



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**LA CINASA SPAK CONTRIBUYE A REGULAR LA ACTIVIDAD
NEURONAL EN EL NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

VANESSA ISABEL ROMERO ESTRADA



**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MARÍA DE JESÚS CHÁVEZ CANALES
Ciudad Universitaria, CD. MX., 2023**



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.

Reconocimientos

Este trabajo fue posible gracias al apoyo técnico de la Q.F.B. Norma Vázquez, del Instituto de Investigaciones Biomédicas, a las Biólogas Diana Millán y Marcela Palomero del Instituto de Fisiología Celular. Al MVZ. Jorge Omar García y al Dr. Víctor Daniel Garzón Cortés de la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Al personal adscrito al Departamento de Patología del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, al Dr. Alberto Aranda, Olga Pérez y Benito Chávez y al apoyo de la MVZ. Mariela Contreras. Al personal del Departamento de Investigación Experimental y Bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Este trabajo se realizó gracias a la colaboración con la Dra. Erika Moreno del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán y con el financiamiento otorgado por parte de la DGAPA/PAPIIT (Proyecto IA208522) y por el CONACYT (Proyectos 87794 y 845144).

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la oportunidad de tener una educación de calidad.

Agradecimientos

Esta tesis se la dedico a mi madre María Estrada a quien atribuyo este logro. Gracias infinitas por creer en mí y apoyarme incondicionalmente. Aún recuerdo nuestras pláticas en las que te contaba mi emoción por estar en el laboratorio y hacer experimentos. Hoy puedo decir que el camino no fue fácil pero valió la pena. Gracias por siempre motivarme a luchar por mis sueños y recordarme que después de la tormenta sale el sol.

A mi familia por aportar su granito de arena a mi formación académica y por siempre recibirme con los brazos abiertos. En especial a mi hermana Brenda, mi cuñado Carlos, mi tía Francisca, mi tía Julia, mi tío Frank, mi abuelo Teófilo y al Sr. José Manuel.

A los integrantes del laboratorio de Fisiología Experimental por hacer más amena mi estancia, por el tiempo compartido en la discusión de nuestros resultados y por los momentos divertidos. A mi compañero Kevin por enseñarme la técnica de inmunohistoquímica.

A mi tutora María Chávez por aceptarme en su laboratorio y apoyarme en el desarrollo de mi proyecto, por enriquecer mis ideas y mostrarme lo bonito que es ser científico. Gracias por enseñarme la importancia de formar nuestro propio criterio y por ser una inspiración en mi vida académica.

A mis sinodales, Dra. Mara Guzmán, Dra. Elsa Escamilla, Dr. Josué Ramírez y Dr. César Lara por sus valiosos comentarios.

En especial al Dr. Josué Ramírez por ser un gran maestro que se preocupa por el aprendizaje de sus alumnos, sus clases fueron inspiracionales y muy divertidas.

A mi querido maestro Q.F.B José de Guadalupe Mejía Acevedo, que en paz descanse, por transmitirme su amor por la Biología y prepararme para las olimpiadas de conocimientos. Fue un parteaguas en mi vida porque desde que lo conocí supe el significado de la excelencia.

Índice

RESUMEN	7
I INTRODUCCIÓN	9
I.1 RITMOS BIOLÓGICOS.....	9
I.2 IMPORTANCIA DE LOS RITMOS BIOLÓGICOS	10
I.3 RELOJ BIOLÓGICO EN MAMÍFEROS	11
I.4 LOS GENES RELOJ CONTROLAN EL ACOPLAMIENTO CELULAR EN EL NSQ	12
I.5 HETEROGENEIDAD ANATÓMICA Y FUNCIONAL DEL NSQ	13
I.6 PAPEL FUNCIONAL DEL GABA.....	15
I.7 RECEPTOR GABAÉRGICO	19
I.8 COTRANSPORTADORES PERTENECIENTES A LA FAMILIA SLC12	20
I.10 VÍA WNK-SPAK/OSR1-NKCC1-KCC2	24
I.11 INACTIVACIÓN DE LA PROTEÍNA SPAK IN VIVO	26
I.12 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	27
I.13 JUSTIFICACIÓN	27
HIPÓTESIS	28
OBJETIVO GENERAL	28
OBJETIVOS PARTICULARES	29
II MÉTODOS	29
II.1 REVISIÓN DE LAS BASES DE DATOS.....	29
II.2 GENOTIPADO.....	30
II.3 CONDICIONES DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	31
II.4 PERFUSIONES	33
II.5 CORTES DE CEREBRO.....	34
II.6 INMUNOHISTOQUÍMICA	34
II.7 MICROSCOPÍA Y CUANTIFICACIÓN.....	35
II.8 ESTADÍSTICA.....	36
III RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36

III.1 EXPRESIÓN DE LOS GENES INVOLUCRADOS EN LA VÍA WNK-SPAK/OSR1-NKCC1-KCCs EN LAS CÉLULAS DEL NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO.....	36
III.2 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN RÍTMICA DE LA VÍA WNK-SPAK/OSR1-NKCC1-KCCs EN CÉLULAS DEL NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO	43
III.3 GENERACIÓN DE LOS RATONES SPAK-KI	46
III.4 LOS RATONES SPAK-KI MUESTRAN MAYOR ACTIVIDAD NEURONAL EN EL NSQ DURANTE EL DÍA EN COMPARACIÓN A LOS RATONES SILVESTRES	47
III.5 ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD NEURONAL EN LA REGIÓN VENTRAL DEL NSQ.....	50
III. 6 ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD NEURONAL EN LA REGIÓN DORSAL DEL NSQ.....	52
III.7 DISCUSIÓN.....	54
III. 8 PERSPECTIVAS	60
CONCLUSIONES	61
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

Lista de abreviaturas

AVP: Péptido arginina-vasopresina

AngII: Angiotensina II

BMAL: Receptor nuclear translocador de aril hidrocarburos en cerebro y músculo

CALB: Calbindina

CALR: Calretinina

CCC: Cotransportadores electroneutros de cationes acoplados a cloruro

Cl⁻: Ion cloruro

[Cl⁻]_i: Concentración de cloruro intracelular

CLOCK: Proteína reloj

CRY: Criptocromos

E_{Cl⁻}: Potencial de equilibrio del cloruro

E_{GABA}: Potencial de reversión de GABA

EPSPs: Potenciales postsinápticos excitatorios

GABA: Ácido gamma aminobutírico

GABA-T: Transaminasa GABA

GABA_AR: Receptor de GABA tipo A

GABA_BR: Receptor de GABA tipo B

GAD: Descarboxilasa del ácido glutámico

GRP: Péptido liberador de gastrina

KCC2: Cotransportador de K⁺-Cl⁻

mENK: Met-enkefalina

ARNm: ARN mensajero

NKCC1: Cotransportador de Na⁺-K⁺-2Cl⁻

NT: Neurotensina

OSR1: Cinasa de respuesta al estrés oxidativo 1

PER: Proteína periodo

TRH: Tracto retinohipotalámico

RGS16: Regulador de la señalización de la proteína G 16

NSQ: Núcleo supraquiasmático

SLC12: Familia de cotransportadores catión-cloruro portadores de soluto 12

SPAK: Cinasa rica en prolina/alanina relacionada con Ste20/SPS1

SSADH: Semialdehído succínico deshidrogenasa

VIP: Péptido intestinal vasoactivo

VGAT: Transportador vesicular de GABA

WNK: Cinasa libre de lisina (K)

ZT: Tiempo Zeitgeber

Resumen

Los ritmos circadianos controlan procesos fundamentales de la vida como la temperatura corporal, la liberación de hormonas, la reproducción, el metabolismo, el comportamiento de ingesta de alimento y el ciclo de sueño-vigilia. Los seres vivos poseen relojes biológicos, el principal reloj circadiano llamado marcapasos, en mamíferos es el núcleo supraquiasmático (NSQ) que se localiza en la parte anterior del hipotálamo. El NSQ se encarga de orquestar los procesos fisiológicos y conductuales de los organismos, mediante uno de los principales sincronizadores que es el ciclo de luz-oscuridad. El NSQ está compuesto de aproximadamente 20,000 neuronas que en su mayoría son neuronas GABAérgicas, anatómicamente se puede dividir en dos regiones principales: la región dorsal y la región ventral, estas regiones se distinguen con base a la expresión de péptidos y proyecciones aferentes. El ácido gamma aminobutírico (GABA) es el neurotransmisor hiperpolarizante por excelencia del sistema nervioso central. En casi todas las neuronas, la unión del GABA a su receptor tipo A conlleva a la hiperpolarización de la membrana debido al flujo del cloruro del exterior al interior de la célula a favor de su gradiente, ya que dicho ion se encuentra en bajas concentraciones en la mayoría de las neuronas (5-12 mM). Sin embargo, se ha visto que el GABA ejerce un efecto excitatorio en las neuronas inmaduras debido a un alta concentración de cloruro intracelular (alrededor de 20-40 mM). Dado que los cotransportadores catión-cloruro (CCCs; por sus siglas en inglés) regulan la concentración de cloruro dentro de las neuronas ($[Cl^-]_i$), se sugiere que la distribución diferencial de los CCCs, incluyendo NKCC1 y KCC2, podría explicar el mecanismo subyacente a la excitación mediada por el GABA. La actividad de NKCC1 y KCC2 es regulada por la vía de las cinasas WNK-SPAK/OSR1. En esta vía la disminución de la $[Cl^-]_i$ activa a la proteína WNK que fosforila a SPAK. Por su parte, SPAK fosforila a NKCC1 y KCC2, activando a los primeros e inhibiendo a los segundos. Por esta razón se propone que la inactivación de la proteína SPAK en los ratones SPAK-KI modificará la actividad neuronal en el NSQ debido a la alteración en la fosforilación de los cotransportadores NKCC1 y KCC2 que determinan la respuesta GABAérgica de las neuronas de este núcleo, y con ello su actividad. En este estudio se comparó la actividad neuronal del NSQ en dos puntos del ciclo de luz-oscuridad, siendo estos el ZT2 y el ZT14. Se obtuvo un aumento de la actividad neuronal en ambas regiones del NSQ durante el ZT2 en los ratones SPAK-KI. Se plantea que en estos ratones están involucradas otras vías no canónicas que

contribuyen a modular la actividad de los cotransportadores, dicha regulación probablemente es a través de la fosforilación. Se sugiere que la cinasa SPAK influye en la actividad neuronal de dicho núcleo, probablemente a través de modificar la actividad de los cotransportadores KCC2 y NKCC1 y con ello la señalización GABAérgica.

I Introducción

I.1 Ritmos biológicos

Los ritmos biológicos se refieren a las oscilaciones de una variable fisiológica dentro de un intervalo de tiempo, dependen de un reloj biológico endógeno y de sincronizadores ambientales como el fotoperiodo y cambios ambientales estacionales, entre otros (Dunlap, 1999). Los ritmos biológicos se pueden clasificar de acuerdo a su periodo. Ritmos con periodos menores a 22h se denominan ultradianos, como la frecuencia cardiaca y respiratoria (Refinetti, 2012). Ritmos cuyo periodo va de 23-28h aproximadamente se denominan circadianos, palabra que proviene del latín y significa cercano a un día. Ejemplos de ritmos circadianos son el ciclo de sueño-vigilia, la secreción de hormonas como el cortisol o la hormona del crecimiento. Ritmos con periodos mayores a 28h se denominan infradianos, por ejemplo, el ciclo menstrual, la hibernación o los procesos migratorios (Refinetti, 2012).

Los ritmos circadianos presentan dos características que los definen. La primera es que se expresan independientemente de las señales ambientales (Vitaterna et al., 2001), por ejemplo, si se mantiene a un individuo en oscuridad constante las oscilaciones en la temperatura corporal, en la secreción de hormonas como el cortisol y el ciclo de sueño-vigilia persisten a pesar de la ausencia de indicadores externos de tiempo como lo es la incidencia de luz durante el día.

Este carácter endógeno de los ritmos circadianos se debe a que el sistema de cronometraje surge a nivel genético. Hoy en día está demostrado que la existencia del marcapasos circadiano se debe a un ciclo de auto-retroalimentación transcripcional-traducciona de genes que codifican a proteínas “reloj” como PER1, PER2, CRY1, CRY2, CLOCK y BMAL1 (Patke et al., 2020). Donde los heterodímeros de las proteínas CLOCK y BMAL1 (CLOCK/BMAL1) promueven la transcripción de los genes *per* y *cry*, cuyos productos proteicos reprimen a su vez la transactivación de CLOCK/BMAL1, cerrando esta asa de retroalimentación (Reppert y Weaver, 2001; Mohawk et al., 2012).

La segunda característica de los ritmos circadianos es su capacidad para sincronizarse por señales exógenas las cuales determinan el periodo del ritmo, como el ciclo de luz-oscuridad. Es decir, los ritmos circadianos persisten en condiciones ambientales constantes, pero si las señales externas cambian, entonces los ritmos se alinean con los nuevos estímulos ambientales, a esta alineación se denomina arrastre (Vitaterna et al., 2001). Un claro ejemplo es el ciclo del sueño ya que siempre ocurre a las mismas horas y es regulado por señales externas, en el caso de los animales diurnos el sueño se sincroniza con el periodo de oscuridad (Vitaterna et al., 2001).

1.2 Importancia de los ritmos biológicos

Los ritmos circadianos existen en muchos procesos biológicos y en una amplia variedad de organismos, desde unicelulares como las algas, hasta organismos multicelulares como los mamíferos (Vitaterna et al., 2001). Los ritmos biológicos son adaptaciones que permiten responder a las variaciones cíclicas del ambiente, como la alternancia entre los periodos de luz y oscuridad, cambios en la temperatura, humedad, entre otros. De tal forma que, la ritmicidad circadiana provee la capacidad de anticipar al organismo ante los cambios que suceden en su entorno (Vitaterna et al., 2001).

Los ritmos circadianos controlan procesos fundamentales de la vida como la temperatura corporal, la liberación de hormonas, la reproducción, el metabolismo, el comportamiento de ingesta de alimento y el ciclo de sueño-vigilia (Mieda, 2020). En los humanos, la alteración de los ritmos biológicos conduce al desarrollo de desórdenes fisiológicos graves que impactan la salud mental y física (Vitaterna et al., 2001). Por ejemplo, la desincronización de los ritmos internos se ve reflejado en perfiles hormonales alterados, perturbaciones del sueño, alteraciones metabólicas y tiempos de alimentación inapropiados que pueden conllevar al desarrollo de obesidad y síndrome metabólico (Vitaterna et al., 2001). También se ha estudiado la importancia de los ritmos biológicos en animales de laboratorio y se ha visto que los cambios repetidos en el ciclo de luz-oscuridad están relacionados con un aumento en la progresión de tumores, alteración en la respuesta inmunitaria y un incremento en la mortalidad de ratones de edad avanzada (Davidson et al., 2006).

1.3 Reloj biológico en mamíferos

Los seres vivos poseen relojes biológicos independientes en la mayoría de sus células e incluso a nivel tisular, sin embargo, el principal reloj circadiano llamado marcapasos, en mamíferos es el núcleo supraquiasmático (NSQ). El NSQ se localiza en el cerebro, específicamente en la parte anterior del hipotálamo. Dicho núcleo se encarga de orquestar los procesos fisiológicos y conductuales de los organismos mediante uno de los principales sincronizadores que es el ciclo de luz-oscuridad (Hee et al., 2008).

El proceso comienza con la percepción de señales fóticas por células fotosensibles presentes en la retina, las cuales integran la información acerca de la presencia e intensidad de la luz. Las retinas están compuestas de conos, bastones y células ganglionares que expresan melanopsina. La melanopsina es un fotopigmento que transforma la luz en un impulso nervioso, lo cual permite transmitir la información de las señales fóticas hacia el nervio óptico, que a su vez manda la señal al tracto retinohipotalámico (TRH) y este se comunica con el NSQ, lo cual asegura una correcta sincronización entre el reloj endógeno y el ambiente (Salihu et al., 2021) (fig. 1). En la región ventral del NSQ se localizan las neuronas VIP que son las encargadas de recibir e integrar la información de las señales fóticas, a esta región le llegan las proyecciones retinianas (Belenky et al., 2008).

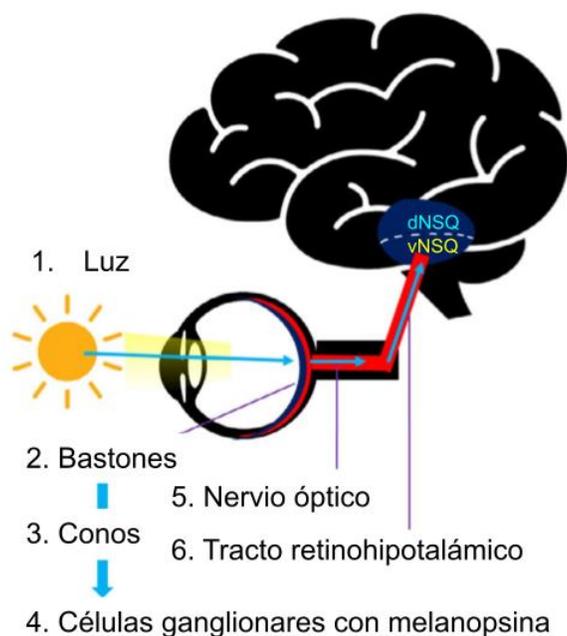


Figura 1: Ilustración de la percepción de la luz en las retinas y su comunicación con la región ventral del núcleo supraquiasmático (vNSQ) a través del tracto retinohipotalámico (TRH). Modificada de Salihu et al., 2021.

A pesar de que existen relojes circadianos en otras áreas del cerebro y en tejidos periféricos como hígado, pulmón y músculo esquelético (Hayter et al., 1992), estos son controlados por el NSQ por medio de proyecciones neuronales que salen de él hacia los tejidos y gracias a la señalización parácrina.

1.4 Los genes reloj controlan el acoplamiento celular en el NSQ

La comunicación entre neuronas del NSQ es necesaria para la sincronización de la actividad neuronal de este núcleo y en consecuencia, se generan señales coherentes que dirigen los ritmos diarios de comportamiento y fisiológicos (Doi et al., 2011). Está demostrado que el origen del acoplamiento celular en el NSQ subyace en los ritmos de expresión de genes reloj y sus productos proteicos (Reppert y Weaver, 2001). No obstante, el asa de auto-retroalimentación transcripcional-traducciona de los genes reloj se ve influenciado por varios factores. Entre ellos, el tiempo de expresión que está determinado por dos mecanismos oscilatorios, uno es la oscilación circadiana y el otro es el ritmo ultradiano con un periodo alrededor de 3h. Por ejemplo, se observan ritmos en antifase de la bioluminiscencia de genes reloj por la disociación entre la expresión de PER2::LUC y BMAL1-ELUC (Ono et al., 2015).

Los ciclos de luz-oscuridad son otro factor importante que influye sobre los ritmos de expresión de los genes reloj. Se ha visto que en ratones en libre movimiento la expresión de *perl* cambia inmediatamente después de aplicar un pulso de luz largo, mientras que la expresión de *bmali* cambia de forma gradual, es decir, la tasa de cambio de fase inducido por la luz es diferente entre los dos ritmos de expresión (Ono et al., 2017). También se ha observado desacoplamiento en la actividad eléctrica de las neuronas en respuesta al fotoperiodo largo. Por ejemplo, durante el invierno cuando los días son cortos, las neuronas del NSQ están altamente sincronizadas con tiempos similares en la expresión de proteínas y actividad eléctrica. Sucede lo contrario durante el verano, cuando los días son largos, en este caso se

presenta un estado alterno del NSQ caracterizado por dos subgrupos de neuronas que ciclan en antifase (Evans et al., 2013; Ono et al., 2017).

Por otra parte, se demostró que el hígado, riñón, pulmón y músculo esquelético exhiben ritmos circadianos de expresión de la proteína reloj llamada PER1, sin embargo, en condiciones *in vitro*, al estar aislados del NSQ sus ritmos de expresión disminuyeron posterior a los dos o 7 ciclos (Hayter et al., 1992). Resulta interesante que, en condiciones *in vitro* el ritmo de expresión del NSQ fue invariable y se mantuvo hasta 32 días (Hayter et al., 1992). Al modificar el inicio del fotoperiodo y evaluar la respuesta al avance y retraso de fase del ciclo de luz-oscuridad, se observó que el ritmo de expresión del reloj central se modificó más rápido en comparación a los ritmos exhibidos por los tejidos periféricos (Hayter et al., 1992), esto sugiere que el NSQ es el primero en responder a los cambios en el fotoperiodo.

1.5 Heterogeneidad anatómica y funcional del NSQ

El NSQ está compuesto de aproximadamente 20,000 neuronas que en su mayoría son neuronas GABAérgicas (Belenky et al., 2008) (fig. 2). Anatómicamente el NSQ se divide en dos regiones: la región dorsal y la región ventral. Estas regiones han sido identificadas en varios mamíferos incluyendo rata, ratón (Abrahamson y Moore, 2001; Morin et al., 2006) y hámster (Card y Moore, 1984) y se distinguen con base a la expresión de péptidos y proyecciones aferentes.

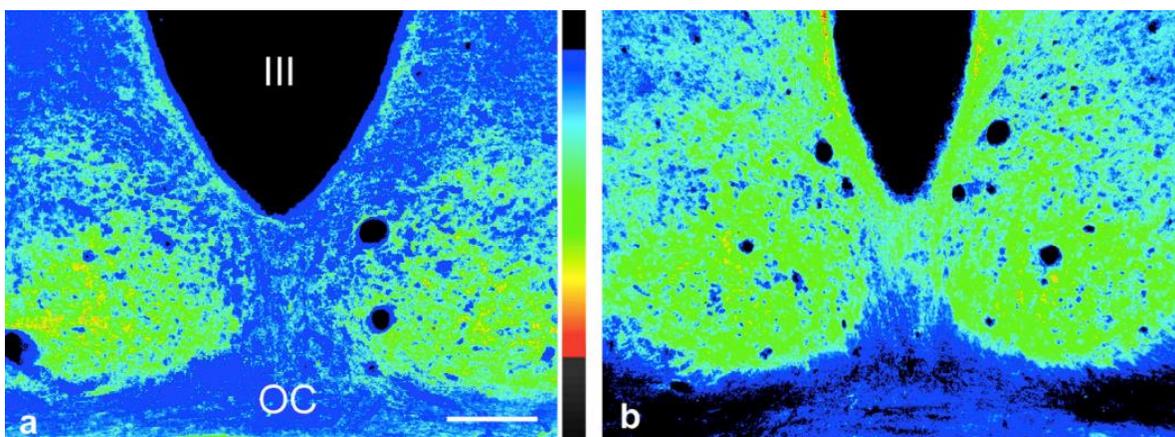


Figura 2: Fotomicrografías de secciones a través de la porción media del NSQ de rata teñidas contra GAD65/67 y VGAT. Inmunotinciones del NSQ de rata contra a) GAD65/67, la enzima descarboxilasa del ácido glutámico y contra b) VGAT, el transportador vesicular del GABA. Las imágenes fueron pseudocoloreadas por los autores para representar la intensidad de la expresión de GAD65/67 y VGAT. De acuerdo a la escala de color, el color azul indica la menor expresión y el color rojo indica la mayor expresión. III: tercer ventrículo y OC: quiasma óptico. Tomada de Belenky et al., 2008.

