circulantes de glucosa o corticosterona.

Esto va en línea con nuestra hipótesis inicial de que el NSQ; a través de la regulación de la BHH, pueden modificar el acceso de las sustancias circulantes a las áreas hipotalámicas dependiendo de la hora del día.

Implicaciones metabólicas del ritmo diario en la permeabilidad en ARC/EM

Conjuntamente, las diferencias día/noche de la BHH y los cambios inducidos por lesión de NSQ en la BHH muestran que el NSQ es importante para la apertura y cierre del BHH a nivel del ARC y sugieren que los cambios en la permeabilidad, llevados a cabo por el NSQ constituyen un mecanismo a través del cual el NSQ puede influir en la variación diaria en la glucosa circulante y posiblemente en los niveles de corticosterona.

La apertura de la barrera puede resultar en niveles de glucosa circulante más bajos y cerrar la barrera en niveles circulantes más altos. La observación de Langlet de que el ayuno induce una apertura adicional de la barrera (experimentos probablemente realizados alrededor de ZT6) indica además que también los niveles de glucosa en circulación pueden tener un papel de retroalimentación en el ARC.

De hecho, estudios previos¹³⁷ indican que la participación de BHH es importante para desencadenar una respuesta contrareguladora circadiana a la hipoglucemia. Los niveles de glucosa se ajustan de manera circadiana sólo cuando se administra la 2DG i.v., pero no cuando se administra i.c.v.; sugiriendo que la BHH es un proveedor de

retroalimentación no fónica (metabólica) hacia el NSQ, que podría contribuir al ajuste de la respuesta circadiana cuando se enfrentan a un desafío metabólico.

Esta perspectiva se ve apoyada por la observación de que las condiciones metabólicas tienen la capacidad de influir sobre el estado de activación del NSQ¹⁴⁰. En estos estudios, la realimentación después de un período de ayuno induce un aumento de la actividad NSQ. Dado que bajo esas condiciones, la permeabilidad BHH ya ha sido cambiada, existe la posibilidad de que lo que esté sucediendo es que al modificarse el patrón de activación del NSQ la modificación de la BHH también ocurre.

Otras observaciones realizadas por nuestro equipo de trabajo, mostraron que la disminución en la actividad del NSQ tras una administración de glucosa se elimina tras realizar un aislamiento del NSQ y ARC por medio de una disrupción de las aferentes nerviosas de un núcleo a otro¹⁴¹. Adicionalmente, la activación del ARC seguido de ayuno o un bolo de glucosa fue también modificado completamente en los animales donde se aísla al SCN del ARC, comparados con los animales falso-operados.

Estos resultados no solo indican que la actividad neural del NSQ depende en gran parte de señales metabólicas provenientes del ARC, y que dichas señales son esenciales son esenciales para montar una respuesta contraregulatoria en respuesta a cambios metabólicos.

Otros OCVs también muestran diferencias diarias en su permeabilidad

Interesantemente, los niveles de sodio y potasio son inversamente proporcionales a los cambios en la permeabilidad de los OCVs responsables del control en el balance osmótico. Pensamos que la apertura y el cierre de la BHH también inducirán un cambio en las concentraciones de iones que pueden llegar a estos centros de regulación. Así mismo, especulamos los cambios observados en la permeabilidad de la OVLT y SFO correlacionar con interesantes observaciones realizadas en la comunicación SCN-OVLT relacionados con la conducta anticipatoria de beber, llevada a cabo antes del período de sueño¹²⁶.

En dicho estudio, los cambios en el patrón de consumo se asociaron con la actividad de las neuronas vasopresinérgicas del NSQ¹²⁶; sin embargo el surgimiento de esta

conducta anticipatoria podría ser inducida conjuntamente por cambios en la permeabilidad de la BHH, a través de los cuales el acceso de electrolitos en la circulación hacia las neuronas de las neuronas OVLT podría ser modificado.

Esto sugiere que la vasopresina proveniente del SCN podría tener un papel importante en la regulación de la BHH del OVLT y SFO. Por otra parte, es coincidente que el AP no presente cambios diarios en su barrera, con el hecho de que el NSQ no proyecta directamente hacia este OCV. Queda implícito de esta manera que las concentraciones periféricas de glucosa y corticosteroides no pueden actuar sobre la barrera de la AP

Implicaciones del control de la BHH sobre la regulación de la temperatura.

Entre las señales periféricas para la termorregulación; se encuentran: la temperatura de la piel y vísceras, señales proinflamatorias y la hora del día. Por su parte, la Temperatura corporal en reposo (T_b) también está influida por el estado de alimentación del animal y la amplitud diaria del ritmo de T_b se establece dependiendo de la situación metabólica del individuo.¹⁴²

La influencia tanto del sistema circadiano, como del metabólico sobre la T_b se reveló primeramente por observaciones de que la ingesta de alimentos induce mayor termogénesis durante la fase activa¹⁴³¹⁴⁴ y que la privación de alimentos induce una disminución de T_b al inicio de la fase de reposo¹⁴³¹⁴⁴.

El ARC está involucrado en el establecimiento de la T_b a través de aferentes nerviosas al núcleo central de termorregulación, el núcleo preóptico medial (MnPO)¹⁴²

La liberación de vasopresina de NSQ disminuye la temperatura justo antes del inicio de luz, mientras que la liberación de hormona α estimulante melanocitos (α -MSH), al final del período de oscuridad, mantiene alta temperatura.

Si la señal α -MSH es antagonizada, entonces la temperatura disminuye significativamente¹⁴². Los presentes datos aquí recolectados coinciden con esas observaciones y podrían ayudar a entender el mecanismo subyacente a la disminución de la temperatura durante el ayuno.

Estudios anteriores⁸⁰ demuestran que después de 48h de ayuno, la concentración de glucosa específicamente en el ARC aumenta dramáticamente. Si consideramos que las neuronas α -MSH anorexigénicas son inhibidas durante el ayuno, entonces las altas concentraciones de glucosa inducidas por el ayuno dentro del ARC pueden ciertamente desactivar las neuronas α -MSH más de lo normal en ZT2, suprimiendo así su papel en mantener alta temperatura.

