

Facultad de Medicina



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

INFLUENCIA DE LA SÍNTESIS DE PROSTAGLANDINAS SOBRE LA PERMEABILIDAD DE LOS ÓRGANOS CIRCUNVENTRICULARES

TESIS

que presenta:

CARLOS RICARDO MARTÍNEZ GÓMEZ

que para obtener el título de:

LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

Director de Tesis

DR. RUDOLF M. BUIJS

Asesor de Tesis

LIC. BEATRIZ RODRÍGUEZ CORTÉS

Ciudad Universitaria, Cd. México 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Este trabajo es sin lugar a dudas el esfuerzo de todas las personas que me han acompañado a lo largo de mi vida, aquellas personas que cuidaron de mi, me enseñaron e instruyeron, que rieron y discutieron, que decidieron darme un poco de su tiempo y de esta forma yo poder retribuir a ellos.

Gustoso estoy de agradecer a toda mi familia; mi madre que me brindó su apoyo incondicional, confianza y fuerza, ella que es mi ejemplo a seguir y un gran ejemplo de mujer profesionalista y madre con valores impecables, que me enseñó a brindar ayuda al necesitado, no hay palabras suficientes para agradecerle; a mi padre único en la vida, él siempre me ha dado su confianza inocente sin dudarle, que me enseña constantemente a nunca rendirme y verle el lado divertido de la vida, sin duda le debo a él el poder sonreírle a la adversidad y apoyar a los demás; a mi hermano que me demuestra que puedo contar con él cuando lo necesito, que se divierte conmigo y se pelea conmigo, que me apoya y lo apoyo, paso a paso, cada día un poco mejores. A mis abuelitas y a mis abuelitos, los cuales me han demostrado un amor que trasciende más de una barrera, más que la distancia; a mi abuelita Irma por todo ese amor que me dio, por enseñarme que una familia unida es una fortaleza infranqueable; a mi abuelita Blanca que me enseña que nunca es tarde para descubrir la belleza del mundo, a ser bohemio y libre, a sorprenderme del día a día; a mis abuelitos Odilón y Beto que cuidan y protegen a su familia cada uno a su manera particular, *sui generis*, especialmente agradezco de todo corazón a mi abuelito Beto por tomarse la molestia, paciencia e interés de leer esta tesis. A mis primos, tías y tíos. A toda esta familia, que la amo, le agradezco por el pedazo de su vida que me han dado.

También me gustaría agradecer a mis amigos que me han acompañado y apoyado, Sebas, Fa, Diana, Monica, Julio, Cess, Pau, Dianne, Made, Adriana, Victor, Damian, Cristina, Andrea, Adrian,

David, Mij, Mau, Ixchetl. A mis compañeros y amigos de la carrera, Julian, Liz, Julia y Juan Carlos; y a todos los biomédicos.

A mis compañeros de laboratorio; particularmente a Betty con la que realicé este trabajo, con la que sufrí, peleé, y discutí por los experimentos, la persona que comprende mejor que nadie lo complicado que es y con la que aprendí a solucionar estos problemas; a Arturo mi alumnillo de servicio social quien me ayudó con los experimentos y quien realmente le interesó entender el tema, le agradezco por ser crítico y responsable con el proyecto; a MariCarmen, Esteban, Luis, Rebeca, Eva y Gaby que me enseñan todo lo que tengo que saber y se pelean y discuten conmigo, corrigen mis errores y me hacen mejor investigador.

Al Doctor Ruud Buijs por haberme acogido en su laboratorio y darme todo su apoyo, con quien constantemente contraste y algunas veces coincido, y justo por eso su punto de vista es extremadamente valioso, una persona crítica y uno de los mejores investigadores que he conocido, sino es que el mejor.

Finalmente, me gustaría agradecer a todos aquellos que leyeron, revisaron y corrigieron este trabajo.

INDICE

1. Lista de abreviaturas

2. Prefacio

3. Introducción

3.1. Fisiología, Cronobiología y sistemas sensoriales

3.2. Órganos Circunventriculares

3.2.1. Descripción general de los Órganos Circunventriculares, dónde se localizan y qué son.

3.2.2. El complejo Arqueado - Eminencia Media y su papel fisiológico en la secreción hormonal y los ritmos circadianos.

3.2.3. *Lámina terminalis*: Órgano Vasculoso de la *Lámina terminalis* y Órgano Subfornical en la osmoregulación y termogénesis

3.2.4. Modificaciones fisiológicas de la permeabilidad de los OCVs

3.3. Prostaglandinas

3.3.1. Influencia de las prostaglandinas en el control fisiológico y su relación con los Órganos Circunventriculares

3.3.1.1. Control reproductivo

3.3.1.2. Estrés y respuesta inmune

3.3.2. Osmoregulación: fisiología renal y natriuresis

3.4. Control hipotálmico de la temperatura por núcleos asociados a un Órgano Circunventricular

3.4.1. Núcleo Preóptico Mediano, Área Preóptica

3.4.2. Influencia metabólica y papel del Arqueado sobre el control circadiano de la temperatura

3.5. Planteamiento del problema

4. Pregunta

5. Hipótesis

6. Objetivos

7. Método

7.1. Animales

7.2. Cirugía, Canulación de vena yugular e implantación de botones de temperatura

7.3. Evaluación de la permeabilidad con azul de Evans y perfusión

7.4. Inmunohistoquímica contra c-Fos

7.5. Análisis de temperatura

7.6. Experimento 1: Investigar si los cambios de permeabilidad circadianos son inducidos por prostaglandinas

7.7. Experimento 2: Modelo de cambios de permeabilidad de los Órganos Circunventriculares inducida por consumo elevado de sodio en el agua

7.8. Experimento 3: Investigar si los cambios de permeabilidad de los Órganos Circunventriculares debido a un consumo elevado de sodio en el agua son inducidos por la producción de prostaglandinas

7.9. Análisis estadístico

8. Resultados

8.1. Efecto de la inhibición de la síntesis de prostaglandinas endógenas sobre los cambios circadianos de permeabilidad de los Órganos Circunventriculares. Correlación con la temperatura corporal.

8.2. Modelo de consumo elevado de sal: inducción de sed, actividad neuronal y cambios en la permeabilidad de los Órganos Circunventriculares.

8.3. Efecto de la inhibición de la síntesis de prostaglandinas endógenas sobre la permeabilidad de los Órganos Circunventriculares y la sed durante el consumo elevado de sal.

9. Discusión

9.1.Participación de las prostaglandinas endógenas sobre la permeabilidad de los Órganos Circunventriculares.

9.2.Termoregulación

9.3.Osmoregulación

10.Conclusión

11.Referencias

1. LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	Corticotropina
AINE	Antiinflamatorio no Esteroideo
AP	Área Postrema
ARC	Núcleo Arqueado
AV3V	Anterior Ventral del Tercer Ventrículo
AVP	Vasopresina
TAP	Tejido Adiposo Pardo
BHE	Barrera Hematoencefálica
CAS	Condicionamiento Aversivo al Sabor
COX	Ciclooxigenasa
CRH	hormona liberadora de corticotropina (Por sus siglas en ingles <i>Corticotropin Releasing Hormone</i>)
DAB	Diaminobezidina
DMH	Hipotálamo Dorso Medial (Por sus siglas en ingles <i>Dorso Medial Hypothalamus</i>)
EB	Azul de Evans (Por sus siglas en ingles <i>Evans Blue</i>)
EM	Eminencia Media
EP	Receptor de prostaglandina E
FSH	hormona Folículo Estimulante (Por sus siglas en ingles <i>Follicle Stimulating Hormone</i>)
GnRH	hormona liberadora de Gonadotropina (Por sus siglas en ingles <i>Gonadotropin Releasing Hormone</i>)
i.v.	intravenoso

IL-1b	Interleucina-1 beta
INDO	Indometacina
LCE	Líquido Cerebro Espinal
LH	hormona Luteinizante (Por sus siglas en ingles <i>Luteinizing Hormone</i>)
LPS	Lipopolisacárido
LT	Lámina Terminalis
MnPO	Núcleo Preóptico Mediano
mPGES	Sintetasa de prostaglandina E microsomal
MPO	Núcleo Preóptico Medio
NO	Óxido Nítrico
NSQ	Núcleo Supraquiasmático
OCV	Órgano Circunventricular
OVLT	Órgano Vasculoso de la Lámina Terminalis
OXT	Oxitocina
PBS	Buffer de Fosfatos
PFA	Paraformaldehido con buffer de fosfatos
PG	Prostaglandinas
PGDS	Sintetasa de prostaglandina D
PGI2	prostaciclina
PVN	Núcleo Paraventricular
PVT	Núcleo Paraventricular del Tálamo
rRPa	Núcleo del Rafe rostral pallidus
SCO	Órgano Subcomisural (Por sus siglas en ingles <i>Subcommissural Organ</i>)

SFO	Órgano Subfornical (Por sus siglas en ingles <i>Subfornical Organ</i>)
SNA	Sistema Nervioso Autónomo
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
SNPS	Sistema Nervioso Parasimpático
SNS	Sistema Nervioso Simpático
SON	Núcleo Supraóptico
TA	Temperatura Ambiente
TBS	Tris Buffer Salino
TRH	hormona liberadora de Tirotropina (Por sus siglas en ingles <i>Tirotropin Releasing Hormone</i>)
TSH	Tirotropina (Por sus siglas en ingles <i>Thyroid Stimulating Hormone</i>)
VEGF	Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (Por sus siglas en ingles <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)
ZT	Zeitgeber

2. PREFACIO

Walter Canon define la homeostasis de acuerdo a lo siguiente: “ Los seres vivos altamente desarrollados son un sistema abierto ya que tienen muchas relaciones con lo que les rodea. Cambios en los alrededores ocasionan disturbios en el sistema interno. Estos disturbios son normalmente mantenidos dentro de un limite estrecho, debido a ajustes automáticos dentro del sistema, por lo tanto oscilaciones grandes son prevenidas y las condiciones internas son mantenidas casi constantes. El termino equilibrio puede ser usado para designar estas condiciones constantes.”

Dentro del Sistema Nervioso Central (SNC), el hipotálamo juega un papel central en la regulación homeostática. Para poder actuar de forma coordinada con la periferia el SNC necesita recibir información corporal que le indique el estado de la periferia e.g. nutrientes, hormonas o péptidos. El hipotálamo no solo integra esta información sino también la sincroniza al ciclo de luz-oscuridad, lo que se conoce como regulación circadiana, con el objetivo de dar una respuesta ponderada al momento del día.

En este trabajo se discute uno de los dos sistemas de entrada de información corporal o aferencias al SNC; el primero esta compuesto por receptores (quimiorreceptores, termorreceptores, barorreceptores, etc.) que envían la información a núcleos sensoriales (el núcleo del Tracto Solitario, el núcleo Vestibular, etc.) o a través de neuronas sensoriales del ganglio de la raíz dorsal que se comunican con el asta dorsal de la Médula Espinal. El segundo sistema, el cual es el tema central de esta tesis, detecta información de la circulación sanguínea mediante los Órganos Circunventriculares (OCVs), tejidos especializados localizados dentro del SNC cuya principal característica es su permeabilidad a las sustancias sanguíneas mediante sus capilares fenestrados, permitiendo el acceso de información de solutos disueltos en la sangre a ciertos núcleos neuronales. Una vez que la información llega al SNC, esta se integra y se da una respuesta que se organiza circadianamente.