La región ventral del NSQ (vNSQ) está cercana al quiasma óptico y se encarga de recibir las señales aferentes provenientes de la retina a través del TRH, así como del núcleo del rafe y del complejo geniculado lateral (Abrahamson y Moore, 2001). La región ventral se caracteriza por presentar neuronas que expresan el péptido intestinal vasoactivo (VIP), el péptido liberador de gastrina (GRP), GABA, calbindina (CALB), calretinina (CALR) y neurtensina (NT) (fig. 3) (Abrahamson y Moore, 2001; Lesauter et al., 2002).

La región dorsal del NSQ (dNSQ) cumple la función de un marcapasos y se encarga de enviar las señales de salida del reloj circadiano hacia el resto del cuerpo (Abrahamson y Moore, 2001; Harding et al., 2020). Esta región también recibe señales de los núcleos límbico, hipotalámico y del tronco encefálico (Moga y Moore, 1997) lo que sugiere asas de retroalimentación y sincronización entre diferentes partes del sistema nervioso central. En la región dorsal se localizan neuronas que sintetizan el péptido arginina-vasopresina (AVP), GABA, CALB, angiotensina II (AII), met-enkefalina (mENK) y neuropéptidos como somatostatina y un regulador de la señalización de la proteína G 16 (RGS16) (fig. 3) (Abrahamson y Moore, 2001; Lesauter et al., 2002; Van den Pol y Tsujimoto, 1985; Doi et al., 2011).

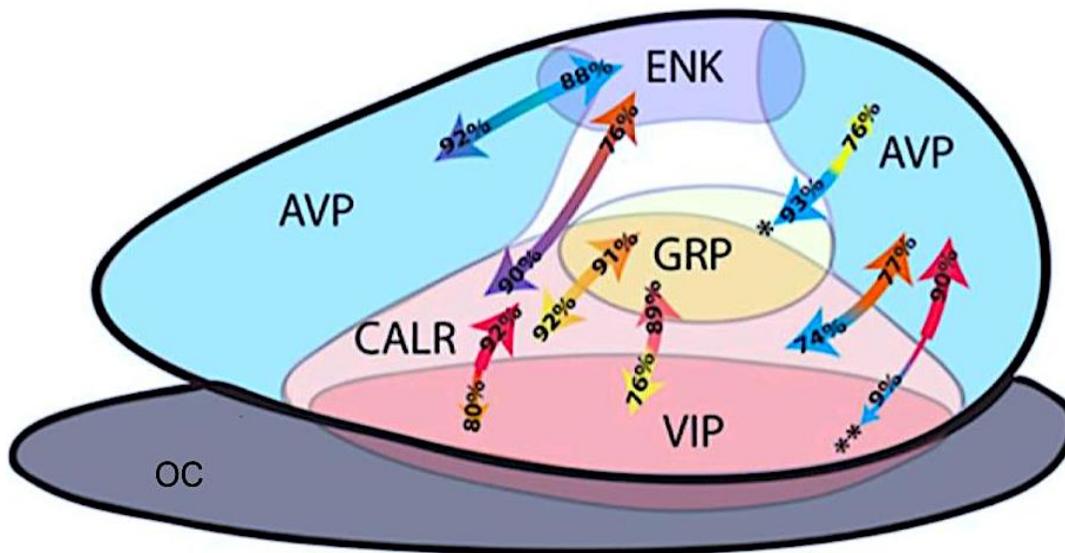


Figura 3: Modelo representativo de la expresión de péptidos en la región ventral (rosa) y dorsal (azul) del núcleo supraquiasmático y comunicación neuronal entre los diferentes subtipos. OC: quiasma óptico, VIP: péptido intestinal vasoactivo, AVP: péptido arginina-vasopresina, GRP: péptido liberador de gastrina, mENK: met-enkefalina y CALR: calretina. Se indica la dirección (flechas) y la proporción (porcentajes) de la comunicación entre los diferentes subtipos neuronales. Modificada de Varadarajan et al., 2018.

1.6 Papel funcional del GABA

El ácido gamma aminobutírico (GABA) es el neurotransmisor hiperpolarizante por excelencia del sistema nervioso central. Este neurotransmisor se sintetiza a partir del glutamato por medio de la enzima descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) y se metaboliza a succinato por las reacciones secuenciales de la transaminasa GABA (GABA-T) y la semialdehído succínico deshidrogenasa (SSADH) (fig. 4).

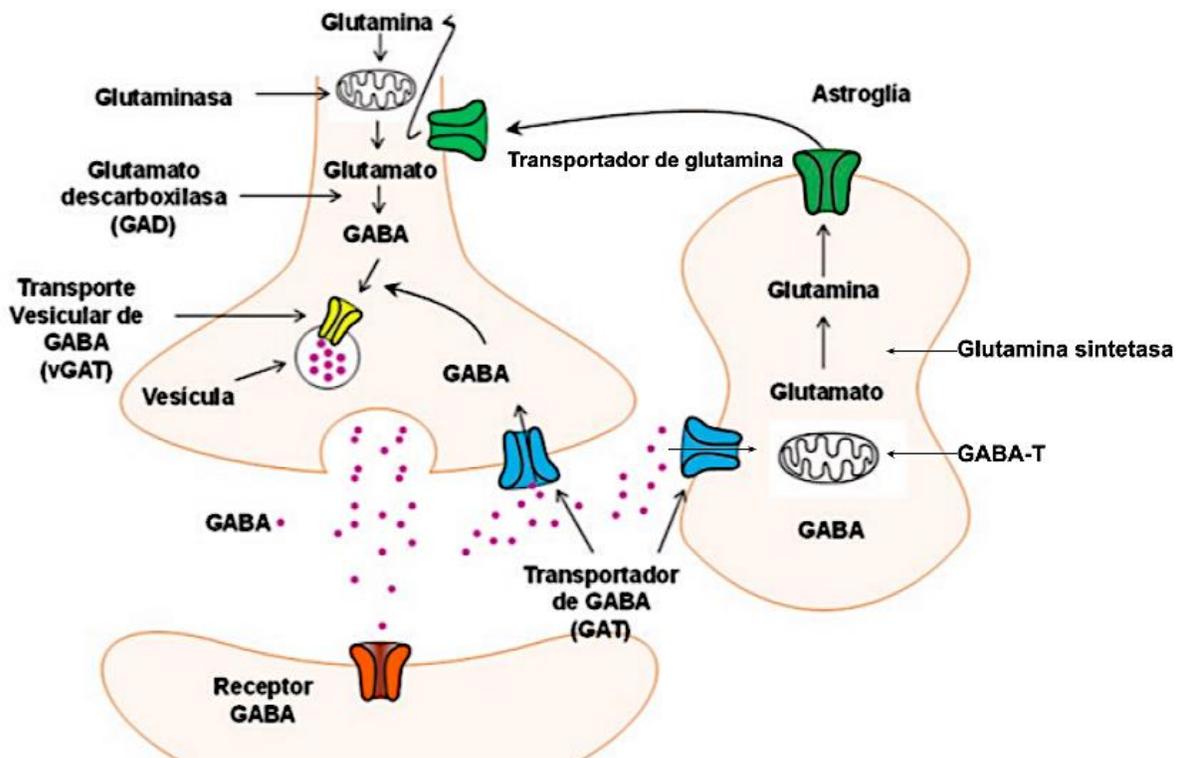


Figura 4: Síntesis, liberación y captura del GABA. La síntesis del GABA ocurre en las terminales presinápticas, este neurotransmisor se sintetiza a partir del glutamato por medio de la enzima descarboxilasa del ácido glutámico (GAD). Posteriormente, el transportador vesicular del GABA (VGAT) se encarga de almacenar el neurotransmisor en vesículas sinápticas y es liberado de manera dependiente de Ca^{2+} por la despolarización de la membrana presináptica. Luego de ser liberado, el GABA se une a su receptor que se encuentra en la membrana de la neurona postsináptica y ejerce su efecto. Después, el neurotransmisor es eliminado del espacio sináptico mediante su captura a través del transportador de GABA (GAT), por parte de la neurona presináptica o por acción de los astrocitos. Finalmente, el catabolismo del GABA se lleva a cabo por la enzima transaminasa GABA (GABA-T) que transfiere el grupo amino, dando lugar a glutamato, α -cetoglutarato y semialdehído succínico, este último es oxidado a succinato por medio de la enzima semialdehído succínico deshidrogenasa (SSADH). Modificada de Cedillo et al., 2019.

GABA ejerce un efecto inhibitorio sobre un 20% a 44% de las neuronas corticales (Petroff, 2002) y es el neurotransmisor numéricamente predominante en el hipotálamo ya que se encuentra en el 49% de todos los botones sinápticos de los núcleos supraquiasmático,

arqueado, supraóptico y paraventricular (Decavel y Van den Pol, 1990). Dentro del NSQ el GABA se localiza principalmente en los somas neuronales y terminales sinápticas (Buijs et al., 1994; Decavel y Van den Pol, 1990). En casi todas las neuronas, la unión del GABA a su receptor tipo A conlleva a la hiperpolarización de la membrana debido al flujo del cloruro del exterior al interior de la célula a favor de su gradiente (fig. 5), ya que dicho ion se encuentra en bajas concentraciones en la mayoría de las neuronas (5-12 mM).

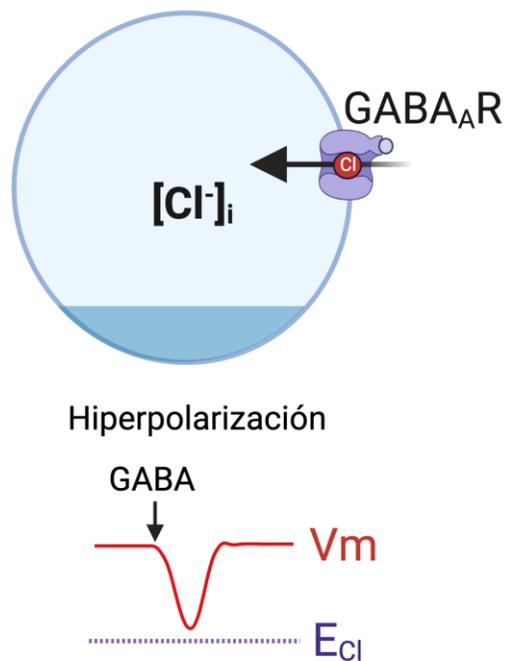


Figura 5: Efecto hiperpolarizante del GABA. En neuronas con un bajo nivel de cloruro intracelular (5-12 mM) , la unión del GABA a su receptor tipo A conlleva a la entrada del cloruro a favor de su gradiente de concentración, en consecuencia, el potencial de membrana tiende a valores más negativos y la célula se hiperpolariza.

Sin embargo, Obrietan y Van den Pol demostraron que las acciones del GABA dependen del estado de desarrollo, por ejemplo, en las neuronas inmaduras el GABA ejerce un efecto excitatorio mientras que en las neuronas maduras dicho neurotransmisor causa efectos inhibitorios (Obrietan y Van den Pol, 1995). Este cambio en la función del GABA tienen lugar alrededor del día 4-10 postnatal en el hipotálamo (Obrietan y Van den Pol, 1995). Además, el efecto del GABA está intrínsecamente relacionado con la concentración de cloruro

intracelular, se ha visto que el GABA ejerce un efecto excitatorio en las neuronas inmaduras debido a un alta concentración de cloruro intracelular (alrededor de 20-40 mM) (Ben-Ari et al., 2012) (fig. 6).

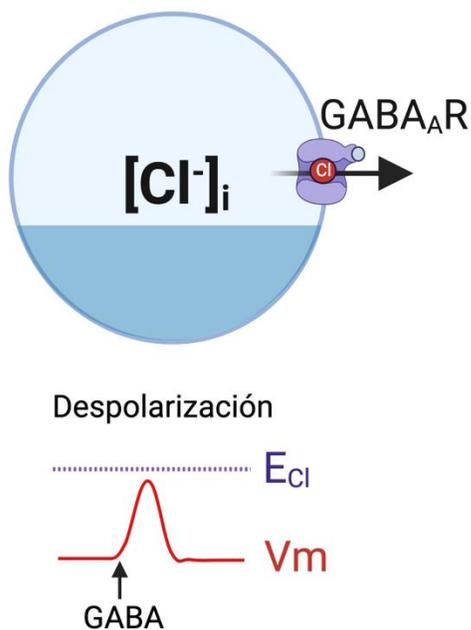


Figura 6: Efecto despolarizante del GABA. En las neuronas con un alto nivel de cloruro intracelular (20-40 mM), la unión del GABA a su receptor tipo A conlleva a la salida del cloruro a favor de su gradiente de concentración, en consecuencia, el potencial de membrana tiende a valores menos negativos y la célula se despolariza.

Por otra parte, Wagner y colaboradores fueron los primeros en reportar los efectos excitatorios del GABA en el NSQ de rata durante el día al incrementar la frecuencia de disparos (Wagner et al., 1997). Aunado a esto GABA tuvo un efecto inhibitorio durante la noche, lo que ocasionó un revuelo debido al papel dual del GABA dentro del NSQ de animales adultos.

Otro grupo de investigadores demostró que el GABA presenta efectos diferenciales sobre las neuronas del NSQ dependiendo del momento del día, de tal forma que cuando GABA fue administrado en el NSQ durante el día, inducía un efecto hiperpolarizante en el potencial de membrana de las neuronas, este efecto estuvo mediado por la activación de los

receptores GABA_A. Sin embargo, cuando GABA se administraba durante la noche indujo la hiperpolarización del 58% y la despolarización del 42% de las neuronas del NSQ (De Jeu y Pennartz, 2002).

También se han reportado efectos excitatorios del GABA específicos de la región dorsal del NSQ durante el día y la noche (Albus et al., 2005), o bien, acciones excitatorias del GABA en la noche sobre la región dorsal del NSQ (Hee et al., 2008). El trabajo de Alamilla y colaboradores demostró que el GABA ejerce un efecto excitatorio en el día e inhibitorio en la noche en la región dorsal del NSQ (Alamilla et al., 2014). No obstante, hoy en día la controversia continúa ya que no se ha establecido el papel funcional del GABA de acuerdo con el ciclo de luz-oscuridad, lo que sí está claro es que el GABA ejerce un papel dual ya sea como neurotransmisor excitatorio o inhibitorio dependiendo de la concentración de cloruro intracelular, y el factor en común de todos los presentes hallazgos es que el efecto excitatorio del GABA solo se ejerce en la región dorsal del NSQ.

Además, el GABA actúa como un regulador del acoplamiento celular en el NSQ ya que la aplicación diaria del GABA en un medio de cultivo de neuronas dispersas del NSQ indujo la sincronización en los ritmos de descarga de estas neuronas (Liu y Reppert, 2000). En cambio, la aplicación de bicuculina, un antagonista del receptor de GABA_A, provocó desacoplamiento entre la región dorsal y ventral del NSQ (Albus et al., 2005).

1.7 Receptor GABAérgico

Los receptores de GABA se clasifican en dos tipos principales: GABA_AR y GABA_BR. Esta distinción se debe a la diferencia en el acoplamiento de los receptores a los canales iónicos, por ejemplo, el GABA_AR actúa como un receptor ionotrópico ya que la unión del GABA a su receptor conduce a la apertura del canal y el ion cloruro fluye a favor de su gradiente electroquímico. El gradiente electroquímico del cloruro se refiere a la diferencia de cargas y concentración del ion dentro y fuera de la célula (Alberts et al., 2016).

Los GABA_AR constituyen el componente rápido de los potenciales postsinápticos inhibitorios en muchas áreas del cerebro. Este tipo de receptores son estructuras pentaméricas

selectivamente permeables al cloruro (Cl^-). Mientras que el GABA_BR es un receptor metabotrópico, es decir, constituye un receptor acoplado a una proteína G, que, dependiendo de su ubicación celular, pueden inhibir canales de Ca^{2+} o activar canales de K^+ (Alberts et al., 2016).

En los siguientes apartados se explicará cómo se regula la concentración de cloruro intracelular por medio de los cotransportadores NKCC1 y KCC2.

1.8 Cotransportadores pertenecientes a la familia SLC12

La familia de los cotransportadores catión-cloruro (CCCs) portadores de soluto 12 (SLC12) está conformada por 9 miembros, 4 de ellos corresponden a los cotransportadores de K^+-Cl^- (KCCs), dos cotransportadores de $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ (NKCCs) y un cotransportador Na^+-Cl^- (NCC) (fig. 7). Esta familia de cotransportadores son electroneutrales, lo cual significa que transportan en la misma dirección un número igual de cargas positivas y negativas hacia el interior o exterior de la célula. Esto contribuye al flujo de iones a través de la membrana celular, además participan en varios procesos fisiológicos como la regulación del volumen celular, la modulación de la concentración de cloruro intraneuronal y la regulación de la presión arterial (Arroyo et al., 2013).

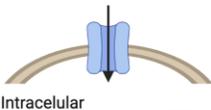
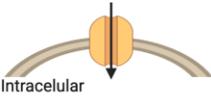
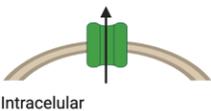
Nombre del gen	Nombre de la proteína	Relación estequiométrica	Función
<i>slc12a1</i>	NKCC2	1Na ⁺ : 1K ⁺ : 2Cl ⁻	
<i>slc12a2</i>	NKCC1		
<i>slc12a3</i>	NCC	1Na ⁺ : 1Cl ⁻	
<i>slc12a4</i>	KCC1	1K ⁺ : 1Cl ⁻	
<i>slc12a5</i>	KCC2		
<i>slc12a6</i>	KCC3		
<i>slc12a7</i>	KCC4		

Figura 7: Cotransportadores pertenecientes a la familia SLC12 que contribuyen al flujo de iones a través de la membrana celular.

La función de los cotransportadores NKCC1 y KCC2 se ha estudiado ampliamente en el NSQ debido a que determinan el efecto del GABA a través de regular la concentración de cloruro intracelular (Hee et al., 2008; Kaila et al., 2014; Kim et al., 2018), por ejemplo, NKCC1 permite la entrada de dos iones cloruro, un ion de potasio y otro de sodio. Mientras que KCC2 permite la salida de un ion cloruro y otro de potasio. De manera general, NKCC1 permite la entrada de cloruro y KCC2 su salida.

Para dilucidar la función de los cotransportadores antes mencionados en el sistema circadiano, un grupo de investigadores realizó un estudio de los patrones de expresión del ARNm en el sistema nervioso de ratas (Kanaka et al., 2001). A partir de la señal de hibridación *in situ* del ARNm, encontraron que el ARN codificante para NKCC1 se distribuye ampliamente en el sistema nervioso central, incluyendo el NSQ. Mientras que el ARN codificante para el cotransportador KCC2 se encuentra exclusivamente en la región ventral del NSQ y está ausente en la región dorsal del mismo (Kanaka et al., 2001). A partir de este hallazgo se puede decir que existen patrones de expresión diferencial del ARNm para NKCC1 y KCC2, por lo tanto, este estudio representó una importante aproximación para conocer la distribución de los cotransportadores en el sistema nervioso de ratas. Sin embargo, no es concluyente ya que no todo el ARNm se traduce a proteínas.

Más tarde, otros investigadores emplearon el método de doble inmunotinción para estudiar la expresión de NKCC1 y KCC2 junto con la expresión de dos grupos neuronales presentes en el núcleo supraquiasmático de rata. A partir de este estudio demostraron que la señal de KCC2 se encuentra exclusivamente en la región ventral del NSQ, al igual que la señal de las neuronas VIP (fig. 8), lo cual sugiere que las neuronas VIP expresan al cotransportador KCC2, esto se confirmó con la co-localización que se observa en la figura 8c.

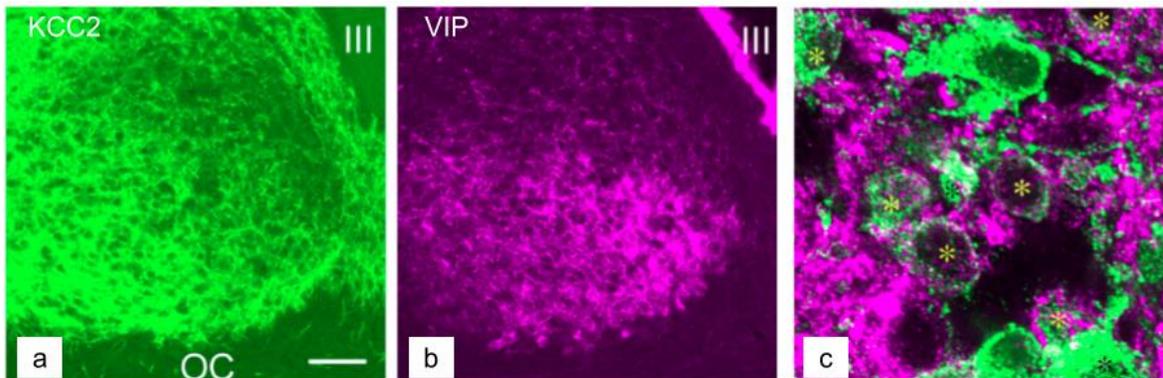


Figura 8: Expresión del cotransportador KCC2 en las neuronas VIP del núcleo supra-quiasmático. Imágenes de inmunofluorescencia tomadas con un microscopio confocal de la porción media del NSQ de rata. Se utilizaron anticuerpos contra a) KCC2 marcado en verde y b) VIP marcado de color magenta. El inciso c) muestra la fusión de a y b, los asteriscos indican el núcleo de la neurona y en blanco se muestra la co-localización de las señales. III: tercer ventrículo y OC: quiasma óptico. Modificada de Belenky et al., 2008.