Sería interesante examinar si en ZT11, cuando la temperatura aumenta a pesar del ayuno, el estado de permeabilidad de la BHH. Observaciones no publicadas realizadas en nuestro laboratorio muestran que efectivamente una infusión directa de glucosa en ZT2 en el ARC; da lugar a una dramática disminución de la temperatura. Además, las lesiones por SCN previenen, no sólo cambios circadianos, sino también los modificaciones en la Tb inducidos por el ayuno; lo cual concuerda con el hecho de que en los animales lesionados del NSQ, el acceso de glucosa al ARC es restringido, evitando así la inhibición de las neuronas α -MSH, permitiendo de esta manera altas temperaturas a pesar del ayuno. Este fenómeno sugiere que las bajas concentraciones de glucosa en los animales con una lesión total del NSQ, no logra abrir la BHH. Esto podría sugerir que la modificación de la barrera por factores circulantes depende de la presencia del NSQ.

Modelo sugerido

Las observaciones generadas por este estudio y algunos otros hechos establecidos, proponemos un modelo en el que los dos componentes de la BHH, (los capilares fenestrados y la población de tanicitos en la interfaz ME / ARC) están sujetos a diferentes niveles de regulación.

La frontera entre el ARC y ME podría ser regulada a través de una entrada neural directa desde el NSQ o a través de la acción del NSQ sobre el ARC. Este último también presenta un ritmo impuesto por NSQ⁶³. Los componentes vasculares podrían ser regulados por los cambios diarios en los factores metabólicos circulantes. En el modelo I (ver fig.13), la regulación de la población de tanicitaria, que forma la barrera entre el ME y el ARC, podría estar llevado a cabo por a través de distintos neurotransmisores

provenientes del NSQ. Ambos modelos convergen en los cambios vasculares comunes en los que la porción capilar fenestrada de BHH. Una vía alternativa en la detección de glucosa (Sensación alternativa de glucosa de tanicitos, en la Fig. 13) propone que los tanicitos tienen la capacidad de detectar directamente los niveles de glucosa^{23,136,145} y cambiar modificando sus procesos y cerrando o abriendo así la porción fenestrada de los vasos.