Sin embargo, la integración de la información se modifica desde la entrada sensorial, por lo que depende de las características del sistema sensorial que recibe y transmite la información, si éste es poco sensible ante el estímulo o modifica el acceso de las sustancias. Tal es el caso de los OCVs, los cuales recientemente se ha descrito que modifican el acceso de solutos disueltos en la sangre de forma emergente ante un desbalance energético u osmótico, pero aún más sorprendente de forma circadiana. Este efecto circadiano reportado por estudios recientes realizados en el laboratorio, muestra un ritmo en la permeabilidad del complejo Arqueado (ARC) - Eminencia Media (EM), los cuales son un OCV, con su acrofase cercana al final de la fase de actividad de los animales.

La permeabilidad es una variable que depende principalmente de las características del endotelio. Existen diferentes moléculas endoteliales que incrementan la permeabilidad y una de ellas son las prostaglandinas (PGs) las cuales actúan localmente. Las PGs se pueden producir dentro de los OCVs, donde se ha descrito su importancia en la organización y la liberación de hormonas de la EM para producir el ciclo estral. El propósito de este trabajo fue evaluar si las modificaciones circadianas de la permeabilidad de los OCVs requerían de síntesis de PGs. Se evaluó la participación de las PGs mediante la inhibición de su síntesis de forma circadiana y se correlacionó con el, ya conocido, efecto criogénico del inhibidor. Además, debido a que durante un desbalance osmolar se induce un incremento de la permeabilidad de ciertos OCVs, se evaluó la participación de las PGs en el incremento de la permeabilidad y la ingesta de agua.

La introducción de esta tesis se encuentra dividida en cuatro partes, en la primera se hablará de los ritmos biológicos y los sistemas sensoriales; en la segunda se centrará en los OCVs, sus funciones y sus modificaciones; en la tercera se hablará de las PGs como sustancias capaces de cambiar la fisiología de los OCVs, y por último se hablará del control hipotalámico de la temperatura.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 FISIOLOGÍA, CRONOBIOLOGÍA Y SISTEMAS SENSORIALES

El estudio de la fisiología esta fundamentalmente orientado en la búsqueda de los mecanismos reguladores subyacentes a la homeostasis. Como Canon describió, en los seres vivos existen ajustes en las condiciones internas para compensar y adaptarse al ambiente externo pero también es necesario este tipo de adaptaciones para condiciones internas. Estas adaptaciones son esencialmente una respuesta a estímulos específicos para recuperar la homeostasis e.g. un ambiente frío genera una respuesta de temblor para elevar la temperatura. El cuerpo sensa las condiciones externas e internas, integra la información y modifica la actividad de algún órgano blanco. El sistema nervioso central (SNC) junto con el Sistema Nervioso Periférico (SNP) juegan un papel fundamental en la integración de todos estos procesos.

Ahora bien, el concepto que Canon ideó esta incompleto, las condiciones internas son solo estables en una ventana de tiempo reducida, las variables fisiológicas y las condiciones internas oscilan en un periodo de un día en cierto rango de valores. Por lo que el concepto se amplio para hablar de condiciones internas que presentan un **ritmo circadiano** (aproximadamente 24 horas).

Los ritmos circadianos son la organización de la fisiología y gracias a esta coordinación también se ponderan respuestas contrareguladoras al momento del día. Requieren de un oscilador cuya función es dar la temporalidad a los organismos de forma endógena, esto es, un reloj interno. Todos los animales tienen en sus células mecanismos moleculares, genes reloj, que les permiten coordinar sus procesos con el ambiente externo a manera de predecirlo. Sin embargo, para la organización y la sincronía se requiere de un reloj central, el cual puede comunicar al resto de las células la temporalidad e imponer su

periodo (Buijs 1996, 2013). Este reloj central se sincroniza al ambiente externo o a un Zeitgeber (ZT) e.g. luz, mediante receptores sensoriales e.g. retina, para generar un ritmo circadiano e.g. temperatura (Aguilar-Roblero 2015). En los mamíferos este reloj central es el Núcleo Supraquiasmático (NSQ), núcleo hipotalámico esencial en el establecimiento de los ritmos circadianos, el reloj maestro. Se localiza, como su nombre lo indica, justo encima del quiasma óptico donde recibe proyecciones directas del nervio óptico (Hattar 2006). La pérdida de la función del NSQ mediante una lesión electrolítica evita la presencia de ritmos circadianos en: glucosa, insulina, temperatura, actividad, entre otros; lo que se conoce como asincronía (Yamamoto 1987, Sano 1995, Refinetti 1995). En ratas, que son animales nocturnos, en un ciclo de 12 horas luz - 12 horas oscuridad, ZT0 es cuando se encienden las luces y es su fase de reposo, mientras que ZT12 es cuando se apagan las luces e inicia su fase de actividad.

Uno de los principales objetivos en el laboratorio es conocer como el NSQ puede regular esta gran cantidad de variables biológicas mediante sus conexiones con otros núcleos hipotalámicos y sus conexiones indirectas con el sistema nervioso autónomo (SNA), el cual a través de su rama simpática (SNS) y parasimpática (SNPS) inervan y regulan la fisiología de los distintos órganos (Buijs 1996, 2013; Kalsbeek 2011). Particularmente en los últimos años nos hemos centrado en el estudio de la retroalimentación hacia el hipotálamo y el reloj central a través de los sistemas sensoriales.

El control circadiano requiere del control homeostático el cual mantiene a una variable fisiológica en cierto valor de referencia (“set point”), el cual se moverá alrededor del día en cierto umbral. Este control requiere de sistemas especializados que puedan percibir esta misma variable para poder ajustarla si sale del rango de valores, esto se conoce como retroalimentación. La retroalimentación es sumamente importante en condiciones que retan a la fisiología como el ayuno, ambientes fríos, escasez de agua, etc, en los cuales se percibe una deficiencia en la cantidad de energía, en la temperatura ambiental o en la cantidad de agua, respectivamente. En el caso del

ayuno se ha observado que se modifica el ritmo de la temperatura, disminuyendo todavía más en la fase de reposo, lo cual se hipotetiza como la optimización del gasto energético lo cual evita una mayor pérdida de energía por producción de calor (Liu 2002).

En el caso de la detección de condiciones internas existen por lo menos dos sistemas especializados; 1) la rama sensorial del SNC junto con los ganglios y las terminales sensoriales libres del SNP y tejidos especializados como los quimiorreceptores; o 2) a través de órganos sensoriales localizados en regiones privilegiadas en el encéfalo y el tallo cerebral, los llamados órganos Circunventriculares (OCVs) llamados así debido a su proximidad con los ventrículos cerebrales (Hofer 1958). La entrada de información corporal a través de los sistemas sensoriales modifica la organización fisiológica adaptando las respuestas contrareguladoras, como es el caso del ayuno. Además las conexiones del NSQ adaptan la sensibilidad de los sistemas sensoriales dependiendo de la hora del día.

En el caso de la rama sensorial del SNC, trabajos realizados en el laboratorio demuestran un cambio en la sensibilidad circadiana a lipopolisacárido (LPS), endotoxina de bacterias gram negativas, cuya detección se da a través del asta dorsal de la Médula Espinal (Guerrero-Vargas 2014, Soto-Tinoco aun no publicados). Este cambio circadiano de sensibilidad modifica las respuestas inflamatorias sistémicas.

Para el segundo sistema sensorial, los OCVs están implicados en la regulación de algunas variables fisiológicas íntimamente moduladas por el NSQ e.g. temperatura, ingesta de agua. Sin embargo, evidencia directa de la modulación del NSQ sobre la fisiología de los OCVs es escasa. En el laboratorio se han realizado experimentos que demuestran la importancia de la conexión del NSQ con el núcleo Arqueado (ARC) el cual se encuentra adyacente a la Eminencia Media (EM), un OCV. El ARC recibe información a través de la EM de e.g. concentración de glucosa (Herrera-Moro Chao 2016) o de corticosterona (Mercado 2017). La sensibilidad del ARC a estas

sustancias esta regulada circadianamente y esto se debe a la interacción que tiene con el NSQ. Esta interacción es importante para la regulación circadiana de la temperatura (Guzman-Ruiz 2015), actividad locomotora y corticosterona (Buijs 2017). Esta evidencia señala que el NSQ modifica la sensibilidad del ARC, sin embargo una posibilidad alternativa sería que esta regulación se deba a un cambio en la entrada de información a través de la EM hacia el ARC. Por lo que en este ámbito se desconoce si el NSQ modifica directamente a los OCVs. Estos ejemplos indican que la información colectada por estos sistemas sensoriales es sumamente importantes para la transmisión e integración de la información ya que dependiendo de su sensibilidad circadiana modifican la organización fisiológica.

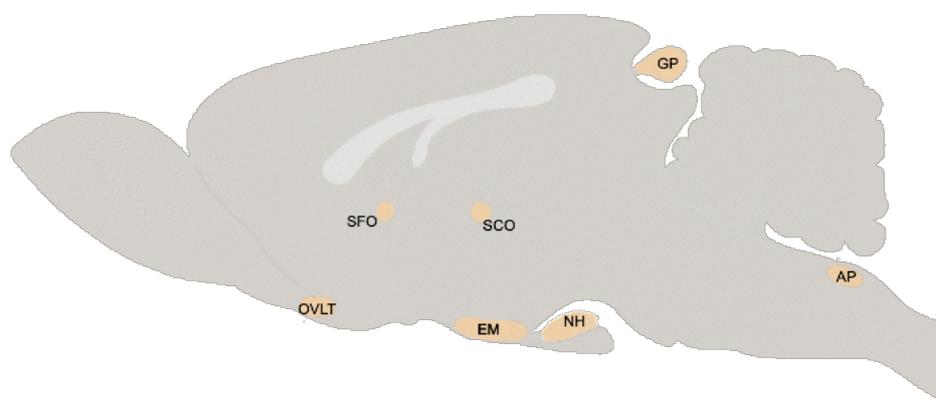
3.2 ÓRGANOS CIRCUNVENTRICULARES

3.2.1 DESCRIPCIÓN GENERAL DE LOS ÓRGANOS CIRCUNVENTRICULARES, DÓNDE SE LOCALIZAN Y QUÉ SON

En la literatura se consideran siete OCVs, de rostral a caudal el primero es el Órgano Vasculoso de la *Lámina Terminalis* (OVLT), el cual se localiza en la región rostral ventral de la *Lámina Terminalis* (LT), la cual es una región que constituye la parte más anterior del tercer ventrículo. Se localiza ventral al quiasma óptico, justo donde se encuentran los dos nervios ópticos, y donde nace el receso óptico, el inicio del tercer ventrículo, el ventrículo hipotalámico. El segundo OCV, el Órgano Subfornical (SFO), se localiza igualmente en la LT (formando junto con el OVLT y el Núcleo Preóptico Mediano (MnPO) la región conocida como AV3V (Anterior Ventral del Tercer Ventrículo)), en el piso ventral del fornix justo donde se conecta el tercer ventrículo con los ventrículos laterales. El tercero es la Eminencia Media (EM), que se encuentra en el receso infundibular del tercer ventrículo (el infundíbulo es la porción que conecta al hipotálamo con la hipófisis). El Órgano Subcomisural (SCO) esta en la porción más caudal del tercer ventrículo, en el piso de la comisura posterior, justo donde inicia el acueducto cerebral. La Neurohipofisis se localiza en la silla turca del esfenoides. La glándula pineal se localiza entre los dos hemisferios cerebrales y durante el desarrollo

surge del receso pineal del tercer ventrículo. Por último, el Área Postrema (AP) es el único OCV que conecta con el cuarto ventrículo, localizado en el tallo cerebral, entre ambos lados del núcleo del Tracto Solitario (Fig Intro 1). Por otro lado está el plexo coroideo, el cual no siempre es considerado un OCV debido a la ausencia de tejido nervioso, este no tiene una región particular y es un epitelio con escaso tejido conjuntivo que se localizan en cada uno de los ventrículos cerebrales.