Por otra parte, la señal de NKCC1 co-localiza con la señal de las neuronas AVP las cuales se distribuyen en la región dorsal del NSQ (Belenky et al., 2010; Rohr et al., 2019). La señal de NKCC1 también co-localiza con la señal de las neuronas VIP que se encuentran en la región ventral (Belenky et al., 2010) (fig. 9). Esto significa que NKCC1 se expresa tanto en las neuronas AVP como en las VIP, por lo cual su expresión es abundante en ambas regiones del NSQ.

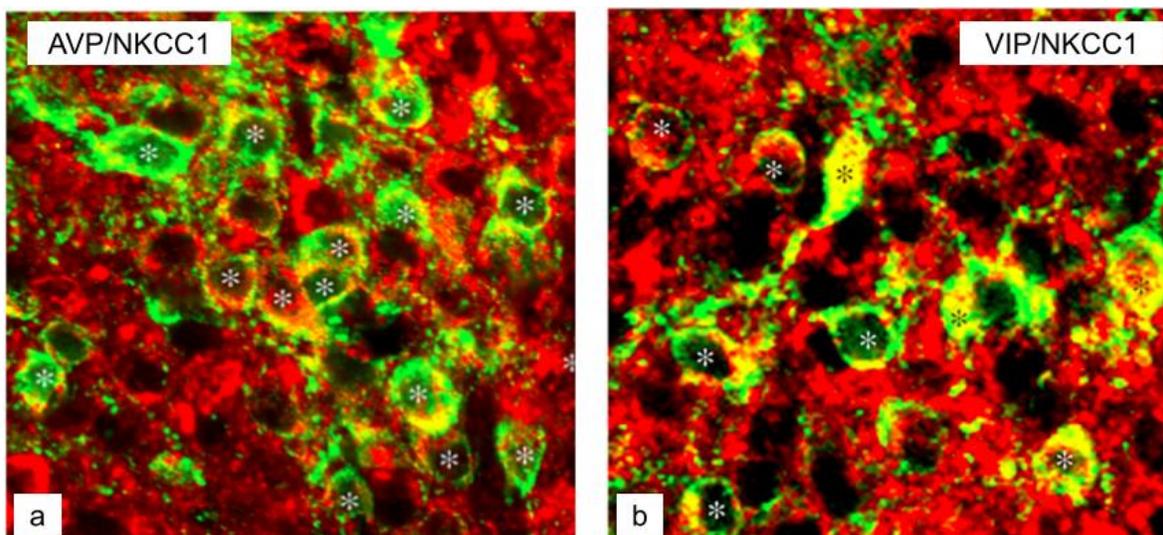


Figura 9: Expresión del cotransportador NKCC1 en las neuronas AVP y VIP del núcleo supraquiasmático. Imágenes de inmunofluorescencia tomadas con un microscopio confocal de la porción rostral del NSQ de rata. Se utilizaron anticuerpos contra a) AVP marcado en verde y NKCC1 marcado en rojo. Anticuerpos contra b) VIP marcado en verde y NKCC1 marcado en rojo. Los asteriscos indican el núcleo de la neurona y en amarillo se muestra la co-localización de las señales. Modificada de Belenky et al., 2010.

En resumen, los cotransportadores de la familia SLC12A tienen diferentes patrones de expresión dentro del núcleo supraquiasmático. Los cotransportadores NKCC1, KCC2 y KCC1 se expresan principalmente en la región ventral donde se localizan las neuronas VIP. Por su parte, los cotransportadores NKCC1, KCC3 y KCC4 se expresan en la región dorsal donde se distribuyen las neuronas AVP (fig. 10).

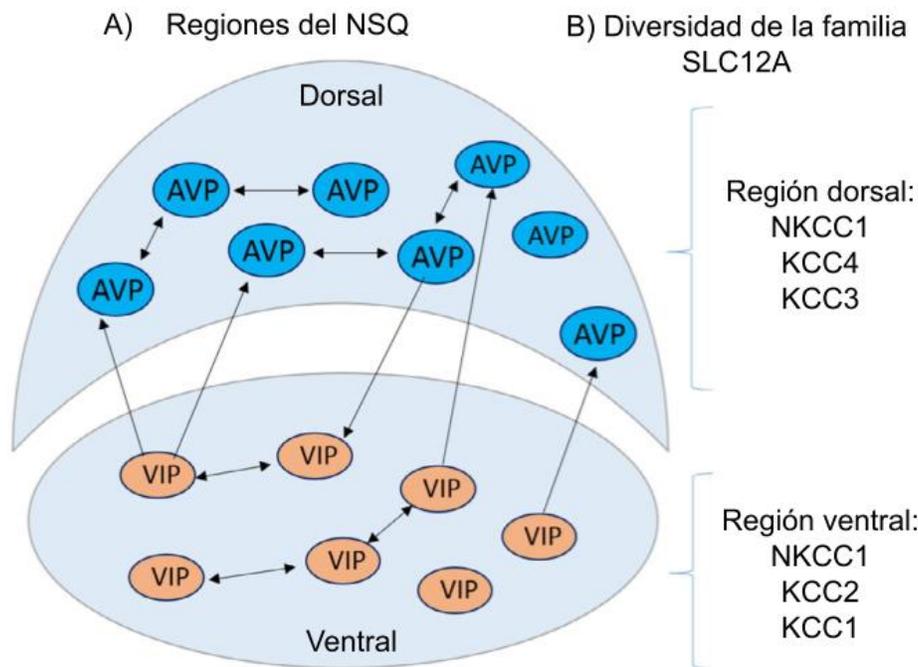


Figura 10: Los cotransportadores de la familia SLC12A tienen diferentes patrones de expresión dentro del núcleo supraquiasmático. El núcleo supraquiasmático (NSQ) se divide en la región ventral y dorsal que se caracterizan por la expresión de las neuronas VIP y AVP, respectivamente. Cada región del NSQ tiene una expresión diferencial de los cotransportadores pertenecientes a la familia SLC12A. Modificada de Salihi et al., 2021.

A partir de los datos antes mencionados se sugiere que la distribución diferencial de los CCCs podría explicar el mecanismo subyacente a la excitación mediada por el GABA. En este sentido, un estudio realizado por Hee y colaboradores demostró que la expresión de NKCC1 es mayor en la parte dorsal del NSQ durante la noche, lo que coincide con las respuestas excitatorias evocadas por el GABA, además al aplicar bumetanida (antagonista de NKCC1) ya no se generaron respuestas excitatorias mediadas por el GABA (Hee et al., 2008). Esto quiere decir que la expresión de NKCC1 contribuye a que el GABA tenga un efecto excitatorio sobre las neuronas del NSQ.

El estudio realizado por McNeill y colegas puso en evidencia que la expresión de NKCC1 está regulada por las condiciones ambientales de iluminación y además sigue un ritmo de expresión circadiana, esto último lo demostraron al habituar hámsters a condiciones de oscuridad constante y notaron que a pesar de ello se mantenía el ritmo de expresión de NKCC1 (McNeill et al., 2020). Es importante mencionar que en condiciones de luz constante aumentó significativamente la expresión de NKCC1 (McNeill et al., 2020), en otras palabras, la luz induce la expresión de dicho cotransportador.

Por otra parte, Olde y su equipo de trabajo se enfocaron en estudiar el papel de KCC2 en las corrientes transitorias de Ca^{2+} evocadas por el GABA, ellos encontraron que al bloquear la actividad de KCC2 ocurría un cambio en la proporción de respuestas excitatorias/inhedoratorias (Olde Engberink et al., 2018), es decir, demostraron que el cotransportador KCC2 es fundamental para las respuestas inhibitorias inducidas por el GABA.

A pesar de todos estos descubrimientos aún falta comprender la vía por la cual se regula la concentración de cloruro intracelular y, en consecuencia, se determina el efecto GABAérgico en las neuronas del NSQ acorde al ciclo de luz-oscuridad.

1.10 Vía WNK-SPAK/OSR1-NKCC1-KCC2

La actividad de los cotransportadores NKCC1 y KCC2 está regulada por la vía de fosforilación WNK-SPAK/OSR1. En condiciones hiperosmóticas debido a la baja $[Cl^-]_i$ la proteína WNK se autofosforila en su dominio cinasa (Ser382 en WNK1) y, en consecuencia,

se activa. Gracias a los estudios de cristalografía se ha logrado determinar que el ion cloruro se une directamente al dominio cinasa de las WNKs impidiendo así su autofosforilación y por ende su activación (Piala et al., 2014). Por esta razón se propone que las WNKs cumplen la función de sensar los niveles de cloruro dentro de las células. Belenky y su equipo de investigación encontraron que la proteína cinasa 3 sin lisina (WNK3) se expresa ampliamente en el NSQ (Belenky et al., 2010).

Una vez activa la proteína WNK es capaz de fosforilar y activar a dos proteincinasas de serina-treonina llamadas SPAK y OSR1, cabe mencionar que dichas cinasas están estrechamente relacionadas entre sí por homología de secuencia ya que presentan 68% de similitud (Moriguchi et al., 2005; Vitari et al., 2005). Las diversas isoformas de las WNKs fosforilan a SPAK en la treonina 243 del asa T (Thr243 en ratón) y en la serina 383 del motivo S (Ser383 en ratón), también fosforilan a OSR1 en la treonina 185 (Thr185). Los residuos de treonina conservados son fundamentales para la actividad de estas proteincinasas y se localizan en el asa T catalítico de SPAK/OSR1 (Alessi et al., 2014). Está demostrado que la mutación de la Ser383 del motivo S de SPAK no afecta su función ni su capacidad para ser activada por las WNKs (Vitari et al., 2005; Zagórska et al., 2007).

Además, SPAK y OSR1 son funcionalmente redundantes en sistemas experimentales, ya que al activarse ambas regulan la actividad de los cotransportadores que se encuentran río debajo de esta vía (Alessi et al., 2014; Delpire y Gagnon, 2008). SPAK/OSR1 fosforilan a NKCC1 y KCC2, activando a los primeros e inhibiendo a los segundos (fig. 11). Se ha demostrado que el funcionamiento de NKCC1 y KCC2 es muy importante durante el ciclo de sueño-vigilia, debido a que participan en la homeostasis del cloruro y determinan el efecto del GABA en el NSQ (Alamilla et al., 2014).

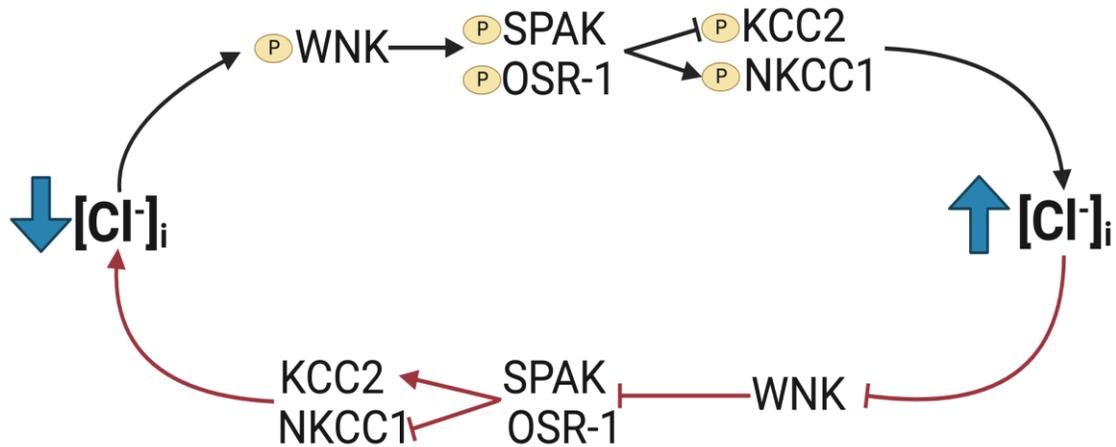


Figura 11: La actividad de la vía WNK-SPAK/OSR1-NKCC1-KCC2 regula los niveles de cloruro intracelular.

1.11 Inactivación de la proteína SPAK in vivo

Una de las características de los ratones SPAK-KI es que muestran una presión arterial reducida, debido posiblemente a una menor expresión y fosforilación de los cotransportadores renales NCC y NKCC2 (Rafiqi et al., 2010). Además, los ratones SPAK-KI presentan hipomagnesemia en una dieta normal en sal. Al ser sometidos a una dieta baja en sodio dichos ratones exhiben bajos niveles de potasio en plasma (Rafiqi et al., 2010). Años más tarde se demostró que los ratones SPAK-KI reducen el efecto hipertensivo inducido por la angiotensina II a través de reducir la fosforilación y por ende la activación de los NCCs, los cuales participan en la reabsorción renal de sal (Cervantes-Perez et al., 2018).

Recientemente se ha observado que en dieta alta en grasa los ratones SPAK-KI, que consumen la misma cantidad de alimento que los silvestres, no suben de peso, es decir, son resistentes a la obesidad. Esto se explica por un aumento en el gasto energético, un alta actividad termogénica en el tejido adiposo pardo y un incremento en la actividad mitocondrial del músculo esquelético. Todo esto acompañado de una mejora en la sensibilidad a la insulina (Torre-Villalvazo et al., 2018).

1.12 Planteamiento del problema

Si la actividad de los cotransportadores NKCC1 y KCC2 depende de la vía de fosforilación WNK-SPAK/OSR1 y de esto depende el efecto del GABA en el núcleo supraquiasmático, entonces al modificar la actividad de los cotransportadores a través de la inactivación de la cinasa SPAK, se verá reflejado en cambios de la actividad neuronal del NSQ con cambios en el comportamiento y la respuesta fisiológica a estímulos como el ciclo de luz-oscuridad.

1.13 Justificación

Se ha visto que los cambios estacionales conducen a la generación de días cortos en el invierno y días largos durante el verano. En los días cortos, las neuronas del NSQ están sincronizadas con tiempos similares en la expresión diaria de proteínas y de la actividad eléctrica, mientras que en los días largos se presenta un estado alterno del NSQ que se caracteriza por dos grupos de neuronas que ciclan en anti-fase, es decir, lo hacen a diferente tiempo (Rohr et al., 2019). En este sentido, la capacidad que tiene el NSQ para codificar cada una de las estaciones y mostrar cierta plasticidad es muy relevante para muchos procesos biológicos, por ejemplo, la reproducción, el metabolismo, el funcionamiento del sistema inmune y el sueño, todo esto acompañado de procesos de comunicación neuronal.

Estudios recientes demostraron que la expresión de NKCC1 y KCC2 en el NSQ está regulada de manera espacio-temporal bajo condiciones de iluminación 12:12h luz-oscuridad, lo que puede contribuir a las diferencias regionales en la excitabilidad de las neuronas reloj y las respuestas GABAérgicas (Rohr et al., 2019).

Por esta razón, estudiar el papel de los cotransportadores ayudaría a una mejor comprensión de la vía de fosforilación WNK-SPAK/OSR1 y saber si la cinasa SPAK regula directamente la actividad y expresión de los cotransportadores NKCC1 y KCC2 en las neuronas del NSQ, de ser así podría considerarse como un mecanismo de codificación diaria del día y la noche asociado al ciclo de sueño-vigilia de los mamíferos.

Hipótesis

Los cambios en el nivel de cloruro intracelular que determinan la excitabilidad neuronal de la región ventral y dorsal del NSQ en el ciclo de luz-oscuridad, está dada por la actividad de la vía WNK-SPAK/OSR1-NKCC1-KCC, por lo que si se inactiva la cinasa SPAK, entonces conducirá a modificaciones en la actividad neuronal en este núcleo a lo largo del día y la noche.

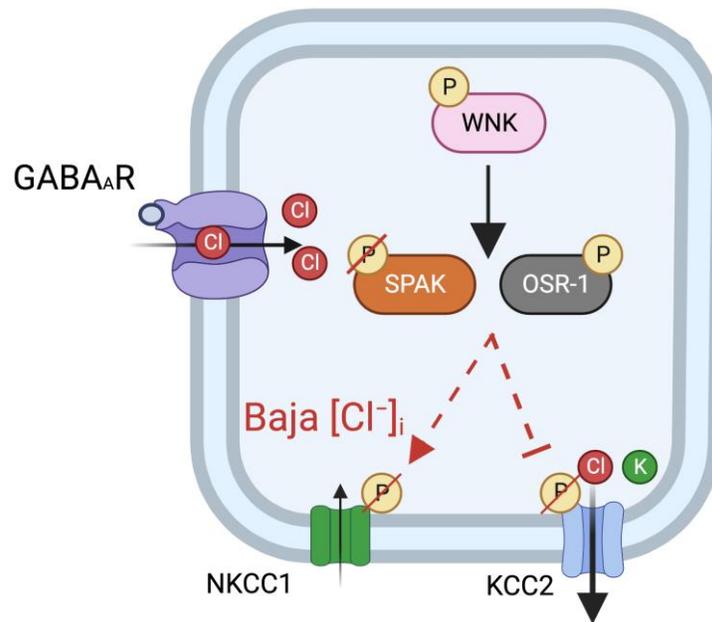


Figura 12: Modelo de la inactivación de la cinasa SPAK en los ratones mutantes SPAK-KI. En este modelo se espera que la inactivación de SPAK conduzca a una disminución del cloruro intracelular debido a la actividad de KCC2, por lo cual, GABA tendrá un efecto inhibitorio que se verá reflejado como un decremento de la actividad neuronal del NSQ.

Objetivo general

Evaluar la relevancia de la función de la cinasa SPAK en la actividad neuronal del núcleo supraquiasmático.

Demostrar que hay cambios en la actividad neuronal mediante la expresión de *c-fos* durante el ZT2 y ZT14 entre ratones que expresan una versión inactiva de la cinasa SPAK (ratones SPAK-KI) y sus hermanos silvestres.

Objetivos particulares

- Realizar una revisión sistemática de la literatura para identificar reportes sobre la expresión de los componentes de la vía WNK-SPAK/OSR1-NKCC1-KCC en el núcleo supraquiasmático y definir la consistencia de los hallazgos.
- Identificar si los integrantes de la vía WNK-SPAK/OSR1-NKCC1-KCC exhiben un ritmo diario de expresión mediante un análisis *in silico* de los niveles de ARNm a lo largo de dos ciclos circadianos.
- Cuantificar el número de células inmunopositivas a c-Fos en el núcleo supraquiasmático de los ratones silvestres y SPAK-KI durante dos puntos temporales del ciclo de luz-oscuridad.

II Métodos

II.1 Revisión de las bases de datos

Se empleó la base de datos Circadian Expression Profiles Data Base (CircaDB) para obtener información acerca de la expresión del ARNm de los componentes de la vía WNK-SPAK/OSR1-NKCC1-KCC. Base de datos CircaDB disponible en: <http://circadb.hogenes-chlab.org/mouse>. Se utilizó el nombre de los genes que codifican a estas proteínas, como se muestra a continuación: *wnk1* para WNK1, *wnk2* para WNK2, *wnk3* para WNK3, *wnk4* para WNK4, *stk39* para SPAK, *osr1* para OSR1, *slc12a2* para NKCC1, *slc12a5* para KCC2, *slc12a6* para KCC3 y *slc12a7* para KCC4.

A partir de la secuenciación del transcriptoma del NSQ de ratón realizado por Wen y colaboradores (2020), se revisó la tabla suplementaria 6 para identificar la presencia de los transcritos de la vía WNK-SPAK/OSR1-NKCC1-KCC dentro del núcleo supraquiasmático. Luego se utilizó el atlas 3D del NSQ para analizar los patrones de expresión de genes específicos en los principales dominios neuronales: AVP y VIP (atlas 3D del NSQ de ratón disponible en: <http://yanlab.org.cn/scn-atlas/>). Posteriormente se buscaron los genes de interés en la tabla suplementaria 2 (Wen et al., 2020), la cual muestra los resultados del análisis de

genes rítmicos por JTK Cycle y regresión no lineal en todos los tipos de células básicas y todos los subtipos de neuronas. A partir de estos datos se graficaron los niveles de expresión de cada gen a lo largo de dos ciclos circadianos.

II.2 Genotipado

Todos los ratones usados para este trabajo fueron genotipados al menos dos veces, esto para asegurarse de la identificación correcta de cada ratón. La primera genotipación se hizo al destete para identificar el genotipo de las crías y asignar a los sujetos a cada grupo experimental. La segunda genotipificación corresponde a la realizada después del sacrificio.

Brevemente, el ADN se extrajo de biopsias de cola de los ratones, a las cuales se les agregó un buffer de lisis (NaOH 100mM a 90°C durante 40 min), se centrifugaron por 2 min a 20°C y 10,000 rpm, luego se les agregó Tris-HCl 0.17mM a pH 8.0, se volvieron a centrifugar con los mismos parámetros y se agitaron mediante un vórtex durante 10 seg. El ADN se amplificó mediante PCR y los productos amplificados se analizaron en geles de agarosa al 1.5% con tiempo de corrida de 50 min a 80V.

El programa de PCR consistió en el siguiente protocolo: desnaturalización inicial (2 min a 95°C), 40 ciclos de desnaturalización (30 seg a 95°C), alineamiento (1 min a 55°C) y extensión (1 min a 72°C), y un ciclo de extensión final (7 min a 72°C). Se utilizaron los oligonucleótidos F1 (ACCTGATATGTTGGCGTGCTTGTA) y los oligonucleótidos R1 (GGCT AAGAATGCGCTTACTCCAAA) para detectar los alelos de tipo salvaje y *knock-in*. El genotipo de cada ratón se estableció de acuerdo con el tamaño de la banda WT:580 pb, KI:680 pb y HET: 580 y 680 pb (fig. 13).

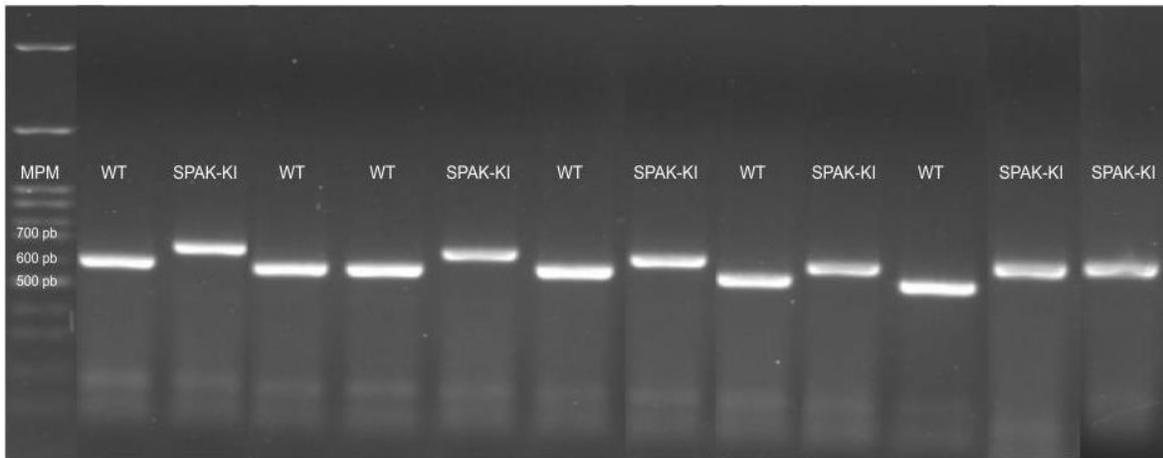


Figura 13: Electroforesis de ADN con los productos de la PCR de los genotipados realizados a partir de las biopsias de la cola de ratones. El primer carril corresponde al marcador de peso molecular (MPM) de 100 pb. Banda silvestre (WT): 580 pb y *knock-in*: 680 pb.