Regulación putativa de la BHH

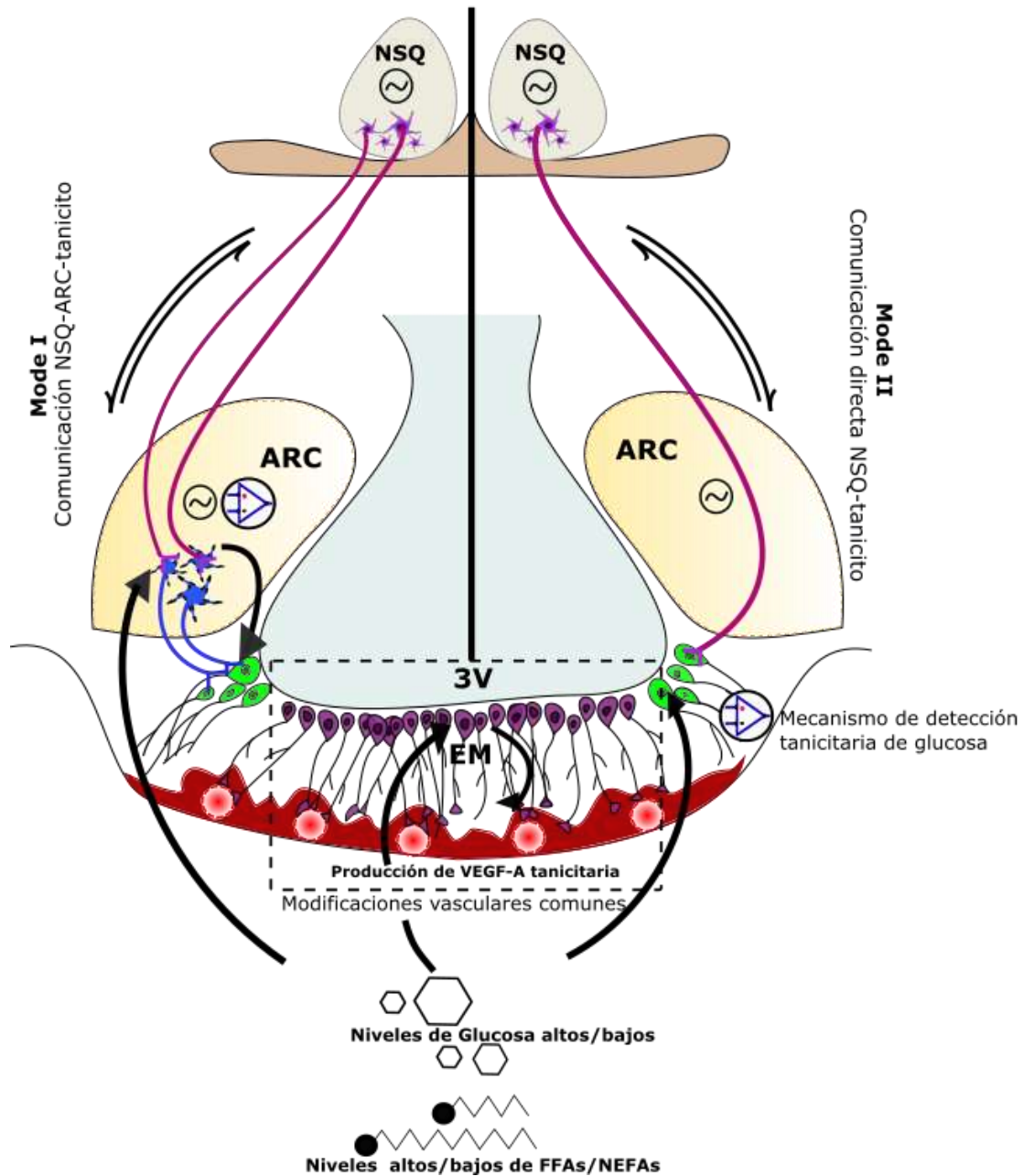


Fig. 12 Modelo sugerido para la regulación del mecanismo de apertura y cierre de la barrera hematohipotalámica sobre la interfaz ARC/EM. Se muestran dos modalidades putativas de acción, del NSQ a la BHH directamente o a través de la acción del ARC. El ARC en este caso proveería la información nutricional del organismo a la barrera. Los tanticitos $\beta 2$ en este caso, podrían responder a niveles cambiantes periféricos de glucosa. Las modificaciones vasculares comunes podrían ser inducidas por la producción tancitaria de VEGF-A. De acuerdo a reportes anteriores (Langlet, 2013) se sabe que la porción vascular puede responder a diferentes concentraciones periféricas de glucosa. No se excluye la posibilidad de que ambos mecanismos (Modalidad I y II) estén actuando concertadamente.

Adicionalmente, existe evidencia de que la modificación de los procesos de tanicitarios, que están en contacto con los capilares puede ejercer un papel regulador en la cantidad de moléculas que pueden salir de los capilares. Estas moléculas pueden regular eventos fisiológicos específicos, como la reproducción¹⁴⁶.

En condiciones homeostáticas, ambas ramas del sistema propuesto son redundantes dando lugar a cambios netos circadianos. Sin embargo, frente a un desafío metabólico como el ayuno o la alimentación en fase de reposo o niveles sostenidos de glucosa baja o alta, este sistema alternativo podría disecarse en sus componentes.

Los cambios vasculares comunes van de acuerdo con lo establecido en la hipótesis del "acoplamiento neurovascular", la cual señala que la vasculatura es remodelada de acuerdo a la demanda de energía neuronal. Esta hipótesis propone que la demanda de energía se comunica a la vasculatura (ya sea directa o indirectamente por los astrocitos o, en este caso, los tanicitos) de una manera anticipatoria, adelantada por neurotransmisores vasoactivos o productos de señalización sináptica^{147,148}.

Algunas de las señales que se han propuesto para mediar los cambios en la permeabilidad de la vasculatura en referencia a la actividad neuronal es la proporción lactato: piruvato y por lo tanto, la relación NADH: NAD⁺ citosólica; la cual está ampliamente reportada como responsable parcial de la vasodilatación durante la activación neuronal.

De esta manera, el acoplamiento neurovascular regulado por la señalización de alimentación puede ser complementado o modulado por mecanismos dependientes del metabolismo. Esto resulta de vital importancia al considerar que el cerebro de los mamíferos depende casi enteramente de la glucosa como su principal fuente de energía, en este sentido, la regulación de la adaptación rápida del flujo sanguíneo regional para ajustarse al nivel local de actividad neuronal, evitando gotas riesgosas de glucosa y Concentraciones de oxígeno¹⁴⁹. En esta línea de pensamiento, resulta factible sugerir que la BHH puede seguir un patrón de regulación similar. Sin embargo, los mecanismos celulares de la influencia de la NSQ en la BHH son desconocidos hasta ahora.

Finalmente, el hecho de que el NSQ tenga la capacidad de regular la permeabilidad de la BHH sólo ilustra las diferentes posibilidades empleadas por el NSQ para imponer su ritmo al cerebro.

8. PERSPECTIVAS

La importancia de estudiar la interacción entre el NSQ, el ARC y los OCVs, ha sido evidenciada por perturbaciones en la detección de glucosa y leptina por el ARC. Por ejemplo, se sabe que la detección de glucosa por el ARC durante el desarrollo de la obesidad está alterada, enfatizando la relevancia de conocer los mecanismos involucrados en la comunicación metabólica entre la periferia y el hipotálamo. El entender cómo se lleva a cabo la regulación de la BHH por el reloj central abre la posibilidad de entender mejor la detección de señales periféricas por uno de los núcleos más importantes en la regulación del balance metabólico, mejorando nuestras posibilidades para abordar las enfermedades derivadas de una comunicación aberrante entre la periferia y el cerebro.

Para el futuro, podría ser interesante investigar cómo el NSQ controla el ritmo circadiano de acceso de nutrientes al ARC mediante la alteración de la permeabilidad BHH y ver si los cambios circadianos en el nivel de nutrientes en el ARC podría afectar a la actividad de las neuronas locales. Además, sería interesante evaluar si una ingesta inapropiada de alimentos cambia el ritmo de acceso de los nutrientes al ARC, lo que afectaría al BHH y resultaría en puntos de referencia alterados de los niveles circulantes de glucosa. También sería interesante probar si los cambios agudos/crónicos en los niveles circulantes de glucosa y ácidos grasos libres saturados o insaturados causan efectos inmediatos/a largo plazo sobre la BHH y alteran la actividad de las neuronas ARC y su comunicación con el SCN; así como investigar cuál es la base celular de esos cambios y los neurotransmisores involucrados.