Figura Introducción 1. Esquema de la localización de los OCVs en el cerebro de rata en un corte sagital.



En esta tesis se evaluó el OVLT, el SFO y la EM, ya que en trabajos previos realizados en el laboratorio presentaron un ritmo circadiano en su permeabilidad (Rodríguez 2017).

Los OCVs presentan varias características que los hacen diferentes al resto del tejido nervioso, 1) se encuentran adyacentes a algún ventrículo cerebral, 2) presentan capilares fenestrados y por lo tanto presentan una barrera hematoencefálica (BHE) limitada, y 3) tienen una barrera hemato - ventricular que impide el paso de las sustancias sanguíneas al líquido cerebroespinal (LCE) (Langlet 2013c). La segunda característica es la más relevante para su función sensorial o secretora, y es gracias a ella que se conocen como las “ventanas del cerebro” (Sisó 2010) ya que permiten la comunicación directa entre las sustancias sanguíneas y el parénquima cerebral.

La BHE se encuentra en los capilares sanguíneos de todo el resto del SNC y es una barrera celular compuesta por los pies terminales de astrocitos, pericitos y las uniones estrechas, ocluyentes y adherentes del endotelio cerebral. Estas características ocasionan que ninguna sustancia acarreada por la sangre pase entre las células del endotelio y todo el tránsito sea transcelular a través de vesículas y transportadores. La BHE mantiene un líquido intersticial nervioso controlado y homeostático que protege al tejido nervioso de las sustancias acarreadas por la sangre (Abbott 2006).

Se sabe poco del desarrollo de los OCVs y como ellos escapan de la BHE y desarrollan capilares fenestrados (Kiecker 2017). Pero se sabe que estas fenestraciones excluyen el paso de moléculas por tamaño dejando pasar moléculas pequeñas como glucosa y péptidos, e incluso proteínas de bajo peso molecular como la leptina, pero impiden el paso de proteínas de gran peso molecular como las globulinas o dextranes de 10kD (Ciofi 2011, Morita 2016, 2013b). En todos los capilares fenestrados esta exclusión de sustancias se regula mediante un diafragma en la fenestración que funciona como malla para filtrar los solutos (Stan 2012).

Los OCVs se pueden clasificar en secretores y sensoriales por la función que desempeñan (Duvernoy 2007). Dentro del primer grupo se encuentran la EM, la neurohipófisis y la glándula Pineal. Por otro lado, dentro de los sensoriales se encuentran el OVLT, el SFO, el SCO y el AP (Rodríguez 2005). Esta clasificación es un poco antigua, ya que se conoce que la EM forma un complejo con la porción ventromedial del ARC, que tiene capilares fenestrados, y que en conjunto forman un complejo sensorial (Ciofi 2011, Langlet 2013a), sin embargo la clasificación es útil para mostrar las funciones que se conocen.

3.2.2 EL COMPLEJO ARQUEADO - EMINENCIA MEDIA Y SU PAPEL FISIOLÓGICO EN LA SECRECIÓN HORMONAL Y LOS RITMOS CIRCADIANOS

La Eminencia Media es un OCV clasificado como secretor debido a que aquí se da la liberación de hormonas hipofisiotrópicas necesarias para el funcionamiento de los ejes Hipotálamo-Pituitaria. Tal es el caso de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y la hormona liberadora de tirotropina (TRH) secretadas por el núcleo Paraventricular (PVN), o la hormona liberadora de Gonadotropina (GnRH) secretada por la región preóptica. Todas estas hormonas se liberan en el espacio pericapilar de los vasos fenestrados de la EM y de aquí viajan a través del sistema porta hipofisiario hasta bañar a la adenohipofisis. Una vez en la adenohipófisis, CRH, TRH y GnRH, promueven la liberación de las hormonas hipofisarias: corticotropina (ACTH); tirotropina (TSH); hormona Luteinizante (LH) y Folículo Estimulante (FSH), respectivamente. Las hormonas hipofisarias actúan sobre una glándula endocrina modificando su fisiología: ACTH actúa sobre la glándula suprarrenal, TRH actúa sobre la tiroides, y LH/FSH actúa sobre las gónadas (ovarios o testículos).

Existen por lo menos dos puntos de regulación de estos ejes, el primero se da en los núcleos hipotalámicos que contienen estas unidades neurosecretoras, su actividad y las señales que allí se integren definirán la cantidad de neuropéptidos sintetizados. El segundo punto de regulación se encarga de la liberación de estos péptidos en las terminales neurosecretoras en la EM, aquí otras células características de esta región juegan un papel fundamental, los llamados tanicitos.

Los tanicitos de la EM son células endoteliales con una única prolongación que se proyecta a los vasos sanguíneos fenestrados. Esta prolongación se puede modificar al recibir cierta señal, lo cual modifica su superficie de contacto con el capilar permitiendo la liberación de hormonas hipofisiotrópicas e.g. la extensión de la prolongación debido al incremento en la concentración de TRH para evitar mayor liberación de la misma hormona (Müller-Fielitz 2017), o la retracción de la prolongación para promover la liberación de GnRH debido a un incremento de estrógeno (De Seranno 2004, 2010; Prevot 2010).

Ahora bien, cada una de las hormonas aquí mencionadas presentan un ritmo circadiano o infradiano (ocurren menos de una vez al día), por lo que la organización de la EM y la actividad de las células depende del NSQ para ser rítmica, el ejemplo más claro es el caso de GnRH. Anteriormente se ha mencionado, el papel del estrógeno en la liberación de GnRH en la EM es central, generando un estado permisivo para que cuando los niveles de estrógeno sean adecuados el sistema circadiano de la señal para dar la liberación de GnRH durante la fase de reposo. Si se mantiene alta la concentración de estrógeno el ritmo se vuelve circadiano en lugar de infradiano (Legan 1975, Miller 2013).

Por otro lado, el ARC recibe información de la circulación sanguínea a través de la EM (Ciofi 2011, Langlet 2014), por lo que es capaz de detectar glucosa, corticosterona, entre otros (Herrera-Moro Chao 2016, Mercado 2017). Igualmente, se ha mencionado en la primera parte de esta introducción la importancia del ARC en la fisiología y en la regulación de los ritmos circadianos.

3.2.3 LÁMINA TERMINALIS: ÓRGANO VASCULOS DE LA LÁMINA TERMINALIS Y ÓRGANO SUBFORNICAL EN LA OSMOREGULACIÓN Y TERMOGÉNESIS

El OVLT junto con el SFO y el núcleo Mediano Preóptico (MnPO) forman la base neuronal de la LT (McKinley 2015). Tanto el tejido del OVLT como el del SFO contienen neuronas (Sisó 2010), de aquí que se consideren sensoriales, además contienen células gliales y endodimales tipo tanicitos (Langlet 2013c). Dentro de las funciones en las cuales se ha implicado a esta región se encuentra: la termoregulación y la osmoregulación (la osmolaridad es la cantidad de iones disueltos, en este caso en la circulación sanguínea).

Para ejercer sus funciones osmoreguladoras el OVLT y el SFO tienen neuronas osmosensitivas que se activan por ciertos estímulos e.g. un incremento en la osmolaridad o la hormona angiotensina, los cuales inducen patrones de activación específicos para estos dos estímulos

(McKinley 2004). Estas neuronas mandan numerosas proyecciones al MnPO, y en conjunto toda la LT manda proyecciones al Núcleo Supraóptico (SON), al PVN y al núcleo paraventricular del tálamo (PVT), por mencionar algunos núcleos centrales en esta regulación (McKinley 2015, Sisó 2010).

Dentro de las principales respuestas que se da ante retos osmóticos se encuentran: 1) aumento del consumo de agua mediante las conexiones que tiene la LT con el PVT (Leib 2017) y este a su vez con la Corteza Cingular e Insular (Hollis 2008), 2) liberación de vasopresina (AVP) y oxitocina (OXT) de neuronas magnocelulares del

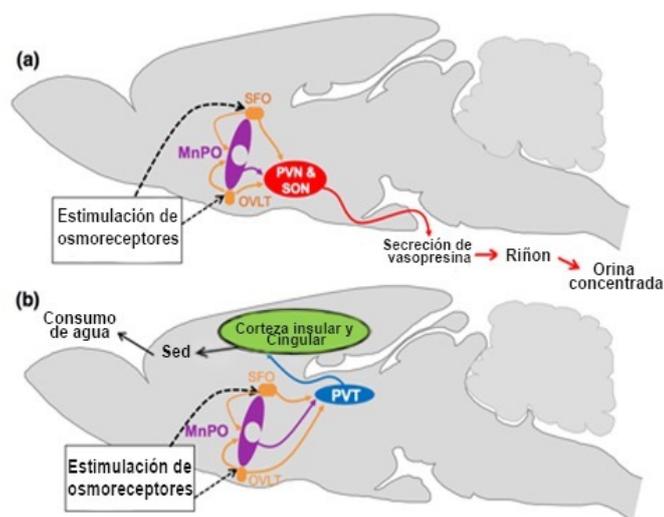


Figura Introducción 2. Esquema del circuito neuronal propuesto que se encarga de la liberación de AVP y de la inducción de sed por la estimulación de los osmoreceptores centrales (SFO y OVLT). (modificado de McKinley 2015).

PVN y SON a la circulación sanguínea a través de la Neurohipófisis y 3) modificación de la natriuresis (excreción de Na) y reabsorción renal a través del nervio renal. Esta última función la realiza mediante una conexión polísináptica de la LT hacia el riñon (Sly 2001). La activación simpática del nervio renal por estímulos que activan a la LT e.g. reto osmótico o angiotensina, promueve un decremento en el flujo renal mediante la vasoconstricción (Burnstock 2017). Este incremento de actividad también promueve la liberación de renina (enzima necesaria para la producción de angiotensina) (Burnstock

2017, May 2000) e incremento en la absorción de Na y agua (Burnstock 2017, Dibon 1977).

La toma de agua no solo se observa en condiciones de desbalance osmótico sino también como una conducta anticipatoria mediada por el NSQ. En condiciones fisiológicas existe un ritmo en la ingesta de líquidos teniendo un periodo anticipatorio justo antes de la fase de reposo, esta conducta anticipatoria previene un incremento en la osmolaridad sanguínea durante la fase de reposo. Las proyecciones del NSQ que llegan al OVLT inducen esta conducta anticipatoria (Gizowski 2016).

Adicional al ARC, la LT ejerce funciones termoreguladoras recibiendo aferencias hacia el MnPO de relevos sensoriales del asta dorsal de la médula espinal, la cual sensa mediante terminales libres de neuronas sensoriales la temperatura cutánea, por lo cual recibe información de la temperatura por medio de la primera vía sensorial (McKinley 2015). Se conoce poco del papel directo del OVLT o del SFO, ya que las funciones que se les atribuyen implican al MnPO el cual recibe información sensorial de la médula espinal. En el cuarto capítulo de esta tesis se profundizará más acerca del control de la temperatura.