II.3 Condiciones de los animales de experimentación

Se utilizaron ratones de la cepa SPAK-KI de 12 a 20 semanas que estuvieron en ciclos de luz-oscuridad 12:12h (encendido de la luz a las 7:00 am que corresponde al ZT0 y apagado de la luz a las 7:00 pm que corresponde al ZT12) con acceso a comida y agua ilimitada. Se obtuvieron los siguientes grupos (fig. 14):

- Grupo 1: 3 ratones silvestres sacrificados en el ZT2
- Grupo 2: 3 ratones SPAK-KI sacrificados en el ZT2
- Grupo 3: 3 ratones silvestres sacrificados en el ZT14
- Grupo 4: 3 ratones SPAK-KI sacrificados en el ZT14

Cálculo del número de individuos por grupo

Para los experimentos se utilizaron ratones macho de los genotipos antes mencionados. Cada grupo contó con 3 individuos de acuerdo al cálculo del tamaño de la muestra (n) realizado con la técnica recomendada por Dell y colaboradores (2002). Se tomó en cuenta el comparativo entre el número de células c-Fos positivas detectadas en el trabajo de Toledo en el que se compararon distintos puntos temporales (Toledo et al., 2005). Para los fines de este trabajo, se utilizaron los valores obtenidos en el ZT1 y ZT13 reportados en la figura 1 (Toledo

et al., 2005) que son cercanos a los puntos que se utilizaron en esta tesis. Tomando en cuenta la diferencia del número de células c-Fos positivas observadas en la gráfica de dicha figura en el NSQ entre el día (90 ± 20) y la noche (30 ± 10), la variación es de 60 células con una desviación estándar del grupo control de ± 20 células.

Sí con la fórmula: $N=1+2C(s/d)^2$

En donde C se calcula con el poder y la significancia estadística para un alfa de 0.05 y beta de 90, entonces C corresponde a 10.51. La S es la desviación estándar (20) de la variable y la D el cambio que se espera ver (60) .

Por lo que la fórmula queda de la siguiente manera: $n=1+21*(20/60)^2=3.3$ sujetos.

Este dato también es respaldado por los primeros reportes de la expresión de c-Fos en el NSQ de roedores. Takeuchi y colaboradores (1993) en la figura 10 y 11 reportan cambios significativos de la actividad neuronal del NSQ entre el día y la noche con una n de 3.

Así, cada grupo experimental constó de 3 individuos.

Sin embargo, se tuvo problemas al cortar un cerebro de un ratón SPAK-KI de ZT14, por este motivo se perdieron las secciones de tejido correspondientes a un animal.

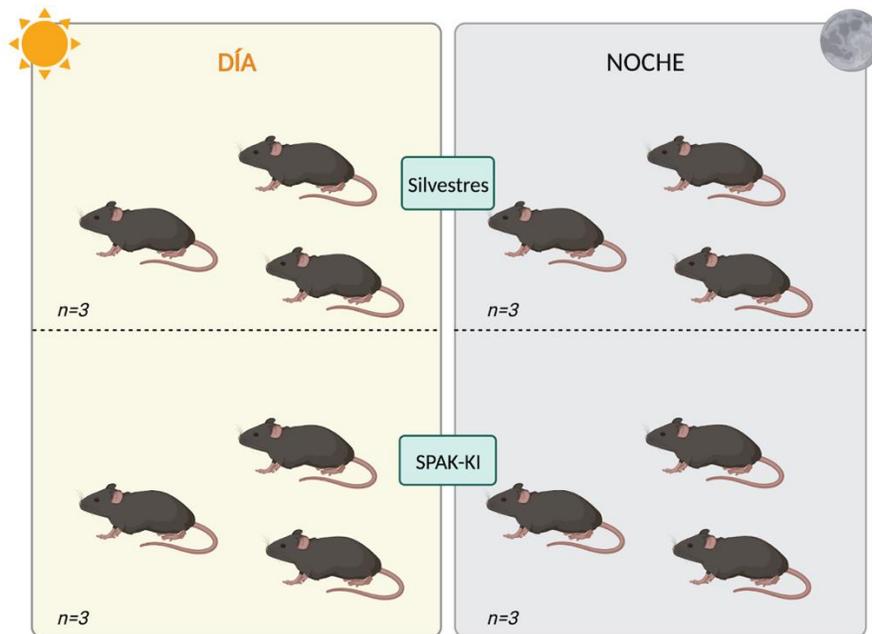


Figura 14: Diseño experimental. Se formaron 4 grupos de ratones cada uno conformado por tres individuos ($n=3$), se sacrificaron 3 ratones silvestres y 3 ratones SPAK-KI en el ZT2 y en el ZT14.

Los estudios se realizaron de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (National Academy Press, Washington DC, 1996) y fueron aprobados en un protocolo piloto por el Comité Institucional para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (Autorización: NMM-2003).

II.4 Perfusiones

Para sacrificar a los ratones se utilizó pentobarbital sódico inyectado intraperitonealmente a una dosis letal de 150 mg/kg de peso. Una vez dormido el ratón y verificado que no presentara signos de dolor se procedió a realizar una incisión abdominal para exponer el corazón. Se cortó la aurícula derecha y se inyectó 10 mL de solución salina por el ventrículo izquierdo, seguidos de 10 mL de paraformaldehído (PFA 4%). Posteriormente, se extrajo el cerebro y se incubó en PFA 4% por 24h. Luego se lavó el cerebro con solución amortiguadora salina de fosfatos (PBS) por otras 24h y se colocó en sacarosa 30% por las últimas 24h.

II.5 Cortes de cerebro

El cerebro se cortó en el criostato modelo SLEE MEV a -25°C y se hicieron rebanadas de $30\ \mu\text{m}$ de grosor para proceder con la inmunohistoquímica contra *c-fos*. Las secciones de tejido fueron almacenadas en sacarosa 30%.

II.6 Inmunohistoquímica

Se empleó el método de inmunohistoquímica con el fin de comparar la actividad neuronal del NSQ en dos puntos opuestos a lo largo de las 24 horas. Cabe mencionar que todo el tejido se procesó simultáneamente como se describe a continuación.

Las secciones de tejido flotantes se enjuagaron 3 veces en PBS 1X durante 5 minutos cada uno, luego se les añadió la solución de peroxidación 3% (3 ml metanol + 3 ml H_2O_2 30% + 24 ml PBS 1X) durante 10 minutos y se mantuvieron en agitación, esto con el propósito de acabar con las peroxidases endógenas. Posteriormente, se realizaron 3 lavados en PBS 1X durante 5 minutos cada uno y las secciones de tejido se transfirieron al buffer de citrato de sodio 2X (95°C) durante 3 minutos para exponer el antígeno. Después de que el tejido volvió a temperatura ambiente (10 minutos), los cortes se enjuagaron 3 veces en PBS 1X durante 5 minutos cada uno. A continuación, el tejido se incubó en anticuerpo primario anti-c-Fos (1:500; Millipore, n.º618201, referencia ABE457) en solución diluyente (albúmina de suero bovino (ASB) y suero de burro 2,5% v/v en TBS 1X) durante 4h a temperatura ambiente y luego se dejó 48h a 4°C en agitación.

Después del periodo de incubación, las secciones de tejido flotantes se enjuagaron 3 veces en PBS 1X durante 5 minutos cada uno y luego se incubaron en anticuerpo secundario (1:500; anti-IgG de conejo hecho en burro acoplado a biotina, Jackson Immuno 711-065-152) en solución diluyente durante 2h a temperatura ambiente y en agitación. Posteriormente, el tejido se enjuagó 3 veces en PBS 1X durante 5 minutos cada uno y luego se añadió el complejo ABC (50 μL A + 50 μL B aforado con PBS 1X) (VectorLabs) volumen final de 25 ml y se dejó en agitación durante 1h a temperatura ambiente. Luego, el tejido se enjuagó 3 veces en PBS 1X durante 5 minutos cada uno y se transfirió a la solución de DAB por 1.5

minutos. Dado que la reacción es inmediata, pasado el tiempo los cortes se sumergieron rápidamente en PBS 1X tres veces. Todo lo que tuvo contacto con DAB fue neutralizado con cloro. Como controles negativos se incubaron varios cortes de tejido sin anticuerpo primario y los pasos posteriores fueron los mismos a los descritos previamente, en los controles no se observó la señal de c-Fos.

Las secciones de tejido se montaron en portaobjetos electrocargados (Thermo Fisher) y se dejaron secar durante 12h. Seguido a esto, se realizó el tren de deshidratación que consistió en pasar dos veces las laminillas por etanol al 70%, etanol 90%, etanol #1 100%, etanol #2 100%, xilol #1 y xilol #2. Por último, a cada laminilla se le colocó entellan para fijar y se cubrió con un cubreobjetos.

II.7 Microscopía y cuantificación

Todas las imágenes de inmunohistoquímica se capturaron con un objetivo con aumento de 10X para abarcar todo el NSQ. Se utilizó un microscopio Zeiss modelo Primostar 3 de campo claro y los parámetros se fijaron para todas las imágenes, de modo que se pudieran realizar comparaciones directas de la señal de c-Fos. Para el análisis de la actividad neuronal del NSQ se utilizó el programa de Fiji, el cual es un paquete de procesamiento de imágenes distribuido por ImageJ. Primero se creó una macro que consistió en grabar una serie de comandos usando una imagen del NSQ, brevemente, se seleccionó toda el área, la imagen se convirtió en 8 bits, se eliminó el fondo claro y como límite (umbral) se definió de 0-210.

Posteriormente, a cada imagen cargada en Fiji se definió la región de interés (ROI) que incluía cada NSQ unilateral, o bien, sólo se incluyó la parte ventral (vNSQ) o dorsal (dNSQ) del núcleo supraquiasmático. Luego se realizó el conteo de las células positivas a c-Fos para lo cual se utilizó la opción de analizar partículas y se establecieron los siguientes parámetros: tamaño (pulgadas al cuadrado: 30-800) y circularidad (0.50-1.00). A partir de la cuantificación de las células inmunopositivas a c-Fos de la parte dorsal y ventral del NSQ de ratones SPAK-KI y SPAK-WT, se hizo el promedio por ratón para posteriormente realizar las comparaciones entre las regiones antes mencionadas durante los dos puntos temporales.

II.8 Estadística

Se utilizó la prueba t-Student para analizar la actividad neuronal del NSQ de los ratones SPAK-KI y silvestres en el ZT2 y ZT14. La significancia se fijó en $p < 0.05$. El análisis se realizó en el software GraphPad Prism versión 9.0.1. Los datos son reportados como el promedio de los valores \pm el error estándar.

III Resultados y discusión

III.1 Expresión de los genes involucrados en la vía WNK-SPAK/OSR1-NKCC1-KCCs en las células del núcleo supraquiasmático

Para determinar los tipos celulares o regiones en las que se expresan los genes de la vía WNK-SPAK/OSR1-NKCC1-KCCs dentro del NSQ se realizó una revisión sistemática de la literatura (Tabla 1). Si bien existen distintos trabajos en los que se analiza la expresión de los cotransportadores en el cerebro, para fines de este trabajo se consideraron únicamente los reportes sobre la localización en el NSQ. Se identificaron cinco artículos publicados con información obtenida gracias a las técnicas de PCR cuantitativa en tiempo real o inmunoensayos de tipo inmunofluorescencia, para detectar los niveles de transcrito y observar la presencia de la proteína respectivamente. Estos trabajos reportaron comparaciones de la expresión entre la región ventral y dorsal, durante el día y la noche o en condiciones de luz u oscuridad constante.

Entre estos trabajos se encontraron discrepancias, por ejemplo, algunos autores reportan que la expresión de NKCC1 aumenta durante la noche específicamente en la región dorsal del NSQ (Hee et al., 2008; Rohr et al., 2019), sin embargo, Belenky no encontró esta diferencia (Belenky et al., 2010). Dicha inconsistencia se puede deber a que los autores lo reportaron en las subdivisiones ventral y dorsal, siendo que según Belenky, la expresión de los cotransportadores no se limita únicamente a la región, sino que se expresan de manera

específica dependiendo del tipo celular (*e. g.* KCC2 se expresa en las neuronas VIP, que se encuentran principalmente en la región ventral pero también hay algunas neuronas VIP en la parte dorsal) (Belenky et al., 2010). Por esta razón se propone como una perspectiva a este trabajo estudiar la expresión de los cotransportadores en el NSQ reconociendo el tipo neuronal gracias a la co-localización contra péptidos que identifiquen los subtipos neuronales.

Se sabe que la expresión de KCC2 es exclusiva de las neuronas VIP y que se distribuyen principalmente en la región ventral del NSQ. En la región dorsal se encuentran otras isoformas como KCC3 y KCC4 (Belenky et al., 2010). De acuerdo con la literatura KCC2 es el principal regulador de los niveles de cloruro en las neuronas (Klett y Allen, 2017) y se sugiere que las acciones excitatorias evocadas por el GABA son más comunes en las neuronas AVP que expresan KCC4 (Klett y Allen, 2017). Es importante señalar que hasta el momento no hay reportes de que la expresión de KCC2 cambie dependiendo de la región del NSQ o del periodo de luz-oscuridad (Rohr et al., 2019).

A pesar de las inconsistencias encontradas en la expresión de los cotransportadores dentro del NSQ, parece claro que NKCC1 se expresa ampliamente en todo el NSQ, mientras que KCC1 y KCC2 son exclusivos de la región ventral y las isoformas KCC3 y KCC4 se expresan en la parte dorsal (Belenky et al., 2010).

Para identificar la posible expresión rítmica de los componentes de la vía WNK-SPAK/OSR1-NKCC1-KCCs, se realizó una búsqueda en la base pública de datos Circadian Expression Profiles Data Base (disponible en: <http://circadb.hogeneschlab.org/mouse>). Esta base de datos es un compilado de información de Gene Atlas, Gene Wiki y CircaDB, además utiliza a los algoritmos JTK, PSEA, MetaCycle y CYCLOPS que permiten identificar la ritmicidad en la expresión de los genes. En la tabla 1 se incluye la información sobre la expresión y el tejido del cual se reporta con los datos actualizados al momento (18 de noviembre del 2022).

Se identificó que los genes *slc12a2* y *wnk2* presentan un ritmo de expresión diario cercano a las 24 horas, lo cual sugiere que probablemente se expresan de manera circadiana en el núcleo supraquiasmático (fig. 15).

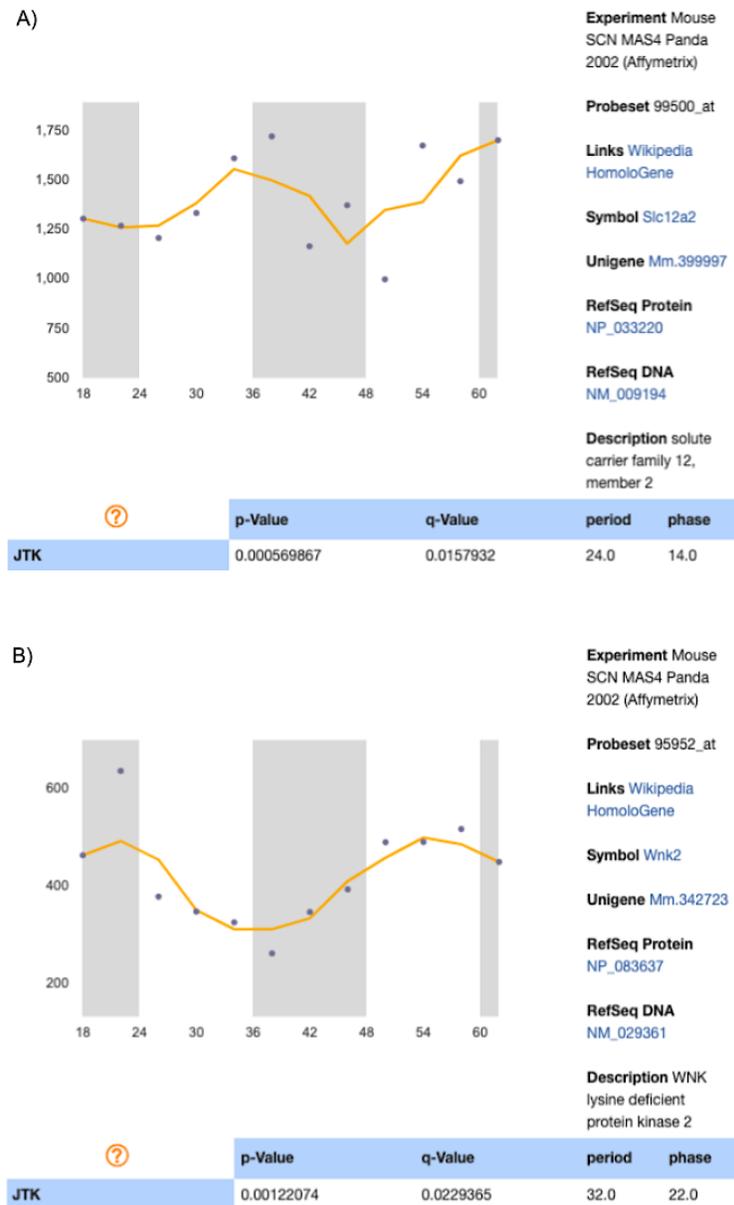


Figura 15: Expresión diaria del gen A) *slc12a2* que codifica para NKCC1 y B) *wnk2* que codifica para la proteína WNK2. Datos consultados el 18 de noviembre del 2022. $p < 0.05$ sugiere que probablemente los genes se expresan de manera circadiana en el núcleo supraquiasmático.

Tabla 1: Hallazgos sobre la vía WNK-SPAK/OSR1-NKCC1-KCCs en el NSQ

Gen	Proteína	Expresión en tejido/ tipo celular	Método	Hallazgo	Referencia
<i>wnk1</i>	WNK1	NSQ	Drop-seq	Presencia del ARNm que codifica para WNK1	Wen et al., 2020
<i>wnk2</i>	WNK2	NSQ	Drop-seq	Presencia del ARNm que codifica para WNK2	Wen et al., 2020
		NSQ	Base de datos	Expresión rítmica circadiana del gen que codifica para WNK2	Circadian Expression Profiles Data Base
<i>wnk3</i>	WNK3	NSQ	Drop-seq	Presencia del ARNm que codifica para WNK3	Wen et al., 2020
		NSQ / neuronas VIP y AVP	IF	WNK3 es la isoforma más común dentro del NSQ	Belenky et al., 2010
<i>wnk4</i>	WNK4	NSQ	Drop-seq	Presencia del ARNm que codifica para WNK4	Wen et al., 2020
<i>stk39</i>	SPAK	NSQ	Drop-seq	Presencia del ARNm que codifica para SPAK	Wen et al., 2020
<i>osr1</i>	OSR-1	NSQ	Drop-seq	Presencia del ARNm que codifica para OSR-1	Wen et al., 2020
		NSQ / neuronas VIP, AVP y GRP		NKCC1 se expresa en todo el NSQ	
			IF	Durante ZT5-7, NKCC1 se expresa principalmente en la región dorsal. Sin embargo, su expresión es invariable entre ZT5 y ZT17	Belenky et al., 2010
			WB	En ZT16 aumenta la expresión de NKCC1 en la región dorsal	Hee et al., 2008
			IF	La expresión de NKCC1 aumenta en luz constante (fotoinducible). NKCC1 muestra un ritmo de expresión circadiana, siendo mayor en CT1 y CT19	McNeill et al., 2020
<i>slc12a2</i>	NKCC1		RT-PCR	No hay diferencias en la expresión de NKCC1 a lo largo del día y la noche	
		NSQ		En la región dorsal, NKCC1 presenta una alta expresión en ZT15	Rohr et al., 2020
			IF	En la región ventral, la expresión de NKCC1 incrementa en ZT3	
				Existe mayor expresión de NKCC1 en la región ventral en comparación a la dorsal	McNeill et al., 2020; Rohr et al., 2020
			Imagenología de Ca ²⁺	NKCC1 es necesario para las respuestas excitatorias evocadas por el GABA	Hee et al., 2008
			Base de datos	Expresión rítmica circadiana del gen que codifica para NKCC1	Circadian Expression Profiles Data Base
		NSQ / neuronas VIP	IF	KCC2 se distribuye en la región ventral	Belenky et al., 2010
<i>slc12a5</i>	KCC2	NSQ	Registros electrofisiológicos	KCC2 es necesario para las respuestas inhibitorias evocadas por el GABA	Olde et al., 2018
			IF	La expresión de KCC2 disminuye con la luz y se mantiene constante a lo largo del día y la noche	Rohr et al., 2020
		NSQ / neuronas VIP-NMS	Drop-seq	Expresión del gen que codifica para KCC2	Wen et al., 2020
<i>slc12a6</i>	KCC3	NSQ / neuronas AVP	IF	KCC3 se distribuye en la región dorsal	Belenky et al., 2010
		NSQ / neuronas GRP-VIP	Drop-seq	Expresión del gen que codifica para KCC3	Wen et al., 2020
<i>slc12a7</i>	KCC4	NSQ / neuronas AVP	IF	KCC4 se localiza en la región dorsal. Son más comunes las respuestas excitatorias evocadas por GABA en estas neuronas	Belenky et al., 2010
		NSQ	Drop-seq	Presencia del ARNm que codifica para KCC4	Wen et al., 2020

Como se mencionó previamente la actividad neuronal del NSQ se regula por el efecto del GABA y de los circuitos neuronales entre la percepción de la parte ventral y su comunicación con la dorsal. Dicha actividad cambia entre el día y la noche debido a los cambios en los potenciales de acción ocasionados por la concentración de cloruro que a su vez está

regulado por la actividad de los cotransportadores NKCC1 y KCCs (Alamilla et al., 2014; Farajnia et al., 2014; Hee et al., 2008; Klett y Allen, 2017; McNeill et al., 2020; Olde Engberink et al., 2018; Rohr et al., 2019). La contribución funcional de estos cotransportadores en la regulación de los niveles de cloruro en las neuronas puede deberse no sólo a su expresión sino también a su actividad, la cual está determinada por su fosforilación a través de proteincinasas como SPAK, OSR1 y WNKs que se encuentran río arriba de la vía (Alessi et al., 2014; Delpire y Gagnon, 2008; Kim et al., 2018; Moriguchi et al., 2005; Thastrup et al., 2012; Vitari et al., 2006). Las proteínas WNKs son sensores moleculares de cloruro que regulan la concentración de dicho ion por medio de la activación o inhibición de los CCCs (Garzón-Muvdi et al., 2007; Kahle et al., 2005; Lim et al., 2021; Moriguchi et al., 2005; Piala et al., 2014; Rinehart et al., 2011; Vitari et al., 2005; Zagórska et al., 2007), utilizando como intermediarios de la vía a la cinasa SPAK y su homólogo funcional OSR1.