9. REFERENCIAS

1. Noback, C. R. (Charles R. *The human nervous system : structure and function*. (Humana Press, 2005).
2. Kalsbeek, A., Yi, C.-X., Fleur, S. E. La & Fliers, E. The hypothalamic clock and its control of glucose homeostasis. doi:10.1016/j.tem.2010.02.005
3. Hastings, M. H., Reddy, A. B. & Maywood, E. S. A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 649–661 (2003).
4. Buijs, R. M. *et al.* Chapter 20: Organization of circadian functions: interaction with the body. *Prog. Brain Res.* **153**, 341–360 (2006).
5. Perreau-Lenz, S. *et al.* Suprachiasmatic control of melatonin synthesis in rats: inhibitory and stimulatory mechanisms. *Eur. J. Neurosci.* **17**, 221–228 (2003).
6. Jasper, M. & Engeland, W. Splanchnic neural activity modulates ultradian and circadian rhythms in adrenocortical secretion in awake rats. *Neuroendocrinology* (1994).
7. Silver, Rae LeSauter, Joseph Tresco, Patrick A Lehman, M. N. A diffusible coupling signal from the transplanted suprachiasmatic nucleus controlling circadian locomotor rhythms. *Nature* **382**, 810–813 (1996).
8. Kraves, S. & Weitz, C. J. A role for cardiotrophin-like cytokine in the circadian control of mammalian locomotor activity. *Nat. Neurosci.* **9**, 212–219 (2006).
9. Meyer-Bernstein, E. L. *et al.* Effects of Suprachiasmatic Transplants on Circadian Rhythms of Neuroendocrine Function in Golden Hamsters ¹. *Endocrinology* **140**, 207–218 (1999).
10. Eckel-Mahan, K. & Sassone-Corsi, P. METABOLISM AND THE CIRCADIAN CLOCK CONVERGE.
11. Lowrey, P. L. & Takahashi, J. S. Genetics of Circadian Rhythms in Mammalian Model Organisms. doi:10.1016/B978-0-12-387690-4.00006-4
12. Shinohara, K., Tominaga, K., Isobe, Y. & Inouye, S. T. Photic Regulation of Peptides Located in the Ventrolateral Subdivision of the Suprachiasmatic Nucleus of the Rat: Daily Variations of Vasoactive Intestinal Polypeptide, Gastrin-releasing Peptide, and Neuropeptide Y. *J. Neurosci.* **13**, 793–800 (1993).
13. Harmar, A. J. *et al.* The VPAC2 Receptor Is Essential for Circadian Function in the Mouse Suprachiasmatic Nuclei. *Cell* **109**, 497–508 (2002).
14. Colwell, C. S. *et al.* Disrupted circadian rhythms in VIP-and PHI-deficient mice.
15. Albus, H. *et al.* A GABAergic mechanism is necessary for coupling dissociable ventral and

- dorsal regional oscillators within the circadian clock. *Curr. Biol.* **15**, 886–93 (2005).
16. Colwell, C. S. Linking neural activity and molecular oscillations in the SCN. *Nat. Rev. Neurosci.* **12**, 553–569 (2011).
 17. Lee, I. T. *et al.* Neuromedin S-Producing Neurons Act as Essential Pacemakers in the Suprachiasmatic Nucleus to Couple Clock Neurons and Dictate Circadian Rhythms. *Neuron* **85**, 1086–1102 (2015).
 18. Buijs, F. N. *et al.* The Circadian System: A Regulatory Feedback Network of Periphery and Brain. *Physiology (Bethesda)*. **31**, 170–81 (2016).
 19. Meijer, J. H., Schaap, J., Watanabe, K. & Albus, H. Multiunit activity recordings in the suprachiasmatic nuclei: in vivo versus in vitro models. *Brain Res.* **753**, 322–327 (1997).
 20. Meijer, J. H. *et al.* Light Responsiveness of the Suprachiasmatic Nucleus: Long-Term Multiunit and Single-Unit Recordings in Freely Moving Rats.
 21. Greep, R. O. & Aurbach, G. D. *Proceedings of the 1983 Laurentian hormone conference.*
 22. Deboer, T., Vansteensel, M. J., D  t  ri, L. & Meijer, J. H. Sleep states alter activity of suprachiasmatic nucleus neurons. *Nat. Neurosci.* **6**, 1086–1090 (2003).
 23. Elizondo-Vega, R. *et al.* The role of tanycytes in hypothalamic glucosensing.
doi:10.1111/jcmm.12590
 24. Borg, W. P. *et al.* Ventromedial hypothalamic lesions in rats suppress counterregulatory responses to hypoglycemia. *J. Clin. Invest.* **93**, 1677–1682 (1994).
 25. Leibowitz, S. F., Roossin, P. & Rosenn, M. Chronic norepinephrine injection into the hypothalamic paraventricular nucleus produces hyperphagia and increased body weight in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **21**, 801–808 (1984).
 26. ANAND, B. K., CHHINA, G. S., SHARMA, K. N., DUA, S. & SINGH, B. ACTIVITY OF SINGLE NEURONS IN THE HYPOTHALAMIC FEEDING CENTERS: EFFECT OF GLUCOSE. *Am. J. Physiol.* **207**, 1146–54 (1964).
 27. Oomura, Y. *et al.* Reciprocal Activities of the Ventromedial and Lateral Hypothalamic Areas of Cats Hypothalamic Areas of Cats. *Source Sci. New Ser. Clin. Sci. Biochem. Biophys Downit Biol. Chem. J. Clin. Invest. Clin. Sci. Am. J. Dig. Biochem. Biophys L. E. Rosenberg, S. Downit Biol. Chem. J. Clin. Invest* **143**, 484–485 (1964).
 28. Yang, X. J., Kow, L. M., Funabashi, T. & Mobbs, C. V. Hypothalamic glucose sensor: similarities to and differences from pancreatic beta-cell mechanisms. *Diabetes* **48**, 1763–72 (1999).
 29. Oomura Y; Ono T; Ooyama H; Wayner MJ. Glucose and Osmosensitive Neurones of the Rat Hypothalamus. *Nature* **222**, 282–4 (1969).