3.2.4 MODIFICACIONES FISIOLÓGICAS DE LA PERMEABILIDAD DE LOS ÓRGANOS CIRCUNVENTRICULARES

Existen en la literatura dos casos reportados donde situaciones emergentes fisiológicas modifican las propiedades de los OCVs, afectando su principal característica que es la permeabilidad. El primer caso esta reportado por Langlet 2013a donde muestra que hay un incremento de la permeabilidad durante el ayuno. El segundo caso, es reportado por Morita en el 2013a, donde observó un incremento en la permeabilidad del OVLT y el SFO debido a un consumo incrementado de Sodio (Na). Es sorprendente que en condiciones donde se requiera de la retroalimentación de los sistemas sensoriales, estos requieran de una modificación de su estructura y de incrementar su permeabilidad.

Particularmente, el incremento de permeabilidad durante el ayuno se asocia a un incremento en la sensibilidad del ARC a hormonas circulantes. Este incremento de permeabilidad hacia el ARC se revierte si se bloquea la señalización por el factor de crecimiento vascular endotelial A (VEGF-A), a su vez esto bloquea el incremento de sensibilidad del ARC a hormonas. Esto asocia una función fisiológica con la permeabilidad del endotelio de un OCV señalando que se necesita este incrementó para la integración.

Fue en parte por estas modificaciones y por la interacción ARC-NSQ que se llevó a pensar si el acceso a la información al ARC podía ser circadiano, esto es, si la permeabilidad del complejo ARC-EM podía ser circadiana. Por lo que en el 2017 en el trabajo de licenciatura de Beatriz Rodriguez se evaluó la permeabilidad de los OCV (EM, OVLT, SFO y AP) y se observaron modificaciones circadianas en la permeabilidad de la EM, del OVLT y del SFO, cuyo ritmo dependía del NSQ. Este es el principal antecedente de esta tesis, el cual se resume de la siguiente manera: durante la fase tardía de reposo, ZT11, existe una permeabilidad baja en los OCVs, y durante la fase temprana de reposo, ZT2, existe una mayor permeabilidad de los OCVs. Fue gracias a esta tesis que se realizaron estudios más recientes en el laboratorio que sugieren que la acrofase, valor máximo de una variable circadiana, de la permeabilidad del ARC-EM es ZT22, fase tardía de la fase de actividad, en lugar de ser ZT2.

Por otro lado, otros casos fuera de la fisiología son los efectos reportados por Langlet 2013b en su tesis doctoral, donde un antagonista de glucocorticoides incrementaba la permeabilidad del ARC-EM. Igualmente, se reportó en este mismo trabajo la presencia de un ritmo circadiano en la ARC-EM opuesto a lo observado en el laboratorio.

La permeabilidad es una variable que depende principalmente de las características del endotelio, la presencia de fenestraciones y expresión de proteínas de unión. Existen diferentes moléculas que incrementan la permeabilidad de los endotelios como VEGF, Óxido

Nítrico (NO) (Tilto 1999), factores inflamatorios y las prostaglandinas (PGs) como la prostaciclina (PGI₂) y la PGE₂ (Cahill 2016, Johnston 1976, Dalvi 2015). Algunos productos endoteliales promueven la vasodilatación, particularmente el NO junto con las PGs actúan sobre el músculo liso de recubrimiento de los vasos sanguíneos, provocando relajación muscular, esto a su vez incrementa el flujo sanguíneo y el paso de sustancias acarreadas por la sangre al parenquima de los tejidos (Cahill 2016, Johnston 1976). Además de actuar sobre la vasodilatación, las PGs actúan a nivel de la expresión de proteínas de uniones estrechas y ocluyentes, promoviendo o reduciendo su expresión induciendo un incremento o decremento de la permeabilidad, respectivamente (Flores-Benitez 2009, Lejeune 2011, Tanaka 2008, Kobayashi 2010, Rodríguez-Lagunas 2013, Su 2013, Ghulé 2012, Ohmura 2016, Qiu 2014). Por lo tanto al ser las PGs uno de los factores capaces de alterar la permeabilidad endotelial, y por los motivos que a continuación se explicarán detalladamente, se evaluó si se requerían para suscitar los cambios circadianos de la permeabilidad de los OCVs.

3.3 PROSTAGLANDINAS

La historia de las PGs inicio desde hace más de 3000 años gracias al empleo de las hojas de sauce como analgésicos; no fue hasta inicios de 1800 que se obtuvo el principio activo de estas hojas y a finales de 1800 la síntesis de la Aspirina, el primer antiinflamatorio no esteroideo (AINE) que inhibe la síntesis de PGs, mas en esa época se desconocía el mecanismo de acción de esta droga (Montinaria 2019). El descubrimiento de las PGs no fue hasta 1935 donde se describió en la secreción de la glándula seminal (Euler 1935, Euler 1936, Goldblatt 1935) y años más tarde se describiría la relación que guardan los AINEs como inhibidores de la síntesis de PGs (Vane 1971, Piper & Vane 1969, Ferreira 1971). Los siguientes descubrimientos revelaron las sintetetasas, las vías metabólicas y los receptores de las PGs (Samuelsson 1975), gracias a esto se desarrollaron inhibidores más selectivos de las isoformas de las sintetetasas o ciclooxigenasas (COX) de PGs (Picot 1994, Rainsford 1999, Luong 1996, Kurumbail 1996).

Las PGs son lípidos derivados del ácido araquidónico que se procesa mediante la enzima COX1 y 2. El primer metabolito de la vía de síntesis se conoce como PGG₂, producido por cualquier COX, y luego por la misma enzima se vuelve PGH₂. Este es un metabolito importante para la vía metabólica de tromboxanos y diversas PGs (Kanehisa 2017, Narumiya 1999). Las PGs se forman en prácticamente todos los tejidos (Narumiya 1999) y dentro de las principales PGs, que se han estudiado en el SNC, se encuentra la PGE₂ y la PGD₂. La PGE₂ es sintetizada por la sintetasa de PGE, la cual se puede encontrar citosólica y microsomal membranar (mPGES) (Jia 2013). Mientras que la PGD₂ se sintetiza por su sintetasa (PGDS) la cual se libera al espacio extracelular (Hayaishi 2000).

Las PGs tienen una vida media muy corta en circulación e.g. la PGE₁ tiene una vida media de 3min en canes (Zhang Y 2013), por lo que su producción y efectos deben ser de manera local en el tejido o en el órgano (Narumiya 1999). Dentro del SNC la maquinaria para la síntesis de PGs se localiza, en el caso de mPGES, principalmente en células endoteliales, ependimales, astrocitos y pericitos de OCVs (como AP, EM, SFO, OVLT) plexo coroideo, PVN, el Área preóptica, entre otras regiones (Eskilsson 2014). En el hipotálamo medio basal, donde se encuentra la EM, existe un incremento de la producción de PGE₂ previo al estro (Ojeda 1982), indicando que las PGs son un producto fisiológico dentro del hipotálamo.

En el caso del mRNA de *PGDS* se localiza en la leptomeninges y el plexo coroideo, pero la proteína se encuentra soluble en el LCE siendo uno de los principales componentes de este, conocido también como beta traza (Hayaishi 2000).

Las PGs actúan mediante un receptor membranar tipo Receptor acoplado a proteínas G (GPCR) y señalizan a través de segundos mensajeros y transducción de señales como el AMP cíclico, calcio intracelular, MAP cinasas, entre otros (Narumiya 1999). En el caso de

la PGE los receptores (EP) se encuentran a lo largo de todo el SNC tanto en la médula espinal como en el hipotálamo (CVOs, POA, PVN, SON, ARC, etc) tallo, cortezas, tálamo, etc y se ha descrito su expresión en diferentes tipos neuronales (Narumiya 1999, Zhang 1999, Zhang 2011, Sugimoto 1994).

Dentro de sus funciones las PGs pueden inducir inflamación, dolor y fiebre; las cuales se inhiben con un AINEs, como indometacina (INDO). Sin embargo, para la respuesta febril nunca se ha sabido bien donde actúan los inhibidores, es decir, se sabe que el receptor final de las PGs se encuentra en el SNC, pero se desconoce donde se sintetizan las PGS, ya que a pesar de ser sustancias paracrinas, durante la endotoxemia inducida hay elevación sistémica de PGs (Li 2006). Por otro lado, otra de las funciones reconocidas de las PGs durante un reto inmune es el incremento de la permeabilidad de la BHE (Minami 1997, Banks 2015, Candelario-Jalil 2007).

3.3.1 INFLUENCIA DE LAS PROSTAGLANDINAS EN EL CONTROL FISIOLÓGICO Y SU RELACIÓN CON LOS ÓRGANOS CIRCUNVENTRICULARES

3.3.1.1 CONTROL REPRODUCTIVO

Las PGs producidas en el Hipotálamo Medio Basal previo al estro son necesarias para la liberación de LH y GnRH (Ojeda 1975, 1979, 1982). El trabajo de Sandrine de Seranno (2010) señala la importancia de los tanicitos de la EM en la secreción de PGE₂, los cuales se habían propuesto que podían producir localmente PGs (Rodriguez 2005). Se ha propuesto que la PGE₂ induce la retracción de las prolongaciones taniciticas de la región pericapilar de los vasos fenestrados lo cual permite a las terminales neurosecretoras de GnRH vaciar su contenido a la circulación a través de la EM. Esta hormona una vez en circulación actuará sobre la Hipófisis y liberará LH ocasionando el ritmo estral.

3.3.1.2 ESTRÉS Y RESPUESTA INMUNE

Las PGs son esenciales para la respuesta inmune (Kozak 1998, Li 2006) y debido a esto, los retos inmunes denotan posibles implicaciones de las PGs sobre la fisiología. La respuesta inmune es específica ante un estresor asociado a patógenos como el LPS. Esta respuesta incluye la liberación temprana de citocinas y de forma tardía la respuesta febril, la pérdida del apetito, la pérdida de peso, comportamiento de enfermedad, entre otros (Dantzer 1998 a, b, Knoll 2017). Particularmente, se conoce de las modificaciones que sufre un OCV, el OVLT, durante un reto inmune. El OVLT detecta citocinas proinflamatorias y produce PGs promoviendo la activación del PVN, vía PGs, y la liberación de CRH-ACTH (Katsuura 1990). La liberación de ACTH es parte de la respuesta ante el estrés por lo que los mecanismos aquí descritos probablemente sean comunes para otros estresores.

Los trabajos de De Seranno (2010) y Katsuura (1990) demuestran la importancia de las PGs en la fisiología de algunos OCVs, sin embargo representan los únicos estudios que hacen esta relación. Por otro lado, situaciones emergentes que requieren de la retroalimentación de sistemas sensoriales, ayuno, requieren de un incremento de la permeabilidad de los OCVs. Un modelo que induce cambios de la permeabilidad de algunos OCVs (OVLT y SFO) es el “salt loading” o reto con sal (Morita 2013a). Sin embargo, en este trabajo se propuso que la angiogénesis en los OCVs era responsable de este fenómeno, y no se evaluó el papel de otros factores rápidos y locales como las PGs, NO o VEGF. Además, en el caso de la osmoregulación los modelos con desbalances en este sistema muestran el requerimiento de PGs para la integración de las respuestas. Es por esto que a continuación se hablará del posible rol de las PGs sobre la LT y sobre la osmoregulación.