De acuerdo con los datos reportados sobre la distribución diferencial de los cotransportadores dentro del NSQ (tabla 1) y la contribución de NKCC1 y KCC2 en el mantenimiento de la polaridad neuronal de este núcleo, se decidió averiguar si los componentes de la vía WNK-SPAK/OSR1, que regulan la actividad de NKCC1 y KCC2, se expresan dentro del NSQ, de ser así en qué tipo neuronal se expresan. Para ello se realizó un análisis *in silico* y modelado 3D a partir del transcriptoma del NSQ de ratón generado por Wen y colaboradores (2020). Utilizando el atlas 3D de los subtipos neuronales del NSQ (disponible en: <http://yanlab.org.cn/scn-atlas/>) y los perfiles espaciales de la expresión génica generado por el mismo grupo de investigación, se logró obtener una aproximación de la distribución de las proteínas y su nivel de expresión. Primero surgió la siguiente duda: ¿En qué tipo neuronal se expresa el gen *wnk*? Se encontró que los genes que codifican para las cuatro isoformas de las cinasas WNK se expresan en todo el NSQ, tanto en el dominio de las neuronas AVP como en el dominio de las neuronas VIP (fig. 16A-D). En este modelo se observa mayor abundancia del ARNm que codifica para la proteína WNK1 (fig. 16A), seguida de WNK2 (fig. 16B). Sin embargo, es posible notar que la expresión del gen *wnk3* no es tan abundante como se reporta por medio de la técnica de inmunofluorescencia, ya que según Belenky y colaboradores, WNK3 es la isoforma más común dentro del NSQ (Belenky et al., 2010).

Para determinar en qué neuronas del NSQ se expresa el gen que codifica para la cinasa SPAK y su homólogo funcional OSR1 también se utilizó el atlas 3D del NSQ. Se observó que el gen *stk39* que codifica para SPAK se expresa tanto en el dominio de las neuronas AVP como en el dominio de las neuronas VIP (fig. 16E), lo cual sugiere que la proteína SPAK probablemente se distribuye en ambas regiones del núcleo supraquiasmático. Es relevante mencionar que hasta la fecha no se ha demostrado la presencia de SPAK en el NSQ, sin embargo, este estudio es una excelente aproximación. Otro hallazgo importante es la expresión del gen que codifica para OSR1, en este caso la abundancia del transcrito es muy baja (fig. 16F), lo cual sugiere que probablemente la proteincinasa SPAK es más relevante en la vía. Sin embargo, este resultado no es concluyente por lo que hacen falta más estudios que demuestren la presencia y función de las cinasas SPAK y OSR1 dentro del NSQ al estudiar su expresión a nivel proteico y no sólo a nivel del ARNm.

Respecto a la expresión del cotransportador NKCC1, se confirmó su expresión tanto en las neuronas AVP como en las neuronas VIP, es decir, en ambas regiones del NSQ (fig. 16G), tal y como se reportó previamente (Belenky et al., 2010). En cuanto al transcrito de KCC2 se encontró una discrepancia con reportes previos los cuales detectaron la presencia del cotransportador KCC2 solo en la región ventral del NSQ, en las neuronas VIP pero no en las neuronas AVP (Belenky et al., 2010; Rohr et al., 2019). Sin embargo, de acuerdo con este modelo se observa que el ARNm para KCC2 se localiza en las neuronas VIP y AVP (fig. 16H). Dicha inconsistencia se puede deber a que en los trabajos previos se utilizó la técnica de inmunofluorescencia y la sensibilidad de los anticuerpos puede dar estas variaciones, o puede que participen procesos de regulación postraduccional que involucren la degradación de la proteína en determinado tipo neuronal.

El gen que codifica para KCC3 se expresa en todo el núcleo supraquiasmático aunque con mayor abundancia en las neuronas AVP (fig. 16I). En cuanto a la expresión del gen que codifica para KCC4 es más abundante en las neuronas vasopresinérgicas (fig. 16J).

Por último, en el modelado 3D se incluyó la expresión del gen *gad1* que codifica para la enzima descarboxilasa del ácido glutámico (GAD67 o también conocida como GAD1).

Este gen se expresa ampliamente en todo el NSQ, tanto en el dominio de las neuronas AVP como en las neuronas VIP (fig. 16K). Esto confirma que la mayoría de las neuronas del NSQ son de naturaleza GABAérgica (Belenky et al., 2008).

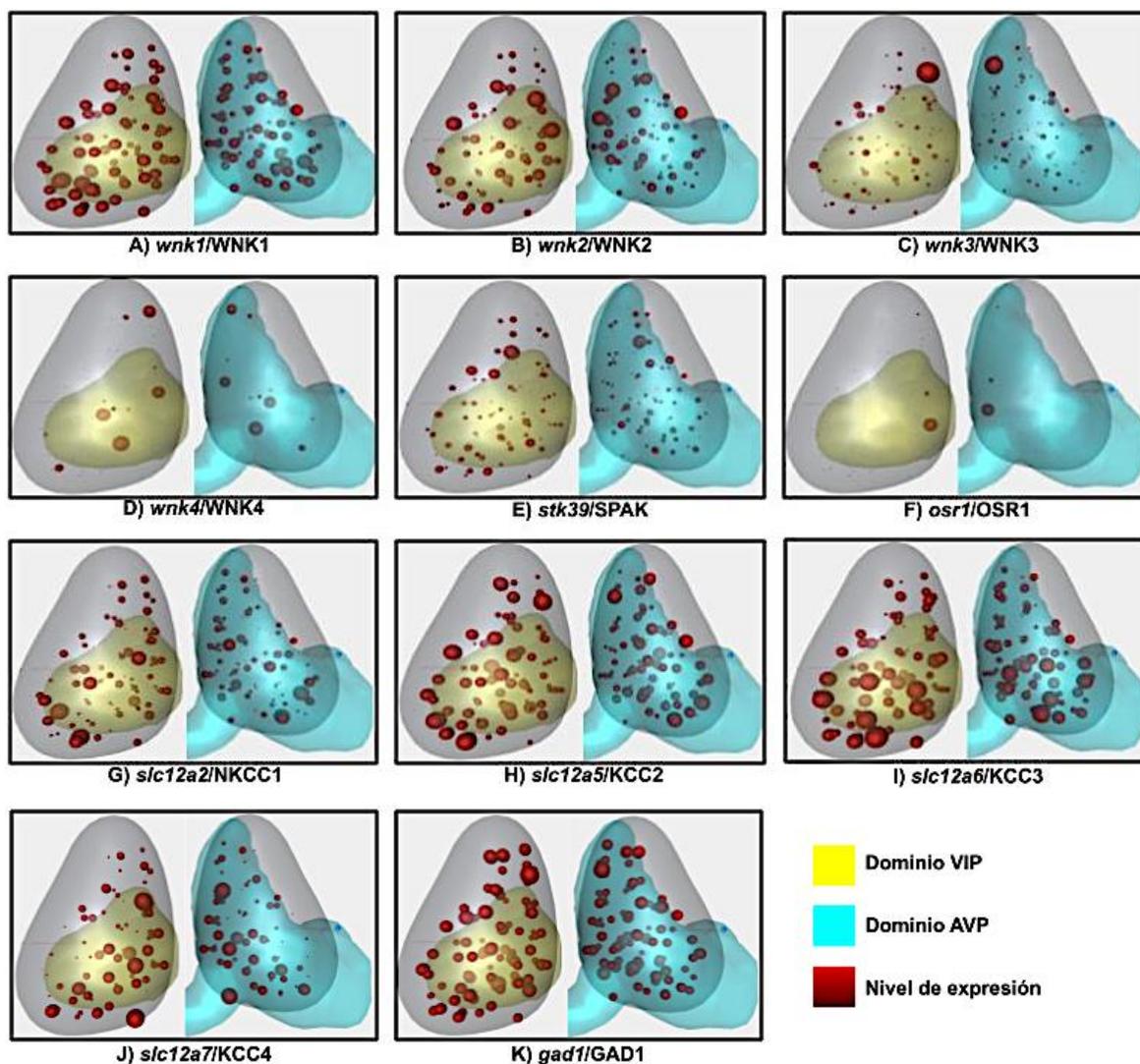


Figura 16: Modelo 3D de los genes que codifican para las proteínas involucradas en la vía WNK-SPAK/OSR1-NKCC1-KCCs en el NSQ de ratón. Dominio de las neuronas AVP (azul) y dominio de las neuronas VIP (amarillo), expresión de los genes (rojo) y volumen que abarca el NSQ (gris). Análisis realizado a partir de los datos obtenidos por: Wen S. et al. (2020).

III.2 Análisis de la expresión rítmica de la vía WNK-SPAK/OSR1-NKCC1-KCCs en células del núcleo supraquiasmático

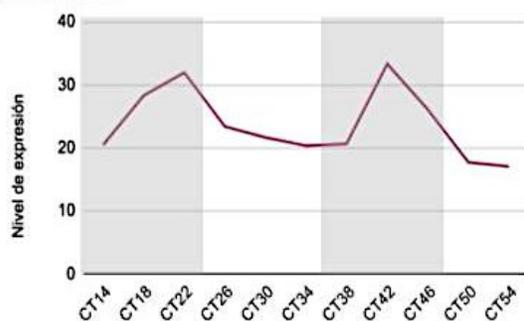
Para determinar el ritmo de expresión de los genes en el NSQ, Wen y colaboradores utilizaron el algoritmo JTK Cycle que permite detectar genes rítmicos circadianos a escala del genoma (Hughes et al., 2010). Encontraron que todas las células que conforman al NSQ expresan genes de manera rítmica, sobre todo los genes reloj como *bmal*, *per2*, *nr1d1*, *nrd1d2* y *dbp* (Wen et al., 2020). A partir de esos hallazgos surgió la siguiente pregunta: ¿Los genes involucrados en la vía WNK-SPAK/OSR1-NKCC1-KCCs se expresan de forma rítmica en el NSQ? Para resolverlo se utilizó la base de datos generada por Wen y colaboradores en donde se realizó la búsqueda de los genes de interés. Una vez identificado los genes que se expresan rítmicamente y sus niveles de expresión del ARNm se procedió a graficar dicha expresión en dos ciclos en oscuridad constante. A partir de esto se encontró que la expresión del gen *wnk3* sigue un ritmo circadiano en neuronas y astrocitos. De manera general se observa que las neuronas muestran mayor expresión de *wnk3* durante la noche (fig. 17A), caso contrario en los astrocitos (fig. 17B). Las células NG2, precursoras de los oligodendrocitos, expresan rítmicamente al gen *wnk2* con poco nivel de ARNm al inicio del día y mayor expresión conforme se acerca la noche (fig. 17C). En las neuronas, el gen *slc12a2* que codifica para el cotransportador NKCC1 no muestra una tendencia clara en su expresión, sin embargo, parece que hay un mayor nivel de ARNm durante la noche subjetiva (fig. 17D). El gen *slc12a2* también se expresa rítmicamente en la microglia (fig. 17E).

Por otra parte, el gen *slc12a5* que codifica para KCC2 exhibe un ritmo de expresión circadiana en las neuronas VIP+/NMS+, lo cual es consistente con la literatura ya que el cotransportador se distribuye sólo en la región ventral del NSQ (Belenky et al., 2010). Sin embargo, a nivel de transcrito parece que la expresión del gen disminuye al inicio del día y aumenta conforme se acerca la noche (fig. 17F). Este hallazgo sugiere que probablemente la expresión de la proteína cambia con el ciclo de luz-oscuridad de los ratones, pero de acuerdo con la literatura es más acorde pensar que lo que está ciclando no es su expresión, sino su fosforilación. De hecho, en un estudio reciente de fosfoproteómica se demostró que un poco más de la mitad de las cinasas presentes en el cerebro anterior muestran una fosforilación

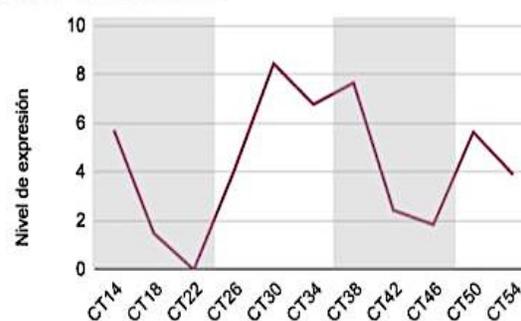
cíclica, con una sobrerrepresentación de las cinasas serina treonina de la familia STE a la cual pertenecen SPAK y OSR1 (Brüning et al., 2019). Inclusive en ese estudio observaron cambios cíclicos en la fosforilación de WNK1, WNK2, KCC2, KCC3 y NKCC1 a escala de todo el cerebro (Brüning et al., 2019). Esto sugiere que lo que está ciclando en el día y la noche puede ser la fosforilación de las proteínas, incluidas las que en su abundancia total no ciclan como KCC2 o la cinasa SPAK.

El gen *slc12a6* que codifica para KCC3 se expresa rítmicamente en las neuronas GRP+/VIP+ (fig. 17G), sin embargo, por el método de inmunofluorescencia se observó previamente que KCC3 es exclusivo de la región dorsal del NSQ y co-localiza con las neuronas AVP (Belenky et al., 2010). A nivel de transcrito parece que la expresión del gen *slc12a6* es mayor al inicio de la noche subjetiva (fig. 17G). Por último, se encontró que el gen *gad1* - codificante para la enzima que sintetiza al neurotransmisor GABA- también se expresa rítmicamente en las neuronas CCK+/C1QL3+ las cuales se distribuyen en todo el NSQ (fig. 17H). Dicho gen muestra mayor expresión durante el día subjetivo en comparación a la noche subjetiva, lo cual sugiere que el GABA probablemente es más abundante en el día.

A) N1/WNK3



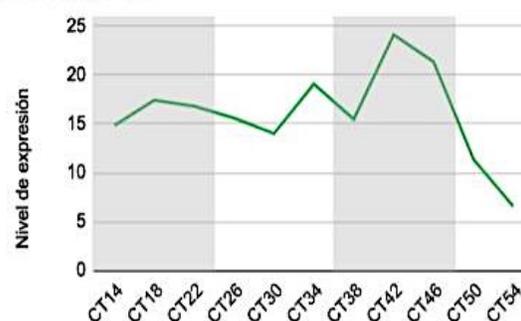
B) Astrocitos/WNK3



C) NG2/WNK2



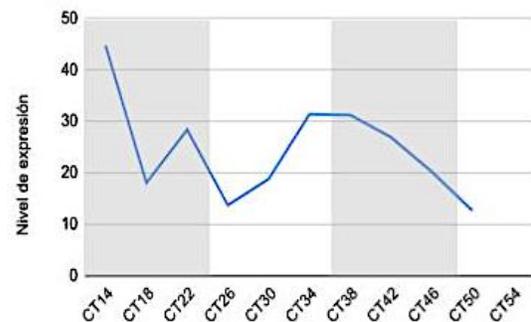
D) N1/NKCC1



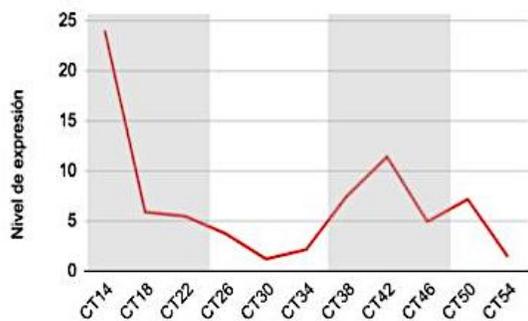
E) Microglia/NKCC1



F) VIP_NMS/KCC2



G) GRP_VIP/KCC3



H) CCK_C1QL3/GAD1

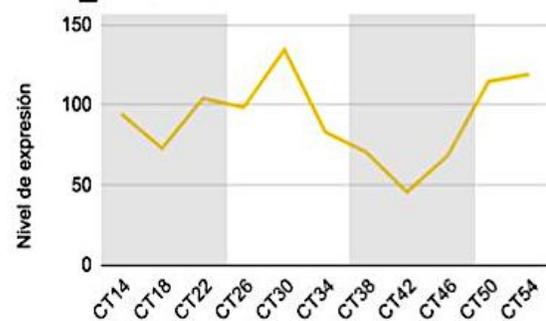


Figura 17: Genes rítmicos circadianos involucrados en la vía WNK-SPAK/OSR1-NKCC1-KCCs en el núcleo supraquiasmático de ratón. Las barras de color gris representan la noche subjetiva y las barras de color blanco corresponden al día subjetivo. En total se abarcan dos ciclos circadianos. Análisis realizado a partir de los datos obtenidos por: Wen S. et al. (2020).

A partir de los niveles de expresión de los genes rítmicos involucrados en la vía WNK-SPAK/OSR1-NKCC1-KCCs se tomó en cuenta el momento de mayor expresión de cada uno de los genes, definido como acrofase, a lo largo de los dos ciclos circadianos. Se obtuvo que la acrofase del gen *wnk3* en el tipo neuronal N1 ocurre en el primer ciclo en CT22. La acrofase del gen que codifica para NKCC1 en el tipo neuronal N1 sucede en el segundo ciclo en CT18. Por otro lado, tanto la acrofase del gen que codifica para KCC2 en las neuronas VIP-NMS como la acrofase del gen que codifica para KCC3 en las neuronas GRP-VIP, ocurre en el primer ciclo en CT14. Por último, se obtuvo que la acrofase del gen *gad1* en las neuronas CCK-C1QL3 sucede en el primer ciclo en CT30 (Fig. 18).

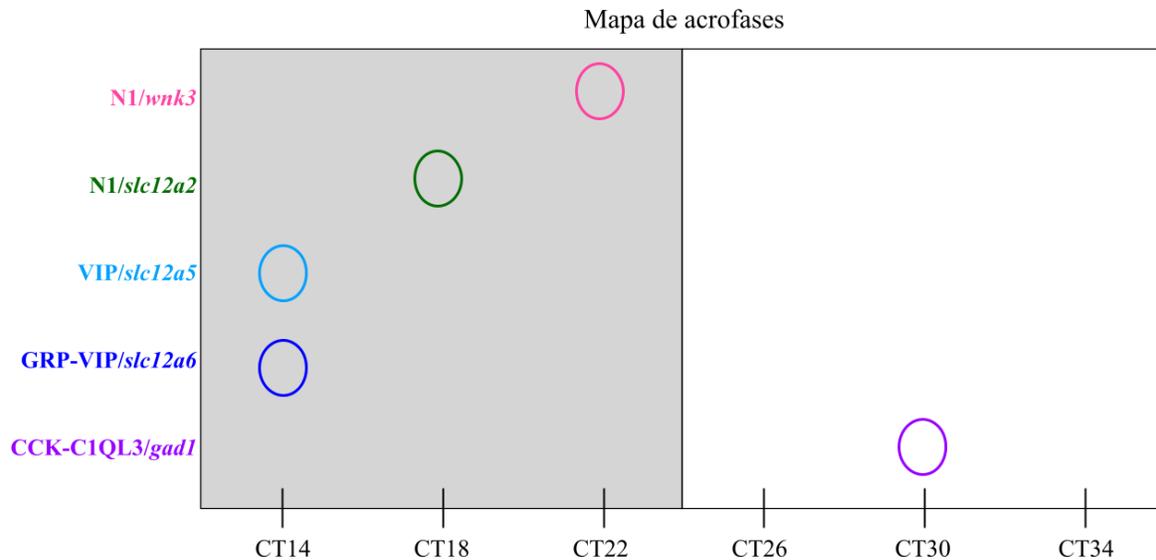


Figura 18: Mapa de acrofases de los genes rítmicos involucrados en la vía WNK-SPAK/OSR1-NKCC1-KCCs en el núcleo supraquiasmático de ratón. El momento de máxima expresión del gen corresponde a la acrofase, los círculos vacíos indican el momento de mayor abundancia del ARNm. El área de color gris representan la noche subjetiva y el área de color blanco corresponden al día subjetivo. Análisis realizado a partir de los datos obtenidos por: Wen S. et al. (2020).

Tomando en cuenta los datos de las acrofases del ARNm se esperaría que la abundancia total de algunas de las proteínas involucradas en la vía WNK-SPAK/OSR1-NKCC1-KCCs también oscile a lo largo del día. Sin embargo, hacen falta más estudios que lo demuestren.

III.3 Generación de los ratones SPAK-KI

Dada la distribución diferencial de los componentes de la vía WNK-SPAK/OSR1-NKCC1-KCCs dentro del NSQ (tabla 1 y fig. 16) y la expresión rítmica de algunos de los genes involucrados en la vía (fig. 17), se decidió abordar la implicación fisiológica de los presentes hallazgos mediante la utilización de un modelo murino con una mutación que inactiva a la cinasa SPAK.

La generación de los ratones SPAK *knock-in* se describe en Rafiqi et al., 2010. Brevemente, se utilizó la cepa C57BL/6J como fondo genético y se cambió el codón ACA que codifica para el residuo de treonina 243 (Thr243) por un codón GCA que codifica para el residuo de alanina. La mutación se generó en la Thr243 dentro del asa T de SPAK, ya que este aminoácido es imprescindible para su actividad (Vitari et al., 2005; Zagórska et al., 2007). Esto impide que SPAK sea fosforilada por las proteínas WNKs que se encuentran río arriba de la vía de fosforilación (Rafiqi et al., 2010). Los ratones fueron donados al laboratorio por el grupo del Dr. Dario Alessi de Escocia.

En el laboratorio se estableció la crua que se muestra en la tabla 2, la cual consistió en reproducir dos progenitores heterocigotos con el fin de obtener ratones SPAK-KI homocigotos (T243A/T243A) como grupo experimental y ratones SPAK-WT (+/+) como grupo control. Los ratones SPAK-KI homocigotos individuales nacieron con la frecuencia mendeliana esperada correspondiente al 25%, n=6.