30. Yang, X.-J., Kow, L.-M., Pfaff, D. W. & Mobbs, C. V. Metabolic Pathways That Mediate Inhibition of Hypothalamic Neurons by Glucose.
31. Oomura, Y., Yoshimatsu, H. & Oomura, Y. Neural network of glucose monitoring system. *J. Auton. Nerv. Syst.* **10**, 359–372 (1984).
32. Laura Steinbusch, Gwenael Laboue`be, and B. T. Brain glucose sensing in homeostatic and hedonic regulation.
33. De Vries, M. G., Arseneau, L. M., Lawson, M. E. & Beverly, J. L. Extracellular Glucose in Rat Ventromedial Hypothalamus During Acute and Recurrent Hypoglycemia.
34. Dunn-Meynell, A. A. *et al.* Behavioral/Systems/Cognitive Relationship among Brain and Blood Glucose Levels and Spontaneous and Glucoprivic Feeding. doi:10.1523/JNEUROSCI.0334-09.2009
35. Mcnay, E. C., Mccarty, R. C. & Gold, P. E. Fluctuations in Brain Glucose Concentration during Behavioral Testing: Dissociations between Brain Areas and between Brain and Blood. *Neurobiol. Learn. Mem.* **75**, 325–337 (2001).
36. Thorens, B. in 277–294 (Springer Berlin Heidelberg, 2012). doi:10.1007/978-3-642-24716-3_12
37. Thorens, B. Neural regulation of pancreatic islet cell mass and function. *Diabetes, Obes. Metab.* **16**, 87–95 (2014).
38. Cannon, B. & Nedergaard, J. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance.
39. Geerling, J. J. *et al.* Sympathetic nervous system control of triglyceride metabolism: novel concepts derived from recent studies. *J. Lipid Res.* **55**, 180–189 (2014).
40. Nonogaki, K. New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism. *Diabetologia* **43**, 533–549 (2000).
41. Buijs, F. N. *et al.* Suprachiasmatic Nucleus Interaction with the Arcuate Nucleus; Essential for Organizing Physiological Rhythms. *eneuro* ENEURO.0028-17.2017 (2017). doi:10.1523/ENEURO.0028-17.2017
42. Green, C. B., Takahashi, J. S. & Bass, J. The Meter of Metabolism. *Cell* **134**, 728–742 (2008).
43. Kumar Jha, P., Challet, E. & Kalsbeek, A. Circadian rhythms in glucose and lipid metabolism in nocturnal and diurnal mammals. *Mol. Cell. Endocrinol.* **418**, 74–88 (2015).
44. Nagai, K., Nagai, N., Sugahara, K., Nijijima, A. & Nakagawa, H. Circadian rhythms and energy metabolism with special reference to the suprachiasmatic nucleus. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **18**, 579–584 (1994).

45. Kalsbeek, A. & Strubbe, J. H. Circadian control of insulin secretion is independent of the temporal distribution of feeding. *Physiol. Behav.* **63**, 553–8 (1998).
46. La Fleur, S. E., Kalsbeek, A., Wortel, J. & Buijs, R. M. A suprachiasmatic nucleus generated rhythm in basal glucose concentrations. *J. Neuroendocrinol.* **11**, 643–52 (1999).
47. Cailotto, C. *et al.* The suprachiasmatic nucleus controls the daily variation of plasma glucose via the autonomic output to the liver: are the clock genes involved? *Eur. J. Neurosci.* **22**, 2531–2540 (2005).
48. La Fleur, S. E., Kalsbeek, A., Wortel, J., Fekkes, M. L. & Buijs, R. M. A Daily Rhythm in Glucose Tolerance A Role for the Suprachiasmatic Nucleus.
49. Fujii, T., Inoue, S., Nagai, K. & Nakagawa, H. Involvement of Adrenergic Mechanism in Hyperglycemia Due to SCN Stimulation. *Horm. Metab. Res.* **21**, 643–645 (1989).
50. Buijs, R. M. & Kalsbeek, A. Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 521–526 (2001).
51. Cowley, M. A. *et al.* The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* **37**, 649–661 (2003).
52. Cone, R. D. *et al.* The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **25 Suppl 5**, S63–S67 (2001).
53. Minor, R. K., Chang, J. W. & De Cabo, R. Hungry for Life: How the arcuate nucleus and neuropeptide Y may play a critical role in mediating the benefits of calorie restriction. doi:10.1016/j.mce.2008.10.044
54. Woods, S. C., Seeley, R. J., Porte, D. & Schwartz, M. W. Signals That Regulate Food Intake and Energy Homeostasis.
55. Broberger, C., Johansen, J., Johansson, C., Schalling, M. & Hkfelt, T. The neuropeptide Y₁ gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Neurobiology* **95**, 15043–15048 (1998).
56. Hahn, T. M., Breininger, J. F., Baskin, D. G. & Schwartz, M. W. Coexpression of Agrp and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons.
57. Pinto, S. *et al.* Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. *Science* **304**, 110–115 (2004).
58. Ziotopoulou, M., Mantzoros, C. S., Hileman, S. M. & Flier, J. S. Differential expression of hypothalamic neuropeptides in the early phase of diet-induced obesity in mice.
59. Muroya, S., Yada, T., Shioda, S. & Takigawa, M. Glucose-sensitive neurons in the rat arcuate nucleus contain neuropeptide Y. *Neurosci. Lett.* **264**, 113–116 (1999).

60. Ibrahim, N. *et al.* Hypothalamic Proopiomelanocortin Neurons Are Glucose Responsive and Express K_{ATP} Channels. *Endocrinology* **144**, 1331–1340 (2003).
61. Parton, L. E. *et al.* Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. *Nature* **449**, 228–232 (2007).
62. Routh, V. H., Hao, L., Santiago, A. M., Sheng, Z. & Zhou, C. Hypothalamic glucose sensing: making ends meet. *Front. Syst. Neurosci.* **8**, 236 (2014).
63. Guzmán-Ruiz, M. *et al.* The suprachiasmatic nucleus changes the daily activity of the arcuate nucleus α -MSH neurons in male rats. *Endocrinology* **155**, 525–535 (2014).
64. Abbott, N. J., Rönnbäck, L. & Hansson, E. Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* **7**, 41–53 (2006).
65. el-Bacha, R. S. & Minn, A. Drug metabolizing enzymes in cerebrovascular endothelial cells afford a metabolic protection to the brain. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*. **45**, 15–23 (1999).
66. Cserr, H. F. & Bundgaard, M. Blood-brain interfaces in vertebrates: a comparative approach. *Am. J. Physiol.* **246**, R277-88 (1984).
67. Hawkins, B. T. & Davis, T. P. The Blood-Brain Barrier/Neurovascular Unit in Health and Disease. doi:10.1124/pr.57.2.4
68. Wolburg, H. & Lippoldt, A. Tight junctions of the blood–brain barrier: Development, composition and regulation.
69. Thorens, B. & Mueckler, M. Glucose transporters in the 21st Century.
70. Simpson, I. A., Vannucci, S. J., DeJoseph, M. R. & Hawkins, R. A. Glucose transporter asymmetries in the bovine blood-brain barrier. *J. Biol. Chem.* **276**, 12725–9 (2001).
71. Devraj, K. *et al.* GLUT-1 glucose transporters in the blood-brain barrier: Differential phosphorylation. *J. Neurosci. Res.* **89**, 1913–1925 (2011).
72. Uldry, M., Ibberson, M. & Horisberger, J. Identification of a mammalian H⁺-myo-inositol symporter expressed predominantly in the brain. *EMBO* (2001).
73. Rodríguez, E. M., Blázquez, J. L. & Guerra, M. The design of barriers in the hypothalamus allows the median eminence and the arcuate nucleus to enjoy private milieus: The former opens to the portal blood and the latter to the cerebrospinal fluid. *Peptides* **31**, 757–776 (2010).
74. Weindl, A. Neuroendocrine aspects of circumventricular organs. *Front. Neuroendocrinol.* (1973).
75. Djogo, T. *et al.* Adult NG2-Glia Are Required for Median Eminence-Mediated Leptin Sensing and Body Weight Control. *Cell Metab.* (2016). doi:10.1016/j.cmet.2016.04.013