3.3.2 OSMOREGULACIÓN: FISIOLOGÍA RENAL Y NATRIURESIS

La osmoregulación es un proceso que requiere el control hipotálmico y donde se han visto involucrados dos OCVs, el OVLT y el SFO. Por otro lado, fuera del SNC el riñón es central tanto para la retroalimentación como en las respuestas contraregulatoras, ya que

es el principal órgano efector. Las PGs pueden afectar tanto la integración de la información a nivel del hipotálamo como a nivel de la fisiología de los órganos efectores, como el riñón. En el caso del riñón existe gran expresión de los receptores y sintetasa de PGE (Li 2017, Olesen 2013, Handler 1981). La PGE es la más estudiada (Handler 1981) y de la cual se conoce su efecto diurético sobre el epitelio de la vejiga y de la nefrona.

La hormona antidiurética por excelencia es la vasopresina (AVP, de la cual se ha hablado en la sección 2.3) la cual modifica al endotelio de la nefrona induciendo un incremento en la absorción de agua. Este efecto lo realiza mediante el incremento de AQP2 (canal selectivo de agua) en la membrana apical del epitelio, lo cual incrementa su permeabilidad al agua (Olesen 2013). La PGE2 inhibe este efecto (Parnova et al 1997) y se ha propuesto que lo hace mediante segundos mensajeros y la activación de receptores (EP1 y 3) cuyo efecto es el opuesto a la AVP (Olesen 2013). Sin embargo, este fenómeno aún es controversial ya que la nefrona expresa receptores de PGE (EP2 y 4) que tienen el mismo mecanismo de transducción que AVP (Olesen 2013). Aunado a esto, estos estudios se realizan *ex vivo*, por lo que el efecto fisiológico *in vivo* de las PGs no suele ser el mismo y se ha observado que la infusión i.c.v en el SNC de PGE2 produce un efecto antidiurético similar a AVP i.v. (Hoffman 1979), esto es, el efecto opuesto al reportado *ex vivo*. Se propone que el efecto antidiurético de la PGE2 i.c.v. se debe a la liberación de AVP (Hoffman 1979).

Por otra parte, durante la deshidratación es necesario evitar la pérdida de líquidos pero más importante mantener la osmolaridad sanguínea, la cantidad de iones, por lo que también se requiere de la natriuresis para concentrar la orina y evitar mayor pérdida de agua. Ahora bien, la PGE también se requiere para esta respuesta, ya que un KO de la PGE sintetasa es incapaz de producir la respuesta de natriuresis (Jia 2013). Sin embargo el papel de las PGs se desconoce si es central o en el riñón ya que el KO no es tejido específico.

Esto señala aun una gran escasez de estudios para denotar la relación que guardan las PGs con la integración de información durante un desbalance osmótico. Igualmente, del trabajo de Morita 2013a se observa que existe un cambio en la permeabilidad del OVLT y del SFO debido a un desbalance osmótico, pero se desconoce como se regula y si este fenómeno es necesario para suscitar alguna de las respuestas como la sed, reabsorción, natriuresis o liberación de AVP.

3.4 CONTROL HIPOTÁLAMICO DE LA TEMPERATURA POR NÚCLEOS ASOCIADOS A UN ÓRGANO CIRCUNVENTRICUAL

La temperatura corporal de mamíferos refleja, en parte, el gasto energético y su organización se adapta a diversas condiciones adversas por lo que la retroalimentación al SNC es sumamente importante. Como todos los ritmos circadianos su organización depende del NSQ (Refinetti R 1995). La información energética, como la glucemia, es sumamente importante para este sistema, es así que al estar en condiciones de ayuno se modifica el ritmo de temperatura teniendo una menor temperatura en la fase de reposo (Liu 2002), esta respuesta se cree que es adaptativa y permite optimizar el gasto energético en condiciones de escasez de nutrientes. Igualmente la retroalimentación de la temperatura ambiental es importante, temperaturas altas producen respuestas de perdida de calor y temperaturas frías las respuestas opuesta (Nakamura 2011). Estas señales, glucemia y temperatura ambiental, se deben integrar para dar una respuesta óptima, en condiciones de ayuno y temperaturas frescas (22°C), para reducir el gasto energético y optimizar las reservas energéticas (Krall 2010).

Por esto, los diversos sistemas sensoriales son esenciales para organizar la temperatura conforme a las distintas situaciones a las que los mamíferos se enfrentan. La información que ellos procesan llega al hipotálamo donde se reorganiza y se integra con la distinta información de los distintos sistemas sensoriales. Uno de los centros

de integración sensorial es el MnPO el cual integra información de: temperatura ambiental, metabólica y osmótica (McKinley 2015). Es interesante en este aspecto que el MnPO tiene neuronas que se encargan de inducir la sed y disminuir la temperatura (Abbott 2017) lo cual sería coherente con una respuesta adaptativa a ambientes cálidos, promoviendo la pérdida de calor pero previniendo la pérdida de líquidos y el desbalance osmolar. Además, se requiere de la retroalimentación al reloj central, NSQ, para modificar la organización de los ritmos como es el caso del ayuno (Liu 2002).

La temperatura en mamíferos se regula mediante diferentes mecanismos como la vasoconstricción o vasodilatación cutánea para evitar o promover la pérdida de calor, respectivamente, y la quema de lípidos en el tejido adiposo pardo (BAT), que difiere del tejido adiposo blanco ya que su principal función es la termogénesis y no el almacenamiento de lípidos, entre otros mecanismos. Estas dos funciones se promueven a través del SNA y su rama simpática, localizada en la columna intermedio lateral de la médula espinal desde T1 a L2. Estas respuestas son reguladas por distintos núcleos en el tallo cerebral y en el hipotálamo, los cuales reciben aferencias del asta dorsal que a su vez recibe información sensorial de termorreceptores cutáneos (Tansey 2015, Nakamura 2011). Igualmente, el SNC tiene termorreceptores en la región preóptica (Nakamura 2011).

3.4.1 NÚCLEO MEDIANO PREÓPTICO, ÁREA PREÓPTICA

El MnPO ha sido central en el estudio de la termoregulación desde estudios realizados por Hasana en 1929, en los que observó que al aplicar calor debajo de la región preóptica estimulaba el sudor de la pata de los gatos. Desde entonces se ha descubierto que hay neuronas termosensibles en el MnPO, que además reciben aferencias indirectas de termorreceptores cutáneos a través de la médula espinal y que sus eferencias modifican respuestas como el *temblor* (shivering), activación o inhibición del BAT, vasodilatación o vasoconstricción cutánea, e incremento o disminución del ritmo cardíaco (Nakamura 2011, Tansey 2015, Leib 2017, McKinley 2015).

Para realizar estas funciones el MnPO manda sus principales eferencias hacia al núcleo preóptico medio (MPO) y al PVN. La activación del MPO por el MnPO promueve una inhibición tónica del Hipotálamo Dorso Medial (DMH) y del núcleo del Rafe rostral pallidus (rRPa) en el tallo cerebral, el cual es el principal núcleo de salida premotor para neuronas simpáticas preganglionares en la médula

B

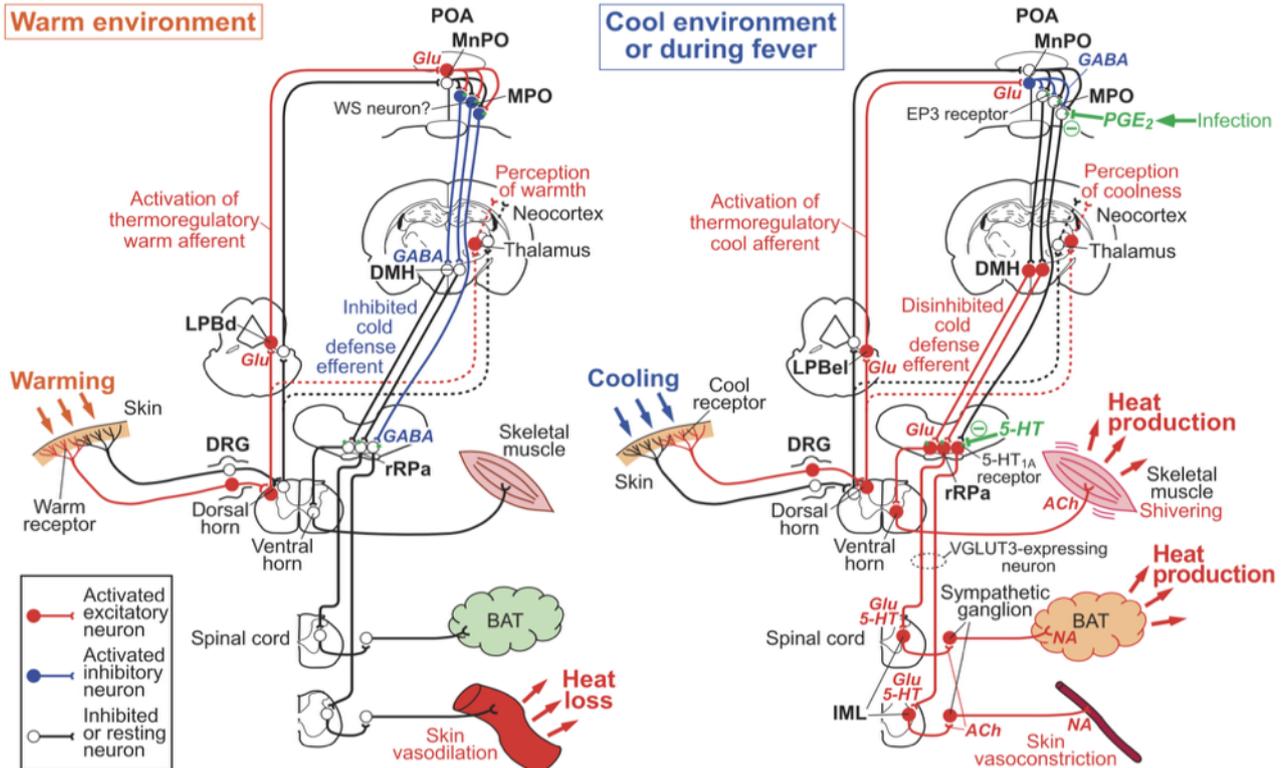


Figura Introducción 3. Esquema del circuito neuronal propuesto que se encarga modificar la termogénesis del BAT y la vasodilatación o vasoconstricción arterial en ambientes fríos o cálidos. (modificado de Nakamura 2011).

espinal que se encargan de la vasoconstricción cutánea y termogénesis del BAT (Tanaka 2009, McKinley 2015, Nakamura 2011), por lo tanto la inhibición del rRPa promueve la vasodilatación y la inhibición de la termogénesis. La inhibición del MPO por el MnPO promueve la activación del rRPa y del DMH lo cual promueve que se

activen las neuronas simpáticas de la médula espinal y se induzca la termogénesis del BAT y la vasoconstricción cutánea.

Estas respuestas se pueden iniciar cuando la información sensorial asciende desde termorreceptores cutáneos a través de un relevo en el asta dorsal o en el núcleo trigémino y llegan al núcleo Parabraquial en el tallo cerebral. Del núcleo Parabraquial llega al MnPO y de aquí se inician las respuestas antes descritas. Información de un ambiente cálido induce respuestas de pérdida de calor, vasodilatación e inhibición de termogénesis, e información de un ambiente frío activa la termogénesis y la vasoconstricción (Nakamura 2011).