Tabla 2: Cría de ratones SPAK *knock-in*

Cruza	Genotipo	Frecuencia Mendeliana esperada (%)
SPAK (+/T243A)	SPAK (+/+)	25
SPAK (+/T243A)	SPAK (+/T243A)	50
	SPAK (T243A/T243A)	25

III.4 Los ratones SPAK-KI muestran mayor actividad neuronal en el NSQ durante el día en comparación a los ratones silvestres

Puesto que la fosforilación de NKCC1 y KCC2 mediada por la cinasa SPAK promueve un incremento en los niveles de cloruro intracelular y, en consecuencia, se induce un efecto excitatorio por parte del GABA, entonces se hipotetiza que la inactivación de la cinasa SPAK en los ratones mutantes SPAK-KI provocará el efecto contrario, es decir, GABA tendrá un efecto inhibitorio debido a la baja concentración de cloruro intracelular.

Para probar si existen cambios en la actividad neuronal del NSQ como consecuencia de la eliminación de la actividad de la cinasa SPAK, se realizó una inmunohistoquímica contra c-Fos (Fig. 19), que es un marcador de actividad neuronal ampliamente utilizado (Sagar et al., 1988). Dicha técnica se realizó en las muestras de cerebro obtenidas de los ratones SPAK-KI y silvestres durante dos puntos temporales. Cabe mencionar que las secciones de tejido en las que se encontraba el NSQ se definieron por la presencia del quiasma óptico.

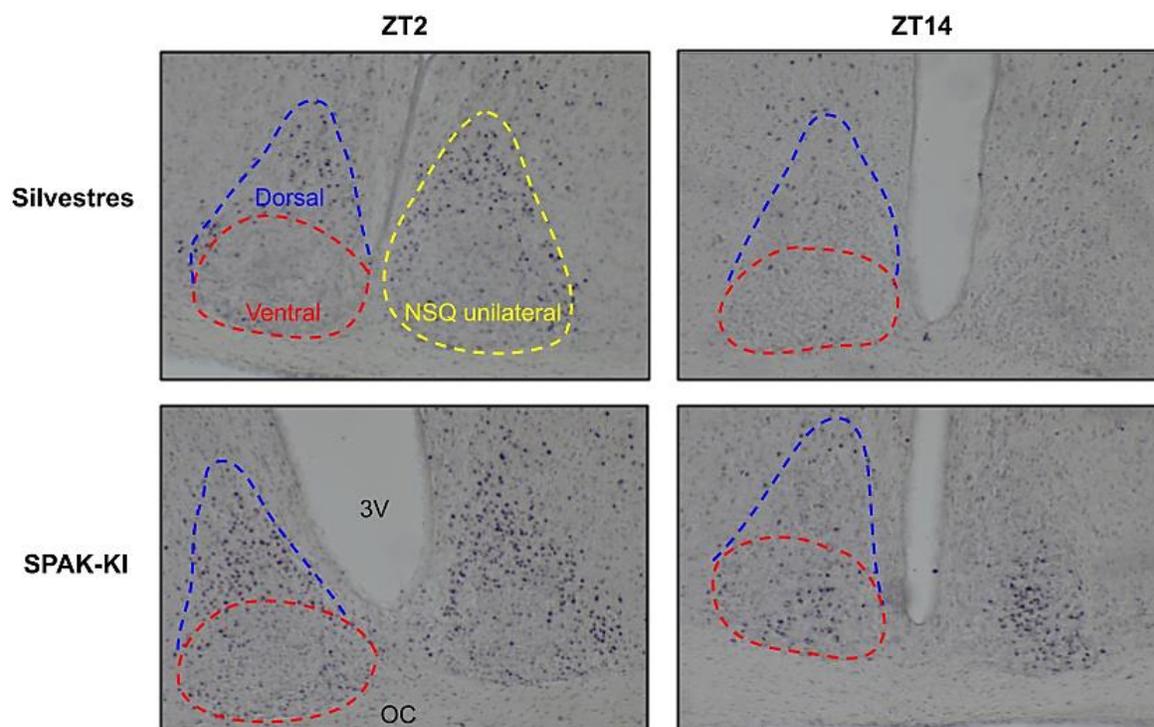


Figura 19: Expresión de c-Fos en el núcleo supraquiasmático de ratones silvestres y mutantes SPAK-KI en dos puntos temporales. Fotomicrografías representativas de la tinción de inmunohistoquímica realizada con anticuerpos específicos contra c-Fos, en cortes transversales de cerebro que incluyen el NSQ de los ratones control o SPAK-KI. Las células inmunopositivas a c-Fos se observan en negro. El NSQ unilateral se delimita en amarillo, la región dorsal en azul y región ventral en rojo. 3V: Tercer ventrículo; OC: Quiasma óptico. Todas las imágenes fueron capturadas con un aumento de 10X.

Se observó que los ratones silvestres mostraron mayor actividad neuronal en todo el NSQ durante el ZT2 en comparación al ZT14 ($t= 5.105$, $p= 0.0070$, fig. 20) lo que

corresponde con lo previamente reportado y con el hecho de que la tasa de disparos del NSQ es mayor durante la fase de luz (Inouye y Kawamura, 1979; Mrugala et al., 2000). Esta diferencia en la actividad neuronal persiste aún en condiciones de oscuridad constante (Meijer et al., 1998), lo cual sugiere que la actividad neuronal dentro del NSQ sigue un ritmo circadiano. La diferencia entre la actividad neuronal en el ZT2 y ZT14 también se observó en los ratones mutantes de la cinasa SPAK ($t= 3.194$, $p= 0.0495$, fig. 20).

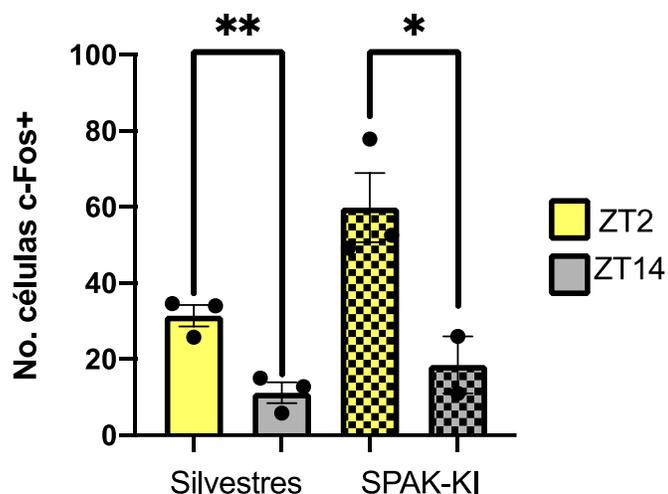


Figura 20: Comparación de la actividad neuronal de todo el NSQ entre el ZT2 y el ZT14 de los ratones silvestres y SPAK-KI. El grupo control tuvo en promedio 31.46 ± 2.8 células inmunopositivas a c-Fos ($n=3$) en el ZT2 y 11.23 ± 2.7 células inmunopositivas a c-Fos ($n=3$) en el ZT14. Los ratones SPAK-KI tuvieron en promedio 59.88 ± 9 células inmunopositivas a c-Fos ($n=3$) en el ZT2 y 18.5 ± 7.5 células inmunopositivas a c-Fos ($n=2$) en el ZT14. Los ratones silvestres y SPAK-KI mostraron mayor actividad neuronal en el NSQ durante el ZT2. Las diferencias estadísticas se determinaron mediante t-Student ($p < 0.05$, * ZT2 en comparación con el ZT14).

Contrario a lo esperado, los ratones SPAK-KI mostraron un incremento significativo en la actividad neuronal durante el ZT2 al compararlo con el grupo control ($t= 2.994$, $p= 0.0402$, fig. 21), sin embargo, no se observaron diferencias entre los grupos durante el ZT14 ($t= 1.098$, $p= 0.3523$, fig. 21). A partir de estos resultados se concluye que los ratones SPAK-KI presentan una mayor actividad neuronal en el NSQ durante el ZT2.

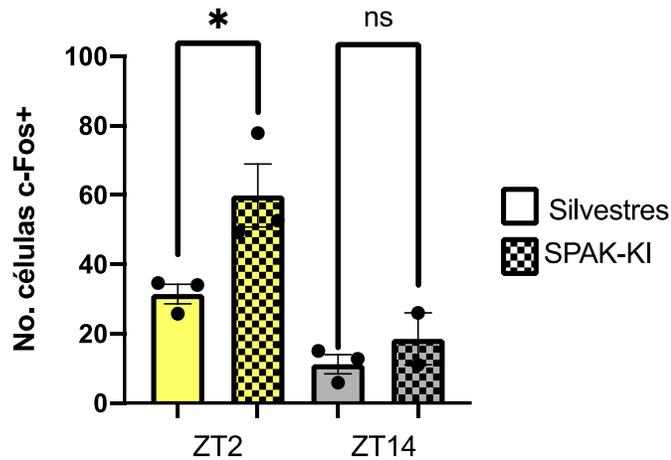


Figura 21: Comparación de la actividad neuronal de todo el NSQ de los ratones silvestres versus los ratones SPAK-KI en el ZT2 y ZT14. Los ratones SPAK-KI presentaron una mayor actividad neuronal en el NSQ durante el ZT2. Las diferencias estadísticas se determinaron mediante t-Student ($p < 0.05$, * en comparación con el control).

III.5 Análisis de la actividad neuronal en la región ventral del NSQ

Debido a que el NSQ muestra una subdivisión anatómica y funcional, se realizó una distinción entre la región ventral y dorsal de este núcleo en las muestras obtenidas. En la figura 19 se muestra la región delimitada de color azul que corresponde a la parte dorsal del NSQ mientras que la región delimitada en rojo es la parte ventral del mismo, estas regiones fueron nombradas como shell y core respectivamente por Abrahamson y Moore, 2001.

Para determinar si la inactivación de la cinasa SPAK en los ratones SPAK-KI modifica la expresión de *c-fos* en la región ventral del NSQ, se cuantificó el número de células inmunopositivas a c-Fos en dicha región. En el análisis no se encontraron diferencias significativas en la actividad neuronal de la región ventral del NSQ (vNSQ) entre el ZT2 y el ZT14 tanto en los ratones silvestres como en los ratones SPAK-KI ($t = 2.293$, $p = 0.0836$, fig. 22). En el caso de los ratones silvestres, los resultados no fueron consistentes con la literatura ya que diversos reportes indican que existe una mayor expresión de *c-fos* en la región ventral del NSQ durante la fase de luz (Colwell y Foster, 1992).

Se hipotetiza que este efecto está enmascarado por la dispersión de los datos aquí presentados (fig. 22), específicamente en el vNSQ durante la noche debido a las condiciones en que se realizaron los sacrificios de los ratones. Los ratones estaban en condiciones de oscuridad, sin embargo, para el sacrificio fueron trasladados a un cuarto con luz donde fueron anestesiados y permanecieron entre 10 a 20 minutos antes del sacrificio y la perfusión.

Se sabe que la expresión de *c-fos* es fotoinducible (Colwell y Foster, 1992; Jác et al., 2000; Trávníčková et al., 1996; Jelínková et al., 2000). Durante la noche, cuando la tasa de disparos de las neuronas del NSQ es baja, la estimulación fótica de las células ganglionares de la retina da como resultado un gran cambio en la actividad eléctrica del NSQ (Colwell y Foster, 1992; Meijer et al., 1998). En dicho caso se induce una mayor despolarización y por lo tanto, un incremento en la expresión de *c-fos*. Aunado a esto, la región vNSQ es la que recibe las aferencias provenientes de la retina a través del TRH (Belenky et al., 2008). Por lo tanto, se plantea que la dispersión de los datos del vNSQ en el ZT14 se debe al efecto de la luz.

Por otra parte, se observó que los ratones con la mutación en la cinasa SPAK no mostraron diferencias significativas en la actividad neuronal del vNSQ entre el ZT2 y el ZT14 ($t= 1.419$, $p= 0.2510$, fig. 22). Esto se atribuye a la dispersión de los datos del vNSQ en el ZT14, tal y como se explicó anteriormente.

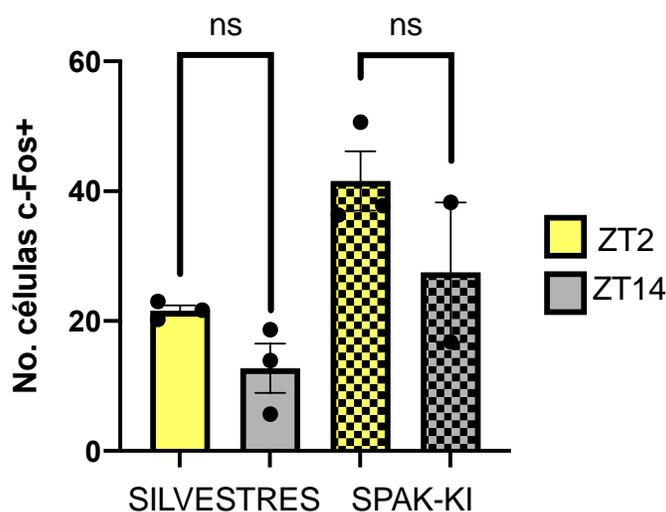


Figura 22: Comparación de la actividad neuronal del vNSQ entre el ZT2 y el ZT14 de los ratones silvestres y SPAK-KI. Los ratones silvestres presentaron 21.64 ± 0.7 células inmunopositivas a c-Fos en el ZT2 (n=3) y 12.74 ± 3.7 células inmunopositivas a c-Fos en el ZT14 (n=3). Los SPAK-KI presentaron 41.49 ± 4.5 células inmunopositivas a c-Fos (n=3) en el ZT2 y 27.5 ± 10.7 células inmunopositivas a c-Fos (n=2) en el ZT14. No hubo cambios en la actividad neuronal del vNSQ entre el ZT2 y el ZT14 de ambos grupos de ratones. Las diferencias estadísticas se determinaron mediante t-Student ($p < 0.05$).

Al comparar la actividad neuronal de la región ventral del grupo control versus el mutante se observó que los ratones SPAK-KI presentaron una mayor actividad neuronal en el vNSQ en el ZT2 a diferencia de los ratones silvestres ($t= 4.329$, $p= 0.0124$, fig. 23). Sin embargo, no hubo cambios significativos en el número de células inmunopositivas a c-Fos del vNSQ en el ZT14 entre el grupo control y los ratones SPAK-KI ($t=1.571$, $p= 0.2142$, fig. 23).

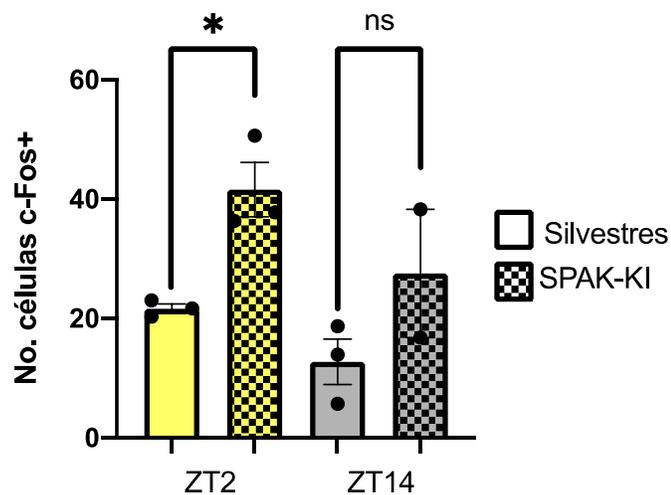


Figura 23: Comparación de la actividad neuronal del vNSQ de los ratones silvestres versus los ratones SPAK-KI en el ZT2 y ZT14. Los ratones SPAK-KI presentaron una mayor actividad neuronal en el vNSQ en el ZT2. Las diferencias estadísticas se determinaron mediante t-Student ($p < 0.05$, * en comparación con el control).

III. 6 Análisis de la actividad neuronal en la región dorsal del NSQ

Dado que los ratones SPAK-KI muestran una mayor actividad neuronal en el vNSQ durante el ZT2 surgió la siguiente pregunta: ¿La inactivación de la cinasa SPAK en los ratones SPAK-KI modifica la expresión de *c-fos* en la región dorsal? Para ello se cuantificó el número de células inmunopositivas a c-Fos en dicha región en dos puntos temporales.

Al analizar el número de células inmunopositivas a c-Fos de la región dorsal del NSQ (dNSQ) de los ratones silvestres en dos puntos opuestos a lo largo del día, se observó un incremento en la actividad neuronal en dicha región durante el ZT2 en comparación al ZT14 ($t=4.895$, $p=0.0081$, fig. 24). En el dNSQ de los ratones silvestres se acentuaron los cambios en la actividad neuronal entre los dos puntos del tiempo evaluados (fig. 24). Por otra parte, los ratones SPAK-KI presentaron una mayor actividad neuronal en el dNSQ durante el ZT2 en comparación al ZT14 ($t=5.703$, $p=0.0107$, fig. 24).

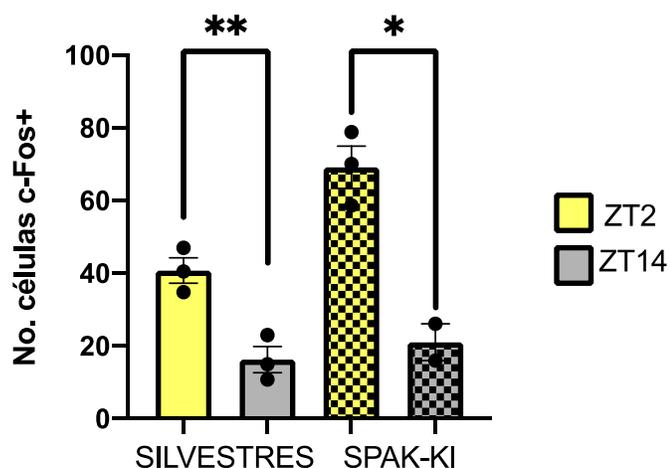


Figura 24: Comparación de la actividad neuronal del dNSQ entre el ZT2 y el ZT14 de los ratones silvestres y de los ratones SPAK-KI. El grupo control presentó en promedio 40.79 ± 3.5 células inmunopositivas a c-Fos ($n=3$) en el dNSQ en el ZT2 y 16.26 ± 3.5 células inmunopositivas a c-Fos ($n=3$) en el ZT14. Los ratones SPAK-KI tuvieron en promedio 69.21 ± 5.8 células inmunopositivas a c-Fos ($n=3$) en el dNSQ durante el ZT2 y 21.06 ± 5 células inmunopositivas a c-Fos ($n=2$) durante el ZT14. En los ratones silvestres se acentuaron los cambios en la actividad neuronal entre los dos puntos del tiempo evaluados. Las

diferencias estadísticas se determinaron mediante t-Student ($p < 0.05$, * ZT2 en comparación con ZT14).

Al comparar la actividad neuronal del dNSQ de los ratones silvestres y mutantes, se obtuvo que los ratones SPAK-KI mostraron un incremento significativo en la actividad neuronal del dNSQ en el ZT2 en comparación al grupo control ($t= 4.168$, $p= 0.0141$, fig. 25). No se encontraron diferencias en la actividad neuronal del dNSQ en el ZT14 entre estos grupos ($t= 0.8045$, $p= 0.4800$, fig. 25).

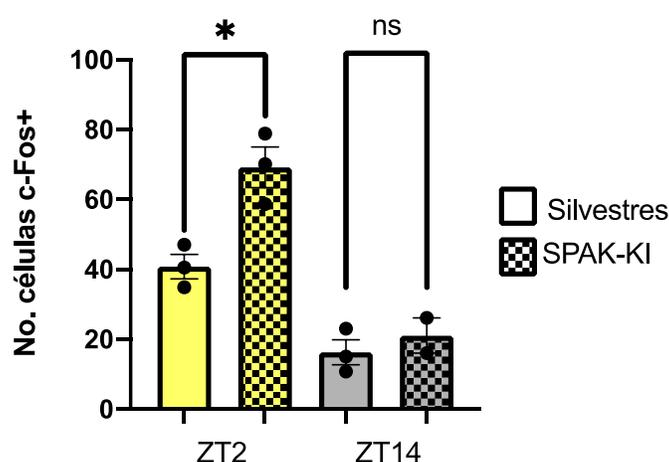


Figura 25: Comparación de la actividad neuronal del dNSQ de los ratones silvestres versus los ratones SPAK-KI en el ZT2 y ZT14. Los ratones SPAK-KI mostraron una mayor actividad neuronal en el vNSQ en el ZT2 en comparación al grupo control. Las diferencias estadísticas se determinaron mediante t-Student ($p < 0.05$, * en comparación con el control).

III.7 Discusión

En el presente estudio se analizó la actividad neuronal del NSQ en un modelo murino con inactivación de la cinasa SPAK. Se sabe que SPAK regula la actividad de los cotransportadores NKCC1 y KCC2 los cuales al estar fosforilados promueven un incremento en los niveles de cloruro intracelular y, en consecuencia, se induce un efecto excitatorio por parte del GABA. A nivel de todo el NSQ, se obtuvo que los ratones SPAK-KI mostraron un incremento significativo en la actividad neuronal durante el ZT2 al compararlo con el grupo

control ($t= 2.994$, $p= 0.0402$, fig. 21), lo cual fue contrario a lo esperado. De acuerdo con otros autores se esperaba que al inhibir la vía WNK-SPAK/OSR1 se promueva la inhibición GABAérgica (Alessi et al., 2014), ya que la desfosforilación de los KCCs conlleva a la extrusión de cloruro y como resultado disminuyen los niveles de dicho ion, esto se vería reflejado en un decremento de la actividad neuronal.

Sin embargo, de acuerdo con los resultados aquí presentados se observó lo contrario en los ratones SPAK-KI, específicamente en el periodo de luz. Para explicar este fenómeno primero se planteó la idea de que los ratones con la cinasa SPAK inactiva presentan una sobreactivación del homólogo funcional de SPAK que es OSR1. No obstante, al analizar los niveles de expresión del gen *osr1* (fig. 16F) es poco factible que esto suceda, ya que la abundancia de los transcritos en el NSQ es muy baja, aunque no se excluye la posibilidad de que la proteína sea más abundante que el transcrito. Además, en las células cuando un componente es eliminado otro puede ocupar su papel para compensar la falta de actividad, pero difícilmente sobrecompensa como en este caso.