76. Hypothalamic Tanycytes: A Key Component of Brain–Endocrine Interaction.
77. Levin, B. E., Routh, V. H., Kang, L., Sanders, N. M. & Dunn-Meynell, A. A. Perspectives in Diabetes Neuronal Glucosensing What Do We Know After 50 Years? GLUCOSENSING NEURONS INTEGRATE A VARIETY OF TIME-AND CONCENTRATION-DEPENDENT PATTERNS OF GLUCOSE CHANGE.
78. Ciofi, P. *et al.* Brain-endocrine interactions: A microvascular route in the mediobasal hypothalamus. *Endocrinology* **150**, 5509–5519 (2009).
79. Flier, J. S. *et al.* Obesity Wars. *Cell* **116**, 337–350 (2004).
80. Langlet, F. *et al.* Tanycytic VEGF-A boosts blood-hypothalamus barrier plasticity and access of metabolic signals to the arcuate nucleus in response to fasting. *Cell Metab.* **17**, 607–617 (2013).
81. Mullier, A., Bouret, S. G., Prevot, V. & Dehouck, B. Differential distribution of tight junction proteins suggests a role for tanycytes in blood-hypothalamus barrier regulation in the adult mouse brain. *J. Comp. Neurol.* **518**, 943–962 (2010).
82. Rodriguez M., Esteban, L., Blazquez, Juan, Guerra, M. The design of barriers in the hypothalamus allows the median eminence and the arcuate nucleus to enjoy private milieus: The former opens to the portal blood and the latter to the cerebrospinal fluid.
83. Michael W. Schwartz*, Stephen C. Woods†, Daniel Porte Jr*, R. J. S. & D. G. B. Central nervous system control of food intake.
84. Altman, J. & Bayer, S. A. Development of the diencephalon in the rat. II. Correlation of the embryonic development of the hypothalamus with the time of origin of its neurons. *J. Comp. Neurol.* **182**, 973–93 (1978).
85. Akmayev, I., Popov, A. & Akmayev, I. G. Cell and Tissue Research Morphological Aspects of the Hypothalamic-Hypophyseal System VII. The Tanycytes: Their Relation to the Hypophyseal Adrenocorticotrophic Function. An Ultrastructural Study. *Cell Tiss. Res* **180**, 263–282 (1977).
86. Garcia, M. de los A. *et al.* Elevated expression of glucose transporter-1 in hypothalamic ependymal cells not involved in the formation of the brain-cerebrospinal fluid barrier. *J. Cell. Biochem.* **80**, 491–503 (2001).
87. Rodriguez, E. M., Gonzalez, C. B. & Delannoy, L. Cellular organization of the lateral and postinfundibular regions of the median eminence in the rat. *Cell Tissue Res.* **201**, 377–408 (1979).
88. Amat, P. *et al.* Lateral evaginations from the third ventricle into the rat mediobasal hypothalamus: an amplification of the ventricular route. *Neuroscience* **88**, 673–677 (1999).

89. Krisch, B., Leonhardt, H. & Buchheim, W. The functional and structural border of the neurohemal region of the median eminence. *Cell Tissue Res.* **192**, 327–339 (1978).
90. Rodríguez, E. M. *et al.* Hypothalamic tanycytes: A key component of brain-endocrine interaction. *Int. Rev. Cytol.* **247**, 89–164 (2005).
91. Rodríguez, E., Pena, P. & Rodríguez, S. Evidence for the Participation of the CSF and Periventricular Structures in Certain Neuroendocrine Mechanisms¹. *Fluid ...* (1981).
92. Peruzzo, B. *et al.* A second look at the barriers of the medial basal hypothalamus. *Exp. Brain Res.* **132**, 10–26 (2000).
93. OLNEY, J. W. GLUTAMATE-INDUCED NEURONAL NECROSIS IN THE INFANT MOUSE HYPOTHALAMUS. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **30**, 75–90 (1971).
94. Olney, J. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science (80-)*. (1969).
95. Hu, L., Fernstrom, J. & Goldsmith, P. Exogenous glutamate enhances glutamate receptor subunit expression during selective neuronal injury in the ventral arcuate nucleus of postnatal mice. *Neuroendocrinology* (1998).
96. Bodnár, I. *et al.* Effect of neonatal treatment with monosodium glutamate on dopaminergic and L-DOPA-ergic neurons of the medial basal hypothalamus and on prolactin and MSH secretion of rats. *Brain Res. Bull.* **55**, 767–774 (2001).
97. Arluison, M. *et al.* Distribution and anatomical localization of the glucose transporter 2 (GLUT2) in the adult rat brain—an immunohistochemical study. *J. Chem. Neuroanat.* **28**, 117–136 (2004).
98. Lynch, R. M., Tompkins, L. S., Brooks, H. L., Dunn-Meynell, A. A. & Levin, B. E. Localization of glucokinase gene expression in the rat brain. *Diabetes* **49**, 693–700 (2000).
99. Dunn-Meynell, A. A., Rawson, N. E. & Levin, B. E. Distribution and phenotype of neurons containing the ATP-sensitive K⁺ channel in rat brain. *Brain Res.* **814**, 41–54 (1998).
100. Navarro, M. *et al.* Colocalization of Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) Receptors, Glucose Transporter GLUT-2, and Glucokinase mRNAs in Rat Hypothalamic Cells: Evidence for a Role of GLP-1 Receptor Agonists as an Inhibitory Signal for Food and Water Intake. *J. Neurochem.* **67**, 1982–1991 (2002).
101. O'Malley, D., Reimann, F., Simpson, A. K. & Gribble, F. M. Sodium-Coupled Glucose Cotransporters Contribute to Hypothalamic Glucose Sensing. *Diabetes* **55**, 3381–3386 (2006).
102. Silver, I. A. & Erecińska, M. Glucose-induced intracellular ion changes in sugar-sensitive hypothalamic neurons. *J. Neurophysiol.* **79**, 1733–45 (1998).