El MnPO también parece ser esencial en la inducción de fiebre por un reto inmune (Mckinley 2015 y Nakamura 2011). El mecanismo propuesto es mediante las PGs su receptor EP3, el cual se expresa altamente en la región Preóptica (Nakamura 1999). Este receptor promueve la inhibición del MPO lo cual promueve la activación del DMH y del rRPa terminando en la inducción de fiebre por los mecanismos antes descritos.

3.4.2 INFLUENCIA METABÓLICA Y PAPEL DEL ARC SOBRE EL CONTROL CIRCADIANO DE LA TEMPERATURA

El ARC es un núcleo bilateral caudal al NSQ y tiene una localización privilegiada ya que se encuentra adyacente a la EM. La señal del ARC es esencial para regular el gasto energético ya que es un sensor de hormonas y niveles de glucosa circulantes (Shi 2013, Bell 2017, Xu 2018). La principal función del ARC se relaciona con la regulación de la ingesta de alimentos ya que contiene neuronas que promueven la orexia (ingesta de alimentos) y la anorexia (la no ingesta de alimentos), sin embargo también se encarga de regular los niveles metabólicos, las reservas de energía y el gasto energético.

El ARC igualmente se ha relacionado con el control de la temperatura gracias a estudios realizados en el laboratorio donde infusiones de los péptidos específicos de este núcleo en el MnPO provocan un

incremento de la temperatura (Guzman-Ruiz 2015). Anteriormente se ha mencionado la importancia de la interacción entre el NSQ y el ARC necesario para el control circadiano (Buijs 2016, Buijs 2017) y para la termoregulación esta interacción se da en el MnPO, el cual recibe inervación vasopresinérgica del NSQ y anorexigénica (aMSH) del ARC (Guzman-Ruiz 2015). Gracias a estos estudios se propuso la participación del NSQ y el ARC en el control circadiano de la temperatura, el cual es necesario principalmente en la segunda mitad de la fase de actividad, donde el tiene su mayor actividad neuronal (Guzman-Ruiz 2014).

Interesantemente, el control circadiano de la temperatura también requiere de PGs (Scales 1987) ya que con INDO se induce una hipotermia en la fase de actividad. Esta respuesta se cree que esta mediada por PGE por sus efectos pirogénicos. Sin embargo KO de EP1 o EP3, el receptor de PGE que se expresa fuertemente en el MnPO necesario para la inducción de fiebre (Lazarus 2007, Oka 2004, 2000), no presentan problemas para el control circadiano de la temperatura (Oka 2003). Por lo que restarían los receptores EP2 y 4 o otra PG con efectos termogénicos. De entre los receptores EP, EP2 es el único que se expresa en el ARC (Zhang 1999).

3.5 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La evidencia aquí mostrada y particularmente de los trabajos de De Seranno (2004), (2010) y de Katsuura (1990) queda claro que las PGs pueden modificar la fisiología de los OCVs, particularmente de la EM y del OVLT en su función como órganos secretores y en su actividad neuronal. Sin embargo, ninguno evaluó la permeabilidad, la principal característica de la función sensorial de los OCVs. Los trabajos de Langlet (2013a) y Morita (2013a) demuestran que puede haber un incremento en la permeabilidad del complejo ARC-EM debido a la hipoglucemia o del SFO y del OVLT debido a una osmolaridad alta, respectivamente. Por otro lado, en el trabajo de Rodriguez (2017) se observaron cambios circadianos en la permeabilidad de los OCVs, teniendo la mayor permeabilidad en ZT2.

Sabiendo que las PGs pueden: modificar la permeabilidad de los tejidos vía regulación de las proteínas de barrera o vasodilatación, ser producidas por los OCVs y modificar la temperatura vía el SNC, función regulada circadianamente por el ARC-EM; se probó si las PGs eran necesarias para generar el ritmo circadiano de permeabilidad de los OCVs y si se relacionaba con su función del control circadiano de la temperatura. Igualmente, se probó que si durante un reto osmótico se requiere un incremento de la permeabilidad del OVLT y del SFO, indagar si las PGs se necesitaban para inducir el incremento de la permeabilidad y suscitar respuestas reguladas por estos OCVs, como la ingesta de agua.

4. PREGUNTA

¿Se requiere de la síntesis de PGs para los cambios circadianos de permeabilidad de los OCVs? Si es así, ¿cual es el papel de estos cambios asociados a las PGs en la regulación fisiológica de la temperatura?

En una segunda etapa ¿se requieren las PGs durante un reto con sal para inducir sed? Si se requieren, ¿las PGs son necesarias para los cambios de permeabilidad del OVLT y del SFO, los cuales incrementan su permeabilidad durante un reto con sal?

5. HIPÓTESIS

Si la variación en la permeabilidad de los OCVs depende de la producción circadiana de PGs, un inhibidor de la síntesis de PGs, AINEs, revertirá los cambios circadianos de permeabilidad.

Si algún OCVs es importante para la organización de la temperatura y requiere de PGs para mantener su permeabilidad circadiana, luego entonces un AINEs afectará el control de la temperatura vía el OCV.

Igualmente, si en un desbalance por un reto con sal se requiere de los cambios de permeabilidad del SFO y OVLT, las PGs se requerirán para modificar la permeabilidad y sostener respuestas como la sed.

6. OBJETIVO

Observar si INDO revierte los cambios circadianos de permeabilidad de los OCV entre ZT2 y ZT11.

Investigar si los cambios de permeabilidad en algún OCV sumando al efecto criogénico inducidos por la administración de INDO señalan la función de la permeabilidad sobre el control de la temperatura corporal.

Por otro lado, observar en el modelo de reto con sal si INDO puede evitar la inducción de la sed y las modificaciones de la permeabilidad del OVLT o del SFO.

7. MÉTODO

7.1 ANIMALES

Ratas macho Wistar de entre 240 a 320g se albergaron individualmente en cajas de acrílico con alimento y agua ad libitum, teniendo un ciclo de luz:oscuridad 12:12. Los animales se obtuvieron del bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM.

Los experimentos fueron aprobados según el Comité de Ética del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, con acuerdo en la Regulación Federal para el Manejo y Cuidado de Animales (NOM-062- ZOO-1999).

7.2 CIRUGÍA

CANULACIÓN DE VENA YUGULAR E IMPLANTACIÓN DE BOTONES DE TEMPERATURA

Se anestesió a los animales con una mezcla 2:1 de Ketamina (Anesket, PiSA, Mexico, 50 mg/kg) - Xilacina (Procin, PiSA, México, 8mg/kg) vía intramuscular.

Se implantó una cánula de silicon (0.025in de diámetro interno X 0.047in de diámetro externo X 10 cm de largo, Intech, USA) en la vena yugular derecha, la punta de la cánula se introdujo 3.5cm pretendiendo llegar al atrio derecho del corazón. El resto de la cánula se exteriorizó entre las escápulas y el cuello subcutáneamente con un punzocat 14G. Se llenó la cánula con una mezcla para cánula 7:1:1 de Glicerol (J. T. Baker, USA) - Heparina (PiSA, USA) - Antibiótico (Amphotericin B, Penicillin, Streptomycin; GIBCO, USA). Se colocó un botón de temperatura en la cavidad intraperitoneal. Se dejó en recuperación a los animales entre 5 a 7 días.

Se colocó un chaleco hecho a base de cuero para mantener inmóvil la cánula y para que durante el día experimental se pudiera administrar sustancias de forma remota. El chaleco únicamente se utilizó en los experimentos de ZT2, ZT11, ZT22 controles y ZT2 y

ZT11 INDO; para los experimentos con el reto con sal los animales fueron manipulados. Por lo menos 12 horas antes del experimento los animales se cambiaron de caja y se conectó su cánula con una extensión de tubo lleno de mezcla para cánula, esta extensión era de más de 40 cm de largo por lo cual de forma remota se podía infundir sustancias.

7.3 EVALUACIÓN DE LA PERMEABILIDAD CON AZUL DE EVANS Y PERFUSIÓN

El día experimental se preparó una mezcla de Azul de Evans (EB) al 5% en solución salina estéril (0.9%). Se administró i.v. azul de Evans en un volumen de 1mL/kg y 5 minutos después se sacrificó al animal con una sobredosis (0.7mL/Kg) i.v. de Pentobarbital (Pisabental, PiSA, USA).

Se perfundió al animal inmediatamente con 200 mL de 4% Paraformaldehído con buffer de fosfatos (PFA, 0.1M pH 7.2). Se extrajo los cerebros y se post fijaron por máximo 48 horas en PFA 4% y 24 horas en 30% sacarosa en PBS 0.1M para crioproteger. Igualmente se extrajo los botones de temperatura de la cavidad peritoneal.

Se obtuvieron secciones coronales de 30 μ m de OVLT, SFO y EM con un criostato (Cryostat CM2850, Lupetec) a -28°C y se colocaron directamente sobre portaobjetos. El mismo día se observaron en un microscopio confocal (Microscopio Confocal Nikon A1R+ STORM) y se tomaron fotos de los OCVs. Para todas las secciones se utilizaron los mismos ajustes.

Se analizó las imágenes usando el programa FIJI (Schindelin, J. et al. 2012) y se tomaron las mismas regiones de interés (ROIs) para cada animal de ARC, EM, OVLT, SFO. Se utilizó el promedio del valor de grises, densidad óptica, como representante de la permeabilidad de cada OCVs.

7.4 INMUNOHISTOQUÍMICA CONTRA C-FOS

Se obtuvieron secciones de OVLT, del Área Preóptica (MnPO), SFO, SON - PVN (por lo menos 3 secciones del SON-PVN y SFO, 2 del MnPO y OVLT) y se mantuvieron en 0.1 PBS en refrigeración. Se tomaron las secciones y se lavaron con 0.1 PBS y se prosiguió a bloquear en solución de bloqueo (0.1% fracción V de albumina bovina, 0.2% triton X-100 en 0.1 M PBS) por 1 hora a TA. Se cambió a una solución con el anticuerpo primario rabbit anti-c-Fos (1:2000 Merckmillipore, policlonal) diluido en solución de bloqueo y se dejó en flotación a 4°C toda la noche. Se lavaron las muestras y se incubó con el anticuerpo secundario donkey anti-rabbit (1:500, Jackson ImmunoResearch) por 2 horas a TA; se volvieron a lavar y se incubaron con el complejo Avidina-Biotina (1:500; Vector Laboratories) por 1 hora a TA. Se lavaron y se reveló con 0.01% de diaminobenzidina (DAB), 0.05% de sulfato de amonio y níquel, y 0.01% peróxido de hidrógeno en TBS 0.1 M por 8–10 min. Se lavaron y se montaron las secciones en portaobjetos gelatinizados, se dejaron secar por una noche. Las laminillas se deshidrataron con un tren de alcoholes, se aclararon con Xileno y se cubrieron con Entellan. Se realizó el conteo de células c-fos+ mediante el programa FIJI (Schindelin, J et al 2012).

7.5 ANÁLISIS DE TEMPERATURA

Se calibró a los botones de temperatura para tomar medidas cada 5 minutos para experimentos agudos (Exp 1) o cada 15 minutos para experimentos crónicos (Exp 2). Para tomar la Temperatura Relativa se tomaron tres días antes del día experimental como línea base (LB), se tomó el promedio de estos tres días y se sacó la diferencia entre la temperatura experimental y la promedio ponderando con correspondiente ZT ($\text{Temp Relativa ZTx } t_1 = \text{Temp Exp ZTx } t_1 - \text{Temp Prom LB ZTx } t_1$). Se tomó el Área Bajo la Curva (AUC) una hora antes de la infusión de INDO o VEH y la hora después de INDO o VEH.