Durante el día, cuando el TRH es estimulado por la luz libera glutamato y el péptido activador del adenilato ciclasa hipofisaria (PACAP) hacia la región ventral del NSQ (Hannibal et al., 2000). La liberación de glutamato y la unión a sus receptores ionotrópicos llamados AMPA y NMDA, da como resultado el flujo de Ca^{2+} al interior de la célula provocando así un incremento en la activación de las neuronas del vNSQ (Colwell, 2001; Michel et al., 2002). Por esta razón se esperaba encontrar una mayor actividad neuronal en el vNSQ de los ratones silvestres y SPAK-KI durante el ZT2, lo cual no se observó debido probablemente a la dispersión de los datos o al tamaño de la muestra (fig. 22).

Retomando la idea de que las neuronas de la parte ventral del NSQ funcionan como centros integradores de las señales externas, principalmente la luz, se encargan de comunicar la información a las neuronas de la región dorsal (Varadarajan et al., 2018). De acuerdo con la literatura, el NSQ está compuesto en su mayoría de neuronas GABAérgicas (Belenky et al., 2008), ante esto, cuando las neuronas ventrales son excitadas liberan GABA hacia el dNSQ. Se sabe que polaridad de las neuronas GABAérgicas depende del E_{GABA} que a su vez

está regulado por la $[Cl^-]_i$ (Salihu et al., 2021), ya que la unión de GABA a su receptor ($GABA_{A}R$) conduce al flujo de cloruro a favor de su gradiente de concentración. Varios estudios señalan que las neuronas del dNSQ en el día presentan un alta $[Cl^-]_i$, pero en la noche disminuye dicha concentración (Alamilla et al., 2014; Klett y Allen, 2017), e incluso un estudio reciente demostró que el nivel de cloruro en las neuronas AVP describe un ritmo circadiano robusto (Klett et al., 2022). En este sentido, al haber mucho cloruro dentro de la célula la unión de GABA a su receptor conducirá a un efecto despolarizante, caso contrario cuando la $[Cl^-]_i$ es baja. Por esta razón, el aumento en la actividad neuronal del dNSQ de los ratones silvestres durante el ZT2 (fig. 24) coincide con los datos publicados por Alamilla, donde el E_{GABA} tiende a valores menos negativos (aproximadamente $-38mV$) en la región dorsal durante el día en comparación a la noche (aproximadamente $-60mV$) (Alamilla et al., 2014), lo cual se vería reflejado en un aumento del número de células despolarizadas durante el día en esta región.

En resumen, se propone el mecanismo de acción que se muestra en la figura 26. Dado los altos niveles de cloruro en las neuronas AVP y VIP del NSQ durante el día (Klett y Allen, 2017; Klett et al., 2022), se hipotetiza que la vía WNK-SPAK/OSR1-NKCC1-KCC debe estar activa/fosforilada durante el periodo de luz, lo cual promueve el flujo de cloruro al interior de la célula por medio de la activación del cotransportador NKCC1 y la inactivación de los KCCs. En consecuencia, probablemente el GABA ejerce un efecto excitatorio en el dNSQ durante el ZT2 e inhibitorio durante el ZT14 en los ratones silvestres (Alamilla et al., 2014).

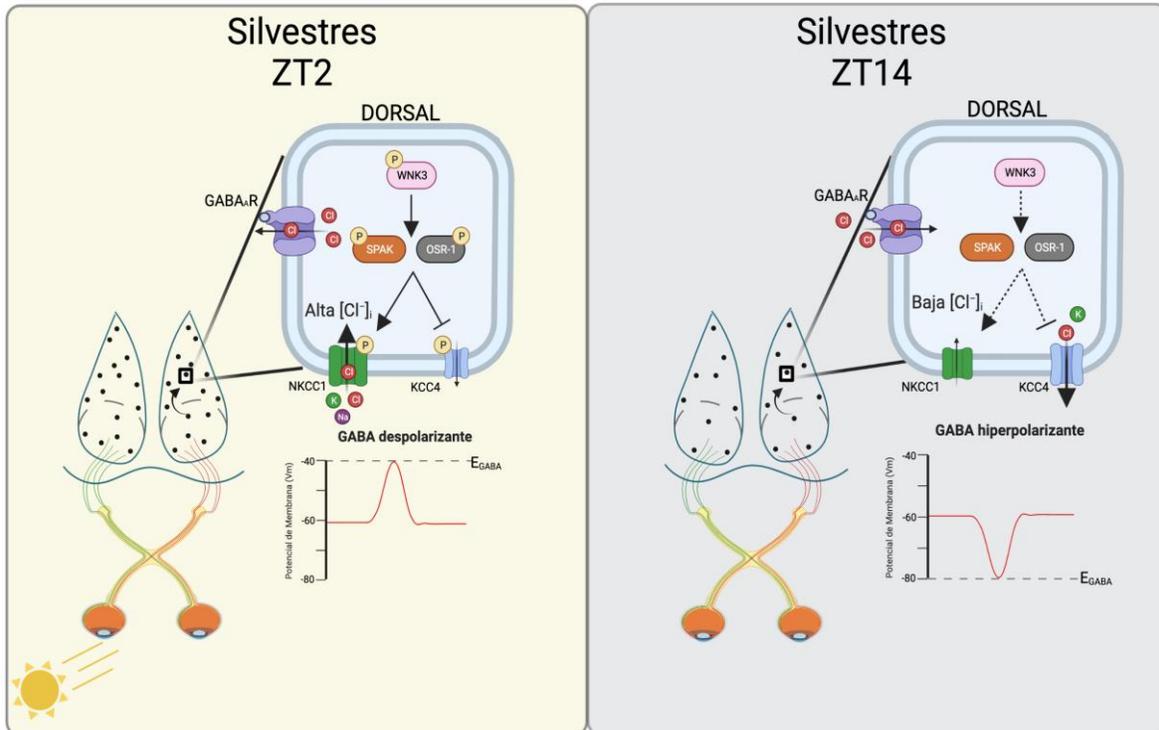


Figura 26: Diagrama del mecanismo de acción de la vía WNK-SPAK/OSR1-NKCC1-KCC en el núcleo supraquiasmático de ratones silvestres. Los puntos negros representan las células inmunopositivas a c-Fos. Se hipotetiza que la vía WNK-SPAK/OSR1-NKCC1-KCC debe estar activa/fosforilada durante el periodo de luz, lo cual promueve el flujo de cloruro al interior de la célula y, por ende, GABA ejerce un efecto excitatorio en la región dorsal durante el periodo de luz. Sucede lo contrario en el periodo de oscuridad donde probablemente la vía está inactiva.

Sin embargo, aún no queda claro cuál es el papel del GABA en la región ventral del NSQ ya que existen datos contradictorios en relación con el E_{GABA} y la $[Cl^-]_i$ en dicha región. Por ejemplo, diversos autores reportan que el GABA ejerce un efecto excitatorio en la región ventral durante la noche (Albus et al., 2005; Alamilla et al., 2014), sin embargo, McNeill contradice lo anterior al mencionar que GABA es hiperpolarizante (McNeill et al., 2020). En cuanto a la $[Cl^-]_i$ en el vNSQ se ha encontrado que los niveles de cloruro aumentan durante la noche y disminuyen en el día (Alamilla et al., 2014), y viceversa (Klett et al., 2022; Klett y Allen, 2017). Por lo tanto, hace falta esclarecer en qué parte del NSQ se genera la excitación evocada por el GABA y la fase del ciclo circadiano en la que sucede.

Al comparar la actividad neuronal por regiones del NSQ de los ratones silvestres versus los SPAK-KI, se obtuvo que los ratones mutantes SPAK-KI tienen un incremento en la actividad neuronal tanto en la región ventral como en la región dorsal del NSQ durante el ZT2, esto en comparación al grupo control (fig. 22 y 24). Dado que el aumento de la actividad neuronal en ambas regiones del NSQ se observó específicamente durante el periodo de luz (ZT2), se sugiere que los ratones SPAK-KI probablemente son más sensibles a la luz y que la proteína SPAK contribuye a regular la actividad neuronal en el núcleo supraquiasmático durante el ciclo de luz-oscuridad de los ratones.

Recientemente se reportó un subconjunto de células ganglionares de la retina intrínsecamente sensibles a la luz (ipRGC) que son capaces de mandar señales GABAérgicas a la región ventral del NSQ (Sonoda et al., 2020). Cuando las ipRGC reciben un estímulo de luz liberan GABA hacia las neuronas VIP, al medir las corrientes postsinápticas en estas neuronas encontraron que la mayoría son potenciales postsinápticos excitatorios (EPSPs), es decir, cuando el GABA se une a su receptor induce respuestas excitatorias en las neuronas VIP lo cual es consistente con un alta $[Cl^-]_i$ en estas neuronas durante el día (Klett et al., 2022; Klett y Allen, 2017). Sin embargo, al eliminar la señalización GABAérgica de las ipRGC por medio de células *gad2*-KO encontraron que los ratones se volvían más sensibles a luz tenue (Sonoda et al., 2020). Esto sugiere que la señalización GABAérgica amortigua la sensibilidad a la luz evitando que el NSQ realice cambios innecesarios ante las perturbaciones relativamente menores de la luz ambiental. Por esta razón, se plantea que los ratones SPAK-KI tienen alterada la vía que regula la concentración de cloruro en las neuronas y, por ende, la respuesta GABAérgica, por ello aumenta la sensibilidad a la luz en estos ratones.

Otra manera de explicar el aumento de la actividad neuronal del NSQ de los ratones SPAK-KI es por medio de otros mecanismos que podrían regular la actividad de los cotransportadores NKCC1 y KCC2, de forma independiente a SPAK. Por ejemplo, la cinasa WNK3 cumple un papel dual ya que permite la modulación de la $[Cl^-]_i$ y la plasticidad en respuesta a GABA (Kahle et al., 2005). El ARNm que codifica para WNK3 es más abundante en el cerebro en comparación a otros tejidos (Holden et al., 2004; Veríssimo y Jordan, 2001),

además, la proteína se expresa fuertemente en los núcleos supraóptico y supraquiasmático (Kahle et al., 2005). Se ha visto que la co-expresión de WNK3 y NKCC1 en ovocitos de rana desencadena una potente activación del cotransportador, lo que se ve reflejado en un aumento de su fosforilación (Kahle et al., 2005). Sin embargo, al mutar el dominio cinasa de WNK3 se observó que disminuye drásticamente la fosforilación de NKCC1, inclusive por debajo de la fosforilación cuando no está WNK3 (Kahle et al., 2005).

Por lo tanto, se sugiere que WNK3 no está fosforilando directamente al cotransportador NKCC1, sino que regula las fosfatasa de cinasas río abajo que finalmente actúan sobre los cotransportadores. Entre esas cinasas se encuentra PASK que puede fosforilar directamente los sitios reguladores de NKCC1 (Dowd y Forbush, 2003; Piechotta et al., 2003). A partir de estos datos se plantea que en los ratones SPAK-KI debido a la falta de actividad de SPAK están involucradas otras vías no canónicas que contribuyen a modular la actividad de los cotransportadores, dicha regulación probablemente es a través de la fosforilación.

Está reportado que la proteína cinasa C (PKC) es capaz de fosforilar directamente al cotransportador KCC2 en un sitio de fosforilación diferente al de la vía canónica. PKC fosforila a KCC2 en la serina de la posición 940 (Ser940) lo que conlleva a un aumento de la expresión de KCC2 en la superficie celular y promueve su estabilidad en la membrana de las neuronas del hipocampo (Lee et al., 2007). La Ser940 es desfosforilada por la proteína fosfatasa 1 (PP1) (Lee et al., 2011). Por el contrario, la fosforilación de los residuos de tirosina en la posición 903 y 1087 (Tyr903 y Tyr1087) mediada por la cinasa Src disminuye la estabilidad de la superficie celular de KCC2 al mejorar su degradación lisosomal (Lee et al., 2010). Sin embargo, aún se desconoce si la fosforilación dependiente de WNK en Thr906 y Thr1007 afecta el tráfico de membrana de KCC2 (Kahle et al., 2005).

En un estudio más reciente se observó que WNK3 desempeña un papel en la regulación del cambio de E_{GABA} , probablemente a través de aumentar la fosforilación de KCC2, pero no de NKCC1 (Lim et al., 2021). En conjunto, estos hallazgos indican que los sitios de fosforilación de los cotransportadores NKCC1 y KCC2 son muy importantes para determinar su actividad y su estabilidad en la membrana. La fosforilación de KCC2 por medio de la vía

WNK-SPAK/OSR1 causa una pérdida de función. Sin embargo, la fosforilación de los siguientes residuos: Ser932, Thr934, Ser937 y Ser940, activan a KCC2 (Hartmann y Nothwang, 2022).

III. 8 Perspectivas

Tomando en cuenta los resultados del presente trabajo se sugiere en primer lugar aumentar el tamaño de la muestra para obtener estimaciones más precisas y poder detectar las diferencias en la actividad neuronal entre los grupos silvestres y SPAK-KI, suponiendo que existen realmente. En segundo lugar, para estudiar la actividad neuronal durante la noche se sugiere utilizar una lámpara de luz roja en los sacrificios para preservar la visión nocturna de los ratones y no alterar la actividad neuronal del NSQ. Otras formas de medir la actividad neuronal en el NSQ, es por medio de imagenología de Ca^{2+} o por registros electrofisiológicos para medir las corrientes de Ca^{2+} .

Aún no queda claro el mecanismo por el cual los ratones SPAK-KI se vuelven más sensibles a la luz y aumentan su actividad neuronal en la región ventral y dorsal del NSQ en el ZT2. Por esta razón se sugiere explorar la expresión de las proteínas involucradas en la vía WNK-SPAK/OSR1-NKCC1-KCCs en las neuronas dorsales vasopresinérgicas y ventrales VIP durante el ciclo de luz-oscuridad. Es muy importante ver la expresión de c-Fos en estos tipos neuronales para conocer si la expresión diferencial de la vía durante el día y la noche contribuye a regular la actividad neuronal en el NSQ.

Se hipotetiza que el switch del nivel de cloruro determina la actividad de la vía y con ello la actividad neuronal en el núcleo supraquiasmático durante el ciclo de luz-oscuridad. Dado que los niveles de cloruro intracelular oscilan de manera circadiana (Klett et al., 2022), es decir, se mantienen en condiciones de oscuridad constante, entonces se esperaría que la fosforilación de la vía también sea circadiana e independiente del fotoperiodo.

La luz es el principal estímulo que modifica la actividad neuronal en el NSQ, por lo tanto, se plantea que un pulso de luz conlleva a la modificación de la expresión y/o actividad de los cotransportadores. Según McNeill, la expresión de NKCC1 es fotoinducible (McNeill

et al., 2020), mientras que la expresión de KCC2 disminuye con la luz (Rohr, 2019). Por lo tanto, al aplicar un pulso de luz en el periodo de oscuridad de los ratones se esperarían cambios en la despolarización de las neuronas, asociados o como consecuencia del cambio en la concentración intracelular de cloruro dada por cambios en la fotoinducción de los cotransportadores NKCC1 y KCCs. Para realizar este experimento, se sacrificarán ratones silvestres en el día (ZT2) y en la noche (ZT14), a éstos últimos se les dará un pulso de luz y se evaluará la expresión y fosforilación de los cotransportadores mediante la técnica de inmunofluorescencia identificando el tipo neuronal y combinado con la detección de c-Fos.

Conclusiones

En este estudio se comparó la actividad neuronal del NSQ en dos puntos del ciclo de luz-oscuridad, siendo estos el ZT2 y el ZT14. Se obtuvo un aumento de la actividad neuronal en ambas regiones del NSQ durante el ZT2 en los ratones SPAK-KI. Se plantea que en estos ratones están involucradas otras vías no canónicas que contribuyen a modular la actividad de los cotransportadores, dicha regulación probablemente es a través de la fosforilación. Por lo tanto, se sugiere que la cinasa SPAK influye en la actividad neuronal de dicho núcleo, probablemente a través de la actividad de los cotransportadores KCC2 y NKCC1 y con ello la señalización GABAérgica.

Como se mencionó anteriormente, los ratones SPAK-KI probablemente tienen alterada la vía que regula la concentración de cloruro en las neuronas y, por ende, la respuesta GABAérgica, esto explica la sensibilidad a la luz en estos ratones. Está reportado que la $[Cl^-]_i$ fluctúa en las neuronas AVP y VIP de acuerdo con el ciclo de luz-oscuridad (Alamilla et al., 2014; Klett y Allen, 2017), estas fluctuaciones activan la vía a través de la fosforilación de las proteínas sensores de cloruro llamadas WNKs, presumiblemente WNK3 según varios autores (Belenky et al., 2010; Kahle et al., 2005; Lim et al., 2021). Por lo tanto, se esperaba que la fosforilación de la vía cambie dependiendo si es de día o de noche.

Con base en los análisis *in silico* aquí presentados y los datos de la literatura (tabla 1) se propone en la figura 27 el modelo de la ritmicidad de la vía WNK-SPAK/OSR1-NKCC1-

KCC en la región dorsal y ventral del NSQ. También se consideró el ritmo circadiano de los niveles de cloruro en las neuronas AVP y VIP (Klett et al., 2022), a partir de lo cual se determinó el posible efecto del GABA en cada una de las regiones del NSQ en el ciclo de luz-oscuridad.

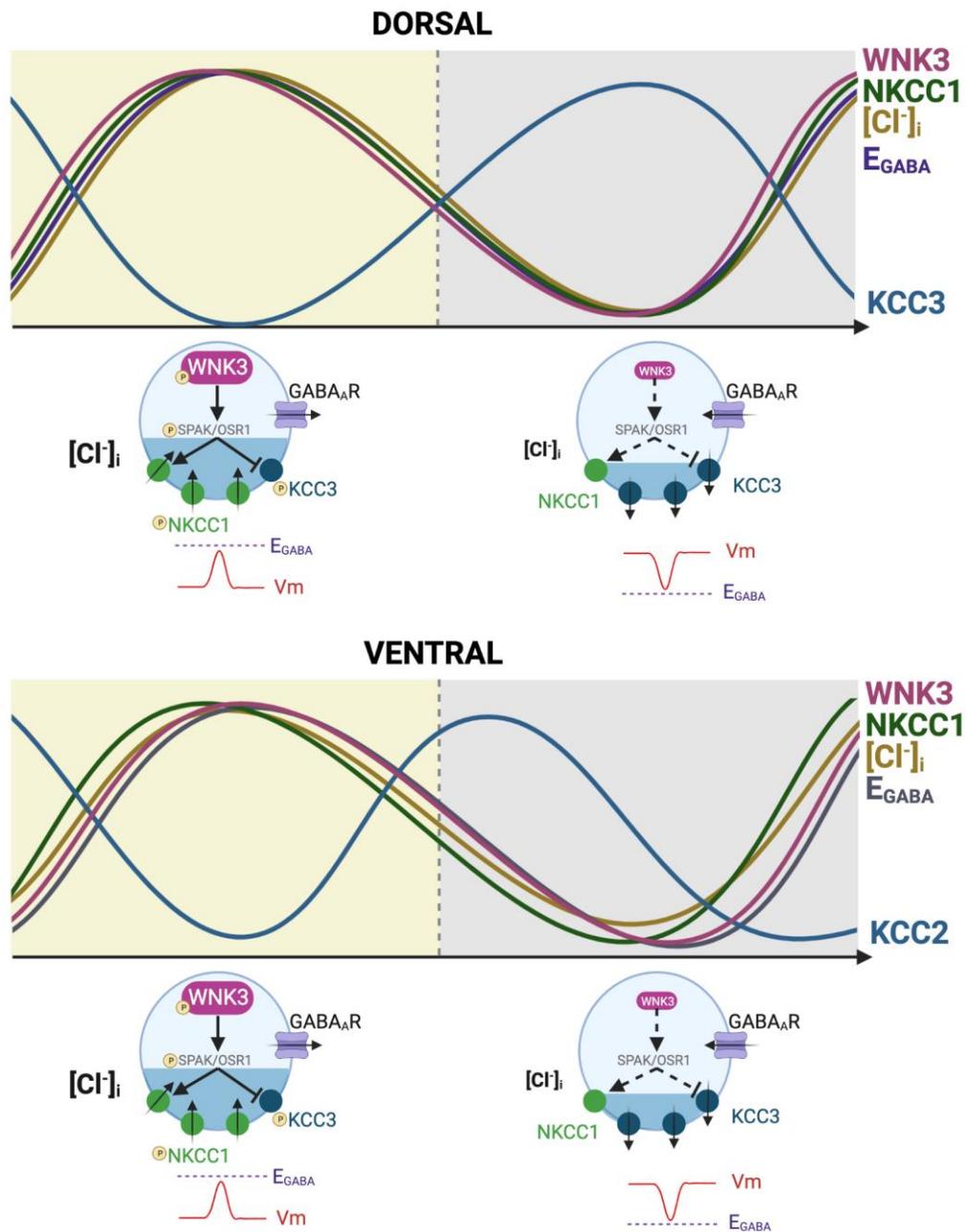


Figura 27: Ritmicidad de la expresión de la vía WNK-SPAK/OSR1-NKCC1-KCC en la región dorsal y ventral del NSQ de acuerdo con el ciclo de luz-oscuridad.