103. Fioramonti, X., Song, Z., Vazirani, R. P., Beuve, A. & Routh, V. H. Hypothalamic Nitric Oxide in Hypoglycemia Detection and Counterregulation: A Two-Edged Sword. *Antioxid. Redox Signal.* **14**, 505–517 (2011).
104. Takashi Matsuda¹, Takeshi Y Hiyama, Fumio Niimura, Taiji Matsusaka⁴, A. F. & Kenta Kobayashi, K. K. & M. N. Distinct neural mechanisms for the control of thirst and salt appetite in the subfornical organ. *Nature* **20**, (2016).
105. McKinley, M. The sensory circumventricular organs of the mammalian brain: subfornical organ, OVLT and area postrema. (2003).
106. Hiyama, T. Y., Watanabe, E., Okado, H. & Noda, M. The Subfornical Organ is the Primary Locus of Sodium-Level Sensing by Nax Sodium Channels for the Control of Salt-Intake Behavior. *J. Neurosci.* **24**, 9276–9281 (2004).
107. Zardetto-Smith, A. M. *et al.* Role of the central nucleus of the amygdala and bed nucleus of the stria terminalis in experimentally-induced salt appetite. *Brain Res.* **645**, 123–34 (1994).
108. Johnson, A. K. & Buggy, J. Periventricular preoptic-hypothalamus is vital for thirst and normal water economy. *Am. J. Physiol.* **234**, R122-9 (1978).
109. McKinley, M. J. *et al.* Efferent neural pathways of the lamina terminalis subserving osmoregulation. *Prog. Brain Res.* **91**, 395–402 (1992).
110. Ramsay, D. J., Thrasher, T. N. & Keil, L. C. in *Progress in brain research* **60**, 91–98 (1983).
111. Bourque, C. W., Ciura, S., Trudel, E., Stachniak, T. J. E. & Sharif-Naeini, R. Neurophysiological characterization of mammalian osmosensitive neurones. *Exp. Physiol.* **92**, 499–505 (2007).
112. Ciura, S. & Bourque, C. W. Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Is Required for Intrinsic Osmoreception in Organum Vasculosum Lamina Terminalis Neurons and for Normal Thirst Responses to Systemic Hyperosmolality. *J. Neurosci.* **26**, 9069–9075 (2006).
113. Vivas, L., Chiaraviglio, E. & Carrer, H. F. Rat organum vasculosum laminae terminalis in vitro: responses to changes in sodium concentration. *Brain Res.* **519**, 294–300 (1990).
114. Richard, D. & Bourque, C. W. Synaptic control of rat supraoptic neurones during osmotic stimulation of the organum vasculosum lamina terminalis in vitro. *J. Physiol.* **489**, 567–577 (1995).
115. Camacho, A. & Phillips, M. I. Horseradish peroxidase study in rat of the neural connections of the organum vasculosum of the lamina terminalis. *Neurosci. Lett.* **25**, 201–4 (1981).
116. McKinley, M. J. *et al.* in 395–402 (1992). doi:10.1016/S0079-6123(08)62358-4

117. Saker, P. *et al.* Regional brain responses associated with drinking water during thirst and after its satiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 5379–84 (2014).
118. Hollis, J. H., McKinley, M. J., D'Souza, M., Kampe, J. & Oldfield, B. J. The trajectory of sensory pathways from the lamina terminalis to the insular and cingulate cortex: a neuroanatomical framework for the generation of thirst. *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.* **294**, R1390–R1401 (2008).
119. Price, C. J., Hoyda, T. D. & Ferguson, A. V. The Area Postrema: A Brain Monitor and Integrator of Systemic Autonomic State. *Neurosci.* **14**, 182–194 (2008).
120. CHRISTOPHER J. PRICE, TED D. HOYDA, and A. V. F. The Area Postrema: A Brain Monitor and Integrator of Systemic Autonomic State. *Neurosci.* **14**, (2008).
121. Travaglini, R. A. The nucleus tractus solitarius: an integrative centre with 'task-matching' capabilities. *J. Physiol.* **582**, 471 (2007).
122. YLITALO, P., KARPPANEN, H. & PAASONEN, M. K. Is the Area Postrema a Control Centre of Blood Pressure? *Nature* **247**, 58–59 (1974).
123. Miselis, R. R. The efferent projections of the subfornical organ of the rat: a circumventricular organ within a neural network subserving water balance. *Brain Res.* **230**, 1–23 (1981).
124. Trudel, E. & Bourque, C. W. A rat brain slice preserving synaptic connections between neurons of the suprachiasmatic nucleus, organum vasculosum lamina terminalis and supraoptic nucleus. *J. Neurosci. Methods* **128**, 67–77 (2003).
125. Yi, C. X. *et al.* Ventromedial arcuate nucleus communicates peripheral metabolic information to the suprachiasmatic nucleus. *Endocrinology* **147**, 283–294 (2006).
126. Gizowski, C., Zaelzer, C. & Bourque, C. W. Clock-driven vasopressin neurotransmission mediates anticipatory thirst prior to sleep. *Nature* **537**, 685–688 (2016).
127. Buijs, F. N. *et al.* Suprachiasmatic Nucleus Interaction with the Arcuate Nucleus; Essential for Organizing Physiological Rhythms. *eneuro* ENEURO.0028-17.2017 (2017). doi:10.1523/ENEURO.0028-17.2017
128. Chauvet, N., Parmentier, M. L. & Alonso, G. Transected axons of adult hypothalamo-neurohypophysial neurons regenerate along tancytic processes. *J. Neurosci. Res.* **41**, 129–144 (1995).
129. Flament-Durand, J. & Brion, J. P. in 121–155 (1985). doi:10.1016/S0074-7696(08)60596-3
130. Akmayev, I. G. & Popov, A. P. Morphological aspects of the hypothalamic-hypophyseal system. *Cell Tissue Res.* **180**, 263–282 (1977).
131. Coppola, A. *et al.* A Central Thermogenic-like Mechanism in Feeding Regulation: An