7.6 EXPERIMENTO 1: INVESTIGAR SI LOS CAMBIOS DE PERMEABILIDAD CIRCADIANOS SON INDUCIDOS POR PROSTAGLANDINAS

Para este experimento se utilizaron 18 animales a los cuales se les implantó una cánula y un botón de temperatura. Se dividieron en dos grupos donde el grupo experimental recibió una administración remota i.v. de INDO y el control una administración remota i.v. de Vehículo una hora antes de ZT2 o ZT11. El día del experimento se preparó INDO en una dosis de 10mg/kg en 1:9 de Na₂CO₃ 0.1M – PBS 0.1M pH 7.2 o Vehículo con la mezcla 1:9 de Na₂CO₃ 0.1M – PBS 0.1M. Dada la hora se administró remotamente EB i.v. en ZT2 o Zt11 y 5 minutos después se sacrificaron a los animales.

Se utilizaron 5 animales para observar el efecto tardío de la INDO reportado por W. Scales 1987 a los cuales se les administró i.v. INDO en ZT11 y se observó su temperatura hasta 72 horas después.

7.7 EXPERIMENTO 2: MODELO DE CAMBIOS DE PERMEABILIDAD DE LOS ÓRGANOS CIRCUNVENTRICULARES INDUCIDA POR CONSUMO ELEVADO DE SODIO EN EL AGUA

Se utilizaron 3 animales a los cuales se les implantó una cánula y un botón de temperatura. Antes de la cirugía y después de la cirugía se tomó el consumo de agua, línea base (LB), el cual se restableció a los 5 días post cirugía. Dado estos 5 días reposo se les cambió el agua potable por agua al 2% de NaCl por 6 días, se midió el consumo de agua cada día por la mañana. Durante ZT2 del sexto día, se manipuló a los animales y se les administró EB y 5 minutos después se sacrificaron a los animales.

Dado los resultados de temperatura de estos animales (F3 K), se modificó la solución bebible por una que contuviera 5% de sacarosa y 2% de NaCl. Se utilizaron 2 animales y se procedió como en el experimento anterior, se observó su consumo diario de agua, comida y peso. Se tomó la temperatura de otros 4 animales en los primeros 2 días del reto con sal + sacarosa para observar si presentaban la misma deficiencia en la temperatura.

7.8 EXPERIMENTO 3: INVESTIGAR SI LOS CAMBIOS DE PERMEABILIDAD DE LOS ÓRGANOS CIRCUNVENTRICULARES DEBIDO A UN CONSUMO ELEVADO DE SODIO EN EL AGUA SON INDUCIDOS POR LA PRODUCCIÓN DE PROSTAGLANDINAS

Para este experimento se tomaron 15 animales y se les implantó una cánula. Se dividieron en experimentos realizados en ZT11 y ZT19-ZT22. En los experimentos realizados en ZT11 se les dio el reto con sal y sacarosa y al tercer día (D3) una hora antes de ZT11 se les administró i.v. INDO o VEH. Dado la hora se les administró EB i.v. y se sacrificaron 5 minutos después. Para los experimentos realizados en ZT19-22 igualmente se les dio el reto con sal y sacarosa, y al D3 en ZT11 se les administró i.v. INDO o VEH. A partir de ZT19 se les administró i.v. EB y se sacrificaron 5 minutos después. A todos los animales se les midió su peso, el consumo de alimento y el consumo de agua diario por la mañana. Adicionalmente se realizaron controles sin el reto con sal, sacrificados en ZT22 con la administración i.v. remota de EB.

7.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los valores se muestran como promedio \pm SEM. La permeabilidad de los OCVs en ZT2, ZT11 se comparó con una ANOVA de dos vías con post hoc de Bonferroni entre INDO y VEH (Fig 1 A y D). En AUC de la temperatura relativa se comparó con una ANOVA de dos vías de medidas repetidas con un post hoc de Bonferroni entre Antes y Después (Fig 1 E2). Se usó una t de Student para ZT2 con el reto con sal (Fig 3 C y D). Se utilizó una ANOVA de una vía con medidas repetidas con un post hoc de Tukey para el consumo de agua durante el reto con sal con INDO ip (Fig 5 A). Una ANOVA de dos vías con medidas repetidas con un post hoc de Bonferroni entre VEH e INDO para el consumo de agua durante el reto con sal con preconditionamiento (Fig 5 B). Se utilizó una ANOVA de una vía con un post hoc de Tukey para las comparaciones entre Control, Reto con sal + Sacarosa VEH e INDO en ZT11 y ZT19-22 (Fig 6 A, D, G). Todos los analisis fueron realizados en Prism 6.01 Software, GraphPad.

8. RESULTADOS

8.1 EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE PROSTAGLANDINAS ENDÓGENAS SOBRE LOS CAMBIOS CIRCADIANOS DE PERMEABILIDAD DE LOS ÓRGANOS CIRCUNVENTRICULARES. CORRELACIÓN CON LA TEMPERATURA

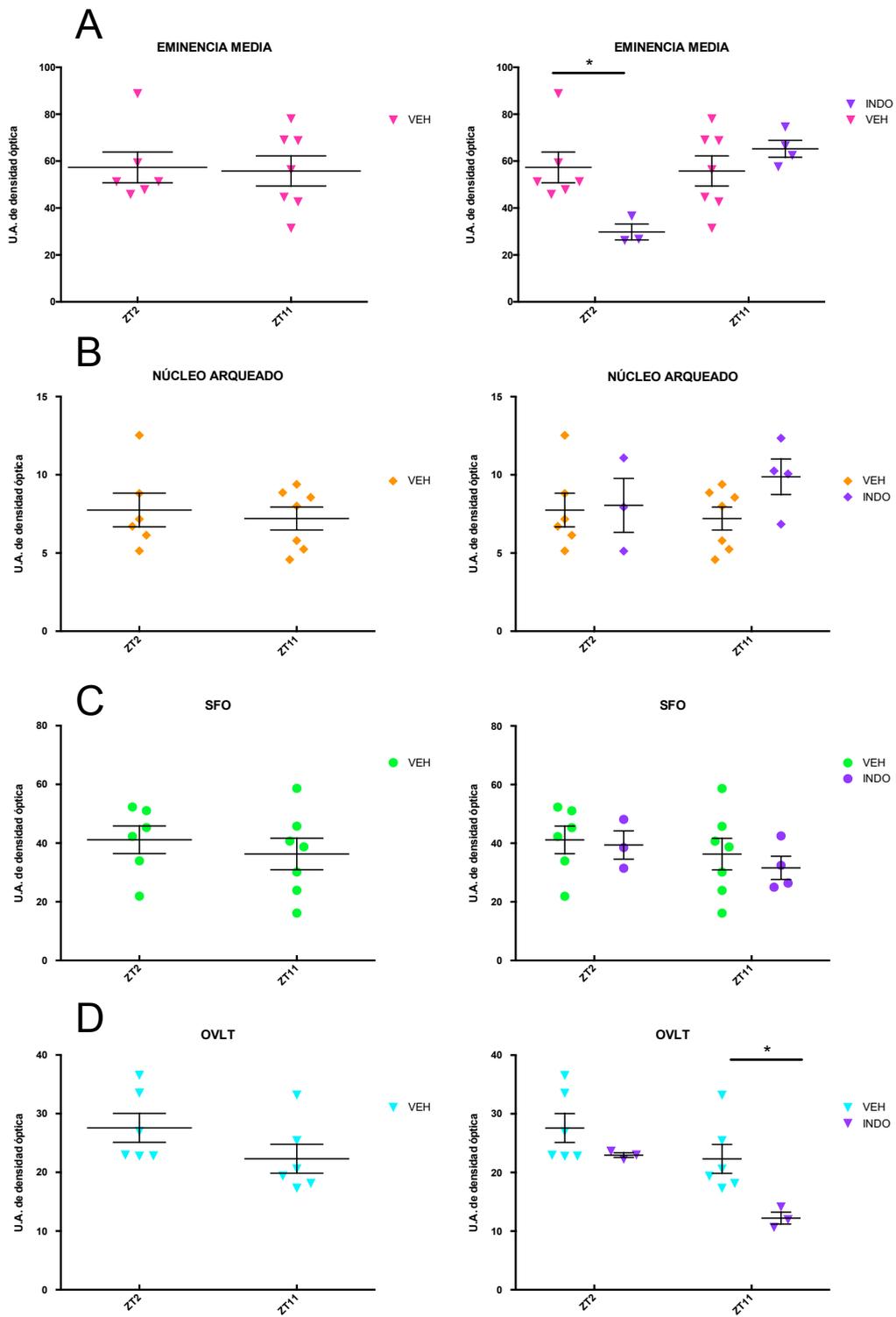
Inicialmente, para observar si la producción de PGs era necesaria para suscitar los cambios circadianos en la permeabilidad (Rodríguez 2017) se realizaron los experimentos en ZT2 y ZT11, los ZT con la mayor diferencia reportados: alta permeabilidad y baja permeabilidad, respectivamente. Estos dos ZT eran los que presentaban la mayor diferencia hasta antes de los resultados que se observaron en esta tesis (Rodríguez 2017). Una hora antes del correspondiente ZT se les administró INDO y para evitar que otros factores como el estrés debido a la manipulación evocará cambios en la permeabilidad, se utilizó una cánula remota.

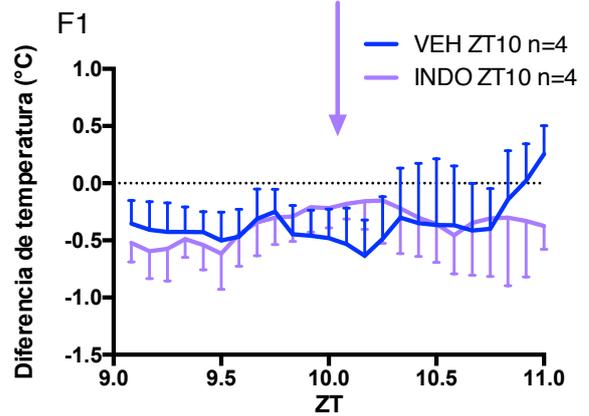
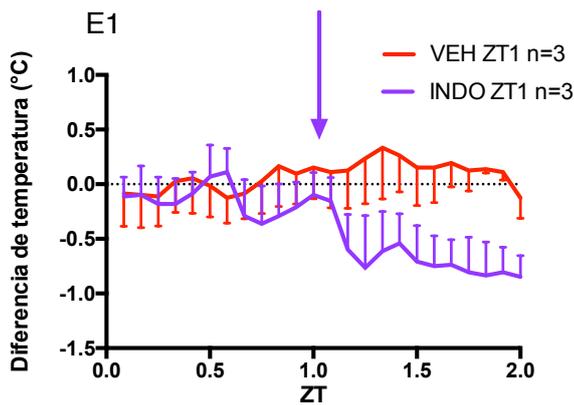
En la Figura 1 A, B, C y D se observa la permeabilidad de la EM, del ARC, OVLT y SFO, respectivamente. Del lado izquierdo se observa la permeabilidad en animales controles con la cánula remota y se puede observar que la diferencia circadiana en los OCVs entre ZT11 y ZT2 ya no se replicó. Se propone que el método afectó drásticamente la permeabilidad de los OCVs, en este caso se utilizó una cánula remota, por lo que en ningún momento se manipularon los animales, mientras que en el caso de Rodríguez 2017 los animales fueron manipulados durante la inyección de EB, por lo que los cambios observados se deben a un efecto que ocurre dentro de 5 minutos. Estos resultados demuestran que de forma fisiológica no existen diferencias en la permeabilidad entre ZT2 y ZT11, igualmente señalan que el estrés modifica rápidamente esta variable.

Sin embargo, a pesar de no tener una permeabilidad circadiana la administración de INDO si tuvo un efecto circadiano sobre la permeabilidad de la EM en ZT2 y del OVLT en ZT11, en ambos casos

se indujo una disminución de la permeabilidad (Fig 1 A y D lado derecho). Interesantemente, existe una disminución de la temperatura que comienza a ser evidente después de los 10 min de la administración de INDO ZT2, se puede apreciar mejor con el Área bajo la curva (AUC) de ZT2 después de INDO (Fig 1 E2). Esto señala una correlación entre la permeabilidad de la EM con los cambios de temperatura, indicando que a menor permeabilidad de la EM-ARC hay un decremento de la temperatura.

Por otro lado, en ZT11 se puede observar una tendencia a un decremento de temperatura después de la hora. Por lo que para poder observar si INDO tiene un efecto tardío sobre la temperatura en ZT11 se administró INDO en ZT11 y se sacrificó a los animales hasta 72 horas después (Fig 2). No se encontró un decremento de temperatura pasado la hora de la administración de INDO. Sin embargo, se encontró un decremento de la temperatura después de 9 horas post INDO. Este decremento de la temperatura se encuentra desde ZT18 hasta ZT5 del otro día similar a lo reportado por W. Scales 1987.





E2

F2

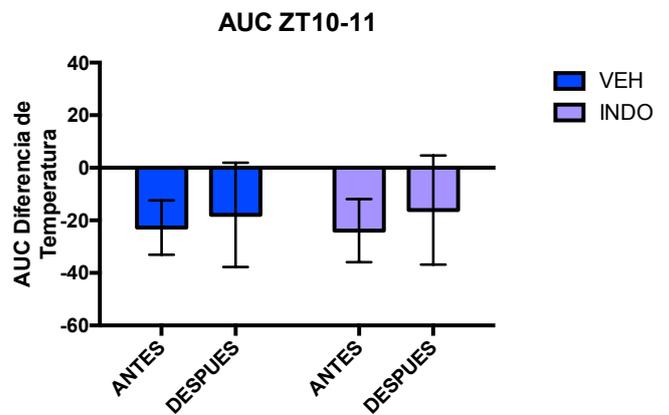
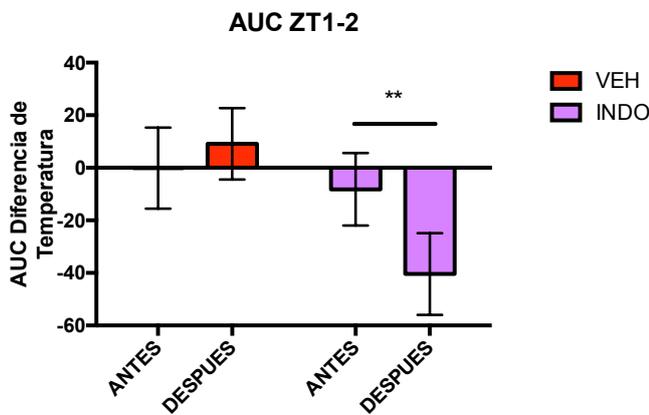


Figura 1. Efecto de INDO sobre la permeabilidad de la EM, ARC, SFO y OVLT (A,B,C,D); del lado izquierdo se observan solo los animales vehículo y del lado izquierdo los animales vehículo junto con los INDO. **A**, la ANOVA de dos vías arroja una $p=0.0143$ en la interacción y $p=0.0227$ en el ZT. **B**, $p=0.0078$ en el ZT y $p=0.0127$ en el tratamiento. VEH ZT1 $n=6$; INDO ZT1 $n=3$; VEH ZT10 $n=6$; INDO ZT10 $n=4$. En la figura E1 y F1 se observa la diferencia de temperatura de animales VEH e INDO en ZT2 y ZT11 respectivamente. En E2 y F2 es el AUC de la temperatura antes y después del tratamiento con INDO, en **E2** la ANOVA de dos vías de medidas repetidas arroja una $p=0.0051$ en interacción y $p=0.0368$ en ZT. VEH ZT1 $n=3$; INDO ZT1 $n=3$; VEH ZT10 $n=4$; INDO ZT10 $n=4$.

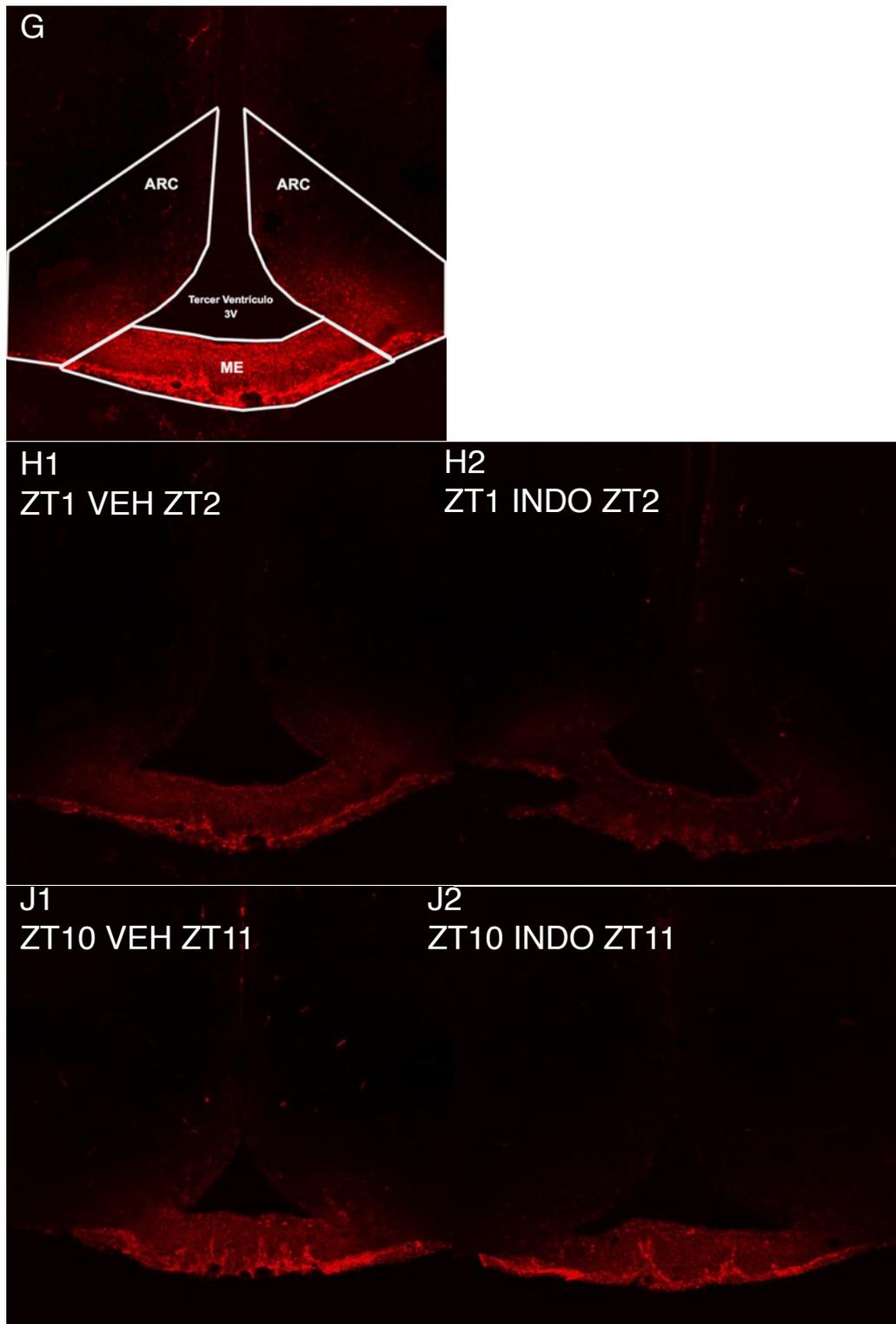


Figura 1. Imágenes representativas de la tinción con EB del ARC-EM. G, muestra las regiones de interés que se analizaron para ARC y EM, la imagen ha sido modificada incrementando el contraste para resaltar la penetración de EB hacia el ARC. H1, muestra la permeabilidad de EB en ZT2 mientras que H2, muestra un drástico decremento de la permeabilidad de la EM con la administración de INDO. J1, muestra la permeabilidad en ZT11 y J2, muestra la permeabilidad con INDO, no se percibe

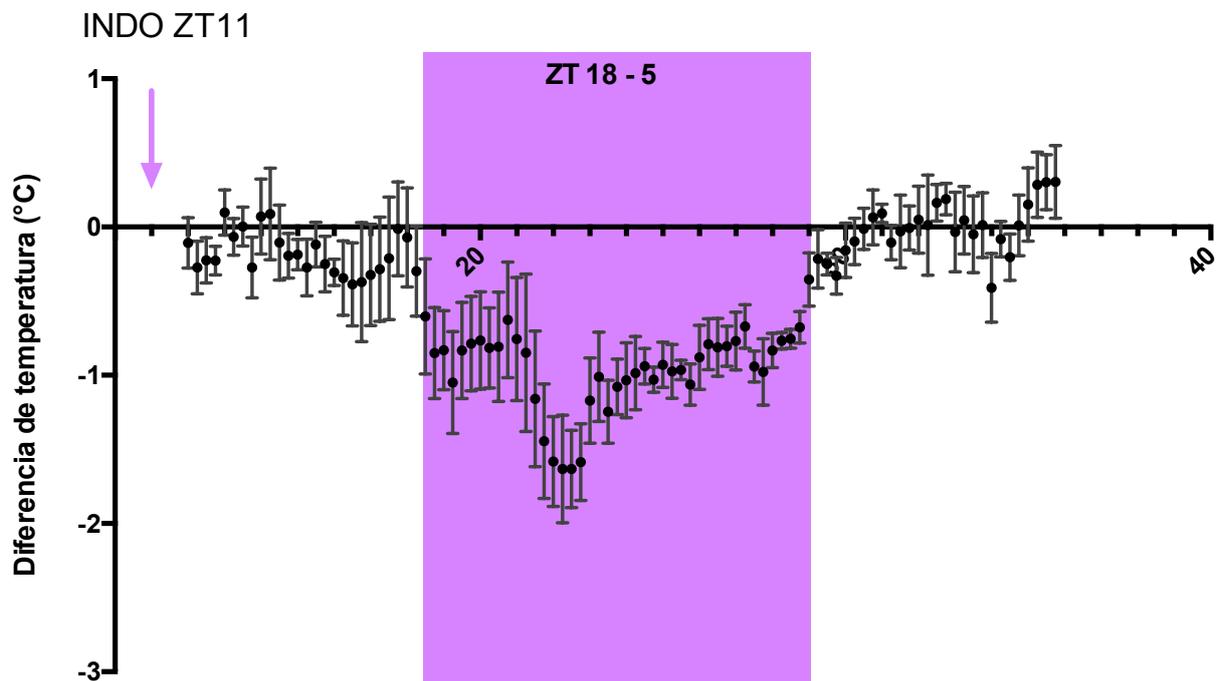