Referencias bibliográficas

1. Abrahamson, E. E., y Moore, R. Y. (2001). Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Research*, 916, 172-191. www.elsevier.com/locate/bres
2. Alamilla, J., Perez-Burgos, A., Quinto, D., y Aguilar-Roblero, R. (2014). Circadian modulation of the Cl⁻ equilibrium potential in the rat suprachiasmatic nuclei. *BioMed Research International*, 2014, 1-15. <https://doi.org/10.1155/2014/424982>
3. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P. (2016). Transporte de pequeñas moléculas a través de la membrana y las propiedades eléctricas de las membranas. *Biología molecular de la célula* (613-638), 6e. Barcelona: Ediciones Omega.
4. Albus, H., Vansteensel, M. J., Michel, S., Block, G. D., y Meijer, J. H. (2005). A GABAergic mechanism is necessary for coupling dissociable ventral and dorsal regional oscillators within the circadian clock. *Current Biology*, 15(10), 886–893. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.03.051>
5. Alessi, D. R., Zhang, J., Khanna, A., Hochdörfer, T., Shang, Y., y Kahle, K. T. (2014). The WNK-SPAK/OSR1 pathway: Master regulator of cation-chloride cotransporters. *Science signaling*, 7(334), 1-10. www.SCIENCESIGNALING.org <http://stke.sciencemag.org>
6. Arroyo, J. P., Kahle, K. T., y Gamba, G. (2013). The SLC12 family of electro-neutral cation-coupled chloride cotransporters. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(2–3), 288–298. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.05.002>
7. Belenky, M. A., Sollars, P. J., Mount, D. B., Alper, S. L., Yarom, Y., y Pickard, G. E. (2010). Cell-type specific distribution of chloride transporters in the rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience*, 165(4), 1519–1537. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.11.040>
8. Belenky, M. A., Yarom, Y., y Pickard, G. E. (2008). Heterogeneous expression of γ -aminobutyric acid and γ -aminobutyric acid-associated receptors and

- transporters in the rat suprachiasmatic nucleus. *Journal of Comparative Neurology*, 506(4), 708–732. <https://doi.org/10.1002/cne.21553>
9. Ben-Ari, Y., Khalilov, I., Kahle, K. T., y Cherubini, E. (2012). The GABA excitatory/inhibitory shift in brain maturation and neurological disorders. *Neuroscientist*, 18(5), 467–486. <https://doi.org/10.1177/1073858412438697>
 10. Brüning, F., Noya, S. B., Bange, T., Koutsouli, S., Rudolph, J. D., Tyagarajan, S. K., Cox, J., Mann, M., Brown, S. A., y Robles, M. S. (2019). Sleep-wake cycles drive daily dynamics of synaptic phosphorylation. *Science*, 366(6462), 1–9. <https://doi.org/10.1126/science.aav3617>
 11. Buijs, R. M., Hou, Y.-X., Shinn, S., y Renaud, L. P. (1994). Ultrastructural evidence for intra-and extranuclear projections of GABAergic neurons of the suprachiasmatic nucleus. *The Journal of Comparative Neurology*, 340, 381–391.
 12. Card, J. P., y Moore, R. Y. (1984). The suprachiasmatic nucleus of the golden hamster: immunohistochemical analysis of cell and fiber distribution. *Neuroscience*, 13(2), 415–431.
 13. Cedillo-Zavaleta, L. N., Ruíz-García, I., Jiménez-Mejía, J. C., y Miranda-Herrera, F. (2019). Relevancia clínica de los receptores GABAB en el tratamiento de la adicción a las drogas. *Revista Mexicana de Neurociencia*, 19(6), 32–42.
 14. Cervantes-Perez, L. G., Castaneda-Bueno, M., Jimenez, J. v., Vazquez, N., Rojas-Vega, L., Alessi, D. R., Bobadilla, N. A., y Gamba, G. (2018). Disruption of the with no lysine kinase-STE20-proline alanine-rich kinase pathway reduces the hypertension induced by angiotensin II. *Journal of Hypertension*, 36(2), 361–367. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000001554>
 15. Colwell, C. S. (2001). NMDA-evoked calcium transients and currents in the suprachiasmatic nucleus: gating by the circadian system. *European Journal of Neuroscience*, 13(7), 1420–1428. <https://doi.org/10.1046/j.0953-816X.2001.01517.x>
 16. Colwell, C. S. (2011). Linking neural activity and molecular oscillations in the SCN. *Nature Reviews Neuroscience*, 12(10), 553–569. <https://doi.org/10.1038/nrn3086>

17. Colwell, C. S., y Foster, R. G. (1992). Photic regulation of Fos-like immunoreactivity in the suprachiasmatic nucleus of the mouse. *Journal of Comparative Neurology*, 324(2), 135-142.
18. Davidson, A. J., Sellix, M. T., Daniel, J., Yamazaki, S., Menaker, M., y Block, G. D. (2006). Chronic jet-lag increases mortality in aged mice. *Current Biology*, 16(21), 914–916. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.09.058>
19. De Jeu, M., y Pennartz, C. (2002). Circadian modulation of GABA function in the rat suprachiasmatic nucleus: excitatory effects during the night phase. *Journal of Neurophysiology*, 87(2), 834–844. <https://doi.org/10.1152/jn.00241.2001>
20. Decavel, C., y Van den Pol, A. N. (1990). GABA: a dominant neurotransmitter in the hypothalamus. *Neurology*, 302, 1019-1037. doi: 10.1002/cne.903020423
21. Dell, R. B., Holleran, S., y Ramakrishnan, R. (2002). Sample size determination. *ILAR journal*, 43(4), 207-213.
22. Delpire, E., y Gagnon, K. B. E. (2008). SPAK and OSR1: STE20 kinases involved in the regulation of ion homeostasis and volume control in mammalian cells. In *Biochemical Journal*, 409(2), 321–331. <https://doi.org/10.1042/BJ20071324>
23. Doi, M., Ishida, A., Miyake, A., Sato, M., Komatsu, R., Yamazaki, F., Kimura, I., Tsuchiya, S., Kori, H., Seo, K., Yamaguchi, Y., Matsuo, M., Fustin, J. M., Tanaka, R., Santo, Y., Yamada, H., Takahashi, Y., Araki, M., Nakao, K., y Okamura, H. (2011). Circadian regulation of intracellular G-protein signalling mediates intercellular synchrony and rhythmicity in the suprachiasmatic nucleus. *Nature Communications*, 2(1). 1-9. <https://doi.org/10.1038/ncomms1316>
24. Dowd, B. F. X., y Forbush, B. (2003). Pask (proline-alanine-rich STE20-related kinase), a regulatory kinase of the Na-K-Cl cotransporter (NKCC1). *Journal of Biological Chemistry*, 278(30), 27347–27353. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301899200>
25. Dunlap, J. C. (1999). Molecular bases for circadian clocks. *Cell*, 96, 271-290. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80566-8
26. Evans, J. A., Leise, T. L., Castanon-Cervantes, O., y Davidson, A. J. (2013). Dynamic interactions mediated by nonredundant signaling mechanisms couple

- circadian clock neurons. *Neuron*, 80(4), 973–983. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.08.022>
27. Farajnia, S., van Westering, T. L. E., Meijer, J. H., y Michel, S. (2014). Seasonal induction of GABAergic excitation in the central mammalian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(26), 9627–9632. <https://doi.org/10.1073/pnas.1319820111>
28. Garzón-Muvdi, T., Pacheco-Alvarez, D., Gagnon, K. B. E., Vázquez, N., Ponce-Coria, J., Moreno, E., Delpire, E., y Gamba, G. (2007). WNK4 kinase is a negative regulator of K⁺-Cl⁻ cotransporters. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 292(4), 1197–1207. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00335.2006>
29. Harding, C., Bechtold, D. A., y Brown, T. M. (2020). Suprachiasmatic nucleus-dependent and independent outputs driving rhythmic activity in hypothalamic and thalamic neurons. *BMC Biology*, 18(1), 1-16. <https://doi.org/10.1186/s12915-020-00871-8>
30. Hartmann, A. M., y Nothwang, H. G. (2022). NKCC1 and KCC2: structural insights into phospho-regulation. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 15, 1-15. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.964488>
31. Hayter, J., Kahn, M., Little, D., Hogan, J., Hayden, D., Yamazaki, S., Numano, R., Abe, M., Hida, A., Takahashi, R., Ueda, M., Block, G. D., Sakaki, Y., Menaker, M., y Tei, H. (1992). Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Analysis of Human Genetic Linkage*, 42(3), 682-685. www.sciencemag.org/
32. Hee, J. C., Lee, C. J., Schroeder, A., Yoon, S. K., Seung, H. J., Jeong, S. K., Do, Y. K., Eun, J. S., Hee, C. H., Seung, K. H., Colwell, C. S., y Yang, I. K. (2008). Excitatory actions of GABA in the suprachiasmatic nucleus. *Journal of Neuroscience*, 28(21), 5450–5459. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5750-07.2008>
33. Holden, S., Cox, J., y Raymond, F. L. (2004). Cloning, genomic organization, alternative splicing and expression analysis of the human gene WNK3 (PRK-WNK3). *Gene*, 335(1–2), 109–119. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.03.009>

34. Hughes, M. E., Hogenesch, J. B., y Kornacker, K. (2010). JTK-CYCLE: an efficient nonparametric algorithm for detecting rhythmic components in genome-scale data sets. *Journal of Biological Rhythms*, 25(5), 372–380. <https://doi.org/10.1177/0748730410379711>
35. Inouye, S.-I. T., y Kawamura, H. (1979). Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic “island” containing the suprachiasmatic nucleus. *Neurobiology*, 76(11), 5962-5966.
36. Jác, M., Sumová, A., y Illnerová, H. (2000). c-Fos rhythm in subdivisions of the rat suprachiasmatic nucleus under artificial and natural photoperiods. *American Physiological Society*, 279, 2270-2276. <http://www.ajpregu.org>
37. Jelínková, D., Illnerová, H., y Sumová, A. (2000). Gate for photic resetting of intrinsic rhythmicity of the rat suprachiasmatic nucleus under a long photoperiod. *Neuroscience letters*, 280(2), 143-146.
38. Kahle, K. T., Rinehart, J., de los Heros, P., Louvi, A., Meade, P., Vazquez, N., Hebert, S. C., Gamba, G., Gimenez, I., y Lifton, R. P. (2005). WNK3 modulates transport of Cl in and out of cells: implications for control of cell volume and neuronal excitability. *PNAS*, 102(46), 16783-16788. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0508307102
39. Kaila, K., Price, T. J., Payne, J. A., Puskarjov, M., y Voipio, J. (2014). Cation-chloride cotransporters in neuronal development, plasticity and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(10), 637–654. <https://doi.org/10.1038/nrn3819>
40. Kanaka, C., Ohno, K., Okabe, A., Kuriyama, K., Itoh, T., Fukuda, A., y Sato, K. (2001). The differential expression patterns of messenger RNAs encoding K-Cl cotransporters (KCC1,2) and Na-K-2Cl cotransporter (NKCC1) in the rat nervous system. *Neuroscience*, 104(4), 933-946. www.elsevier.com/locate/neuroscience
41. Kim, M. J., Yang, H. J., Kim, Y., Kang, I., Kim, S. S., y Cho, Y. W. (2018). Role of nitric oxide and WNK-SPAK/OSR1-KCC2 signaling in daily changes in GABAergic inhibition in the rat dorsal raphe neurons. *Neuropharmacology*, 135, 355–367. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.03.035>

42. Klett, N. J., y Allen, C. N. (2017). Intracellular Chloride Regulation in AVP+ and VIP+ Neurons of the Suprachiasmatic Nucleus. *Scientific Reports*, 7(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09778-x>
43. Klett, N. J., Cravetchi, O., y Allen, C. N. (2022). Long-term imaging reveals a circadian rhythm of intracellular chloride in neurons of the suprachiasmatic nucleus. *Journal of Biological Rhythms*, 37(1), 110–123. <https://doi.org/10.1177/07487304211059770>
44. Lee, H. H. C., Deeb, T. Z., Walker, J. A., Davies, P. A., y Moss, S. J. (2011). NMDA receptor activity downregulates KCC2 resulting in depolarizing GABAA receptor-mediated currents. *Nature Neuroscience*, 14(6), 736–743. <https://doi.org/10.1038/nn.2806>
45. Lee, H. H. C., Jurd, R., y Moss, S. J. (2010). Tyrosine phosphorylation regulates the membrane trafficking of the potassium chloride co-transporter KCC2. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 45(2), 173–179. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2010.06.008>
46. Lee, H. H. C., Walker, J. A., Williams, J. R., Goodier, R. J., Payne, J. A., y Moss, S. J. (2007). Direct protein kinase C-dependent phosphorylation regulates the cell surface stability and activity of the potassium chloride cotransporter KCC2. *Journal of Biological Chemistry*, 282(41), 29777–29784. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705053200>
47. Lesauter, J., Kriegsfeld, L. J., Hon, J., y Silver, R. (2002). Calbindin-d 28k cells selectively contact intra-SCN neurons. *Neuroscience*, 111(3), 575-585. www.neuroscience-ibro.com
48. Lim, W. M., Chin, E. W. M., Tang, B. L., Chen, T., y Goh, E. L. K. (2021). WNK3 maintains the GABAergic inhibitory tone, synaptic excitation and neuronal excitability via regulation of KCC2 cotransporter in mature neurons. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 14, 1-17. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.762142>
49. Liu, C., y Reppert, S. M. (2000). GABA synchronizes clock cells within the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron*, 25, 123-128.

50. McNeill, J. K., Walton, J. C., Ryu, V., y Albers, H. E. (2020). The excitatory effects of GABA within the suprachiasmatic nucleus: regulation of Na-K-2Cl cotransporters (NKCCs) by environmental lighting conditions. *Journal of Biological Rhythms*, 35(3), 275–286. <https://doi.org/10.1177/0748730420924271>
51. Meijer, J. H., Watanabe, K., Schaap, J., Albus, H., Szló, L., y Tá Ri, D. (1998). Light responsiveness of the suprachiasmatic nucleus: long-term multiunit and single-unit recordings in freely moving rats. *The Journal of Neuroscience*, 18(21), 9078-9087.
52. Michel, S., Itri, J., y Colwell, C. S. (2002). Excitatory mechanisms in the suprachiasmatic nucleus: the role of AMPA/KA glutamate receptors. *Journal of Neurophysiology*, 88, 817-828. <https://doi.org/10.1152/jn.00023.2002>
53. Mieda, M. (2020). The central circadian clock of the suprachiasmatic nucleus as an ensemble of multiple oscillatory neurons. *Neuroscience Research*, 156, 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2019.08.003>
54. Moga, M. M., y Moore, R. Y. (1997). Organization of neural inputs to the suprachiasmatic nucleus in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 389(3), 508–534. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19971222\)389:3<508::AID-CNE11>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19971222)389:3<508::AID-CNE11>3.0.CO;2-H)
55. Mohawk, J. A., Green, C. B., y Takahashi, J. S. (2012). Central and peripheral circadian clocks in mammals. *Annual Review of Neuroscience*, 35, 445–462. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-060909-153128>
56. Moriguchi, T., Urushiyama, S., Hisamoto, N., Iemura, S. I., Uchida, S., Natsume, T., Matsumoto, K., y Shibuya, H. (2005). WNK1 regulates phosphorylation of cation-chloride-coupled cotransporters via the STE20-related kinases, SPAK and OSR1. *Journal of Biological Chemistry*, 280(52), 42685–42693. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510042200>
57. Morin, L. P., Shivers, K. Y., Blanchard, J. H., y Muscat, L. (2006). Complex organization of mouse and rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience*, 137(4), 1285–1297. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.10.030>
58. Mrugala, M., Zlomanczuk, P., Jagota, A., Schwartz, W. J., y Maciej, M. (2000). Rhythmic multiunit neural activity in slices of hamster suprachiasmatic nucleus

- reflect prior photoperiod. *American Journal of Physiology*, 278, 987-994. <http://www.ajpregu.org>
59. Obrietan, K., y Van den Pol, A. N. (1995). GABA neurotransmission in the hypothalamus: developmental reversal from Ca²⁺ elevating to depressing. *The Journal of Neuroscience*, 15(7), 5065-5077. doi: 10.1523/JNEUROSCI.15-07-05065.1995.
60. Olde Engberink, A. H. O., Meijer, J. H., y Michel, S. (2018). Chloride cotransporter KCC2 is essential for GABAergic inhibition in the SCN. *Neuropharmacology*, 138, 80–86. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.05.023>
61. Ono, D., Honma, K. I., y Honma, S. (2015). Circadian and ultradian rhythms of clock gene expression in the suprachiasmatic nucleus of freely moving mice. *Scientific Reports*, 5(12310), 1-10. <https://doi.org/10.1038/srep12310>
62. Ono, D., Honma, S., Nakajima, Y., Kuroda, S., Enoki, R., y Honma, K. I. (2017). Dissociation of Per1 and Bmal1 circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus in parallel with behavioral outputs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(18), 3699–3708. <https://doi.org/10.1073/pnas.1613374114>
63. Patke, A., Young, M. W., y Axelrod, S. (2020). Molecular mechanisms and physiological importance of circadian rhythms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(2), 67–84. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0179-2>
64. Petroff, O. A. C. (2002). GABA and glutamate in the human brain. *Neuroscientist*, 8(6), 562–573. <https://doi.org/10.1177/1073858402238515>
65. Pinal, A. T., Moon, T. M., Akella, R., He, H., Cobb, M. H., y Goldsmith, E. J. (2014). Chloride sensing by WNK1 involves inhibition of autophosphorylation. *Science signaling*, 7(324), 1-9. <http://stke.sciencemag.org/>
66. Piechotta, K., Garbarini, N., England, R., y Delpire, E. (2003). Characterization of the interaction of the stress kinase SPAK with the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter in the nervous system: evidence for a scaffolding role of the kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 278(52), 52848–52856. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309436200>

67. Rafiqi, F. H., Zuber, A. M., Glover, M., Richardson, C., Fleming, S., Jovanović, S., Jovanović, A., Kevin, M. O. S., y Alessi, D. R. (2010). Role of the WNK-activated SPAK kinase in regulating blood pressure. *EMBO Molecular Medicine*, 2(2), 63–75. <https://doi.org/10.1002/emmm.200900058>
68. Refinetti R. (2012). Integration of biological clocks and rhythms. *Comprehensive Physiology*, 2(2), 1213-39. doi: 10.1002/cphy.c100088.
69. Reppert, S. M., y Weaver, D. R. (2001). Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annual Reviews of Physiology*, 63, 647-676. www.annualreviews.org
70. Rinehart, J., Vázquez, N., Kahle, K. T., Hodson, C. A., Ring, A. M., Gulcicek, E. E., Louvi, A., Bobadilla, N. A., Gamba, G., y Lifton, R. P. (2011). WNK2 kinase is a novel regulator of essential neuronal cation-chloride cotransporters. *Journal of Biological Chemistry*, 286(34), 30171–30180. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.222893>
71. Rohr, K. E., Pancholi, H., Haider, S., Karow, C., Modert, D., Raddatz, N. J., y Evans, J. (2019). Seasonal plasticity in GABA_A signaling is necessary for restoring phase synchrony in the master circadian clock network. *eLife*, 8, 1-23. <https://doi.org/10.7554/eLife.49578.001>
72. Sagar, S. M., Sharp, F. R., y Curran, T. (1988). Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science*, 240(4857), 1328–1331. <https://doi.org/10.1126/science.3131879>
73. Salihu, S., Meor Azlan, N. F., Josiah, S. S., Wu, Z., Wang, Y., y Zhang, J. (2021). Role of the cation-chloride-cotransporters in the circadian system. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 16(5), 589–597. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2020.10.003>
74. Sonoda, T., Li, J. Y., Hayes, N. W., Chan, J. C., Okabe, Y., Belin, S., Nawabi, H., y Schmidt, T. M. (2020). A noncanonical inhibitory circuit dampens behavioral sensitivity to light. *Science*, 368, 527-531. <http://science.sciencemag.org/>
75. Takeuchi, J., Shannon, W., Aronin, N., y Schwartz, W. J. (1993). Compositional changes of AP-1 DNA-binding proteins are regulated by light in a mammalian circadian clock. *Neuron*, 11(5), 825-836.

76. Thastrup, J. O., Rafiqi, F. H., Vitari, A. C., Pozo-Guisado, E., Deak, M., Mehellou, Y., y Alessi, D. R. (2012). SPAK/OSR1 regulate NKCC1 and WNK activity: analysis of WNK isoform interactions and activation by T-loop trans-autophosphorylation. *Biochemical Journal*, 441(1), 325–337. <https://doi.org/10.1042/BJ20111879>
77. Toledo, R., Aguilar-Roblero, R., Canchola, E., y Caba, M. (2005). Circadian and photic-induced expression of fos protein in the suprachiasmatic nucleus of the rabbit. *Biological Rhythm Research*, 36(1-2), 47-55.
78. Torre-Villalvazo, I., Cervantes-Perez, L. G., Noriega, L. G., Jiménez, J. V., Uribe, N., Chávez-Canales, M., Tovar-Palacio, C., Marfil-Garza, B. A., Torres, N., Bobadilla, N. A., Tovar, A. R., y Gamba, G. (2018). Inactivation of SPAK kinase reduces body weight gain in mice fed a high-fat diet by improving energy expenditure and insulin sensitivity. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 314(1), 53–65. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00108.2017>
79. Trávníčková, Z., Sumová, A., Peters, R., Schwartz, W. J., y Illnerová, H. (1996). Photoperiod-dependent correlation between light-induced SCN c-fos expression and resetting of circadian phase. *American Journal of Physiology*, 825-831.
80. Van den Pol, A. N., y Tsujimoto, K. L. (1985). Neurotransmitters of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus: immunocytochemical analysis of 25 neuronal antigens, 15(4), 1049-1086.
81. Varadarajan, S., Tajiri, M., Jain, R., Holt, R., Ahmed, Q., Lesauter, J., y Silver, R. (2018). Connectome of the suprachiasmatic nucleus: new evidence of the core-shell relationship. *eNeuro*, 5(5), 1-14. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0205-18.2018>
82. Veríssimo, F., y Jordan, P. (2001). WNK kinases, a novel protein kinase subfamily in multi-cellular organisms. *Nature*, 20, 5562-5569.
83. Vitari, A. C., Deak, M., Morrice, N. A., y Alessi, D. R. (2005). The WNK1 and WNK4 protein kinases that are mutated in Gordon's hypertension syndrome phosphorylate and activate SPAK and OSR1 protein kinases. *Biochemical Journal*, 391(1), 17–24. <https://doi.org/10.1042/BJ20051180>

84. Vitari, A. C., Thastrup, J., Rafiqi, F. H., Deak, M., Morrice, N. A., Karlsson, H. K. R., y Alessi, D. R. (2006). Functional interactions of the SPAK/OSR1 kinases with their upstream activator WNK1 and downstream substrate NKCC1. *Biochemical Journal*, 397(1), 223–231. <https://doi.org/10.1042/BJ20060220>
85. Vitaterna, M. H., Takahashi, J. S., y Turek, F. W. (2001). Overview of circadian rhythms. *Alcohol Research y Health*, 25(2), 85-93.
86. Wagner, S., Castel, M., Gainer, H., y Yarom, Y. (1997). GABA in the mammalian suprachiasmatic nucleus and its role in diurnal rhythmicity. *Nature*, 387, 598–603.
87. Wen, S., Ma, D., Zhao, M., Xie, L., Wu, Q., Gou, L., Zhu, C., Fan, Y., Wang, H., y Yan, J. (2020). Spatiotemporal single-cell analysis of gene expression in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Nature Neuroscience*, 23(3), 456–467. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-0586-x>
88. Zagórska, A., Pozo-Guisado, E., Boudeau, J., Vitari, A. C., Rafiqi, F. H., Thastrup, J., Deak, M., Campbell, D. G., Morrice, N. A., Prescott, A. R., y Alessi, D. R. (2007). Regulation of activity and localization of the WNK1 protein kinase by hyperosmotic stress. *Journal of Cell Biology*, 176(1), 89–100. <https://doi.org/10.1083/jcb.200605093>