- Interplay between Arcuate Nucleus T3 and UCP2. *Cell Metab.* **5**, 21–33 (2007).
132. Cortes-Campos, C. *et al.* MCT2 Expression and Lactate Influx in Anorexigenic and Orexigenic Neurons of the Arcuate Nucleus. *PLoS One* **8**, e62532 (2013).
 133. Millán, C. *et al.* Glial glucokinase expression in adult and post-natal development of the hypothalamic region. *ASN Neuro* **2**, e00035 (2010).
 134. García, M. A. *et al.* Hypothalamic ependymal-glial cells express the glucose transporter GLUT2, a protein involved in glucose sensing. *J. Neurochem.* **86**, 709–24 (2003).
 135. Salgado, M. *et al.* Dynamic Localization of Glucokinase and Its Regulatory Protein in Hypothalamic Tanycytes. *PLoS One* **9**, (2014).
 136. Frayling, C., Britton, R. & Dale, N. ATP-mediated glucosensing by hypothalamic tanycytes. *J Physiol* **5899**, 2275–2286 (2011).
 137. Herrera-Moro Chao, D. *et al.* The Suprachiasmatic Nucleus Modulates the Sensitivity of Arcuate Nucleus to Hypoglycemia in the Male Rat. *Endocrinology* **157**, 3439–3451 (2016).
 138. la Fleur, S. E. Daily rhythms in glucose metabolism: Suprachiasmatic nucleus output to peripheral tissue. *J. Neuroendocrinol.* **15**, 315–322 (2003).
 139. Kalsbeek, A., van Heerikhuize, J. J., Wortel, J. & Buijs, R. M. A diurnal rhythm of stimulatory input to the hypothalamo-pituitary-adrenal system as revealed by timed intrahypothalamic administration of the vasopressin V1 antagonist. *J. Neurosci.* **16**, 5555–65 (1996).
 140. Saderi, N. *et al.* The NPY intergeniculate leaflet projections to the suprachiasmatic nucleus transmit metabolic conditions. *Neuroscience* **246**, 291–300 (2013).
 141. Buijs, F. N., Basualdo, M. C., Escobar, C. & Buijs, R. M. nucleus is essential for circadian rhythmicity Submission PDF. **I**,
 142. Guzmán-Ruiz, M. A. *et al.* Role of the Suprachiasmatic and Arcuate Nuclei in Diurnal Temperature Regulation in the Rat. *J. Neurosci.* **35**, 15419–29 (2015).
 143. Liu, S. *et al.* Involvement of the suprachiasmatic nucleus in body temperature modulation by food deprivation in rats. *Brain Res.* **929**, 26–36 (2002).
 144. Tokizawa, K., Uchida, Y. & Nagashima, K. Thermoregulation in the cold changes depending on the time of day and feeding condition: physiological and anatomical analyses of involved circadian mechanisms. *Neuroscience* (2009).
doi:10.1016/j.neuroscience.2009.08.040
 145. Bolborea, M. & Dale, N. Hypothalamic tanycytes: potential roles in the control of feeding and energy balance. *Trends Neurosci.* **36**, 91–100 (2013).
 146. Parkash, J. *et al.* Semaphorin7A regulates neuroglial plasticity in the adult hypothalamic

- median eminence. *Nat. Commun.* **6**, 6385 (2015).
147. Mergenthaler, P., Lindauer, U., Dienel, G. A. & Meisel, A. Sugar for the brain: The role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends Neurosci.* **36**, 587–597 (2013).
 148. Attwell, D. *et al.* Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature* **468**, 232–43 (2010).
 149. Gordon, G. R. J., Howarth, C. & MacVicar, B. A. Bidirectional control of arteriole diameter by astrocytes. *Exp. Physiol.* **96**, 393–399 (2011).
 150. Balland, E. *et al.* Hypothalamic Tanycytes Are an ERK-Gated Conduit for Leptin into the Brain. *Cell Metab.* **19**, 293–301 (2014).

10. ANEXO

Standarization of the confocal settings to obtain images for analysis

In the aim to get images without saturation we employed the next optical parameters

Detector Gain=981

Amp= -0.635

Pinhole=51.8 μ m

Zoom=0.7

An image it is the result a sequential scanning and averaging. The scan was made 8 times.

Image processing and analysis

The images were obtained in LSM format and processed in Fiji® to convert the image into RGB stack image.

Considering that the obtained image contains different vectors that are represented as pixels, we discard all them that were into the rage from 0 to 25 and only took into account those from 26 to 255, the maximum intensity in RGB stack format.

Doing this we are quantifying the real signal that is positive and we get the direct value of the Integrated Density which is not in function of the area therefore is not needed to standardize the intensity per area. The background was subtracted as a meaning of 3 measurements each time.

To do the area selection we employed an angle of 45 degrees that would delimit the border between ME an ARC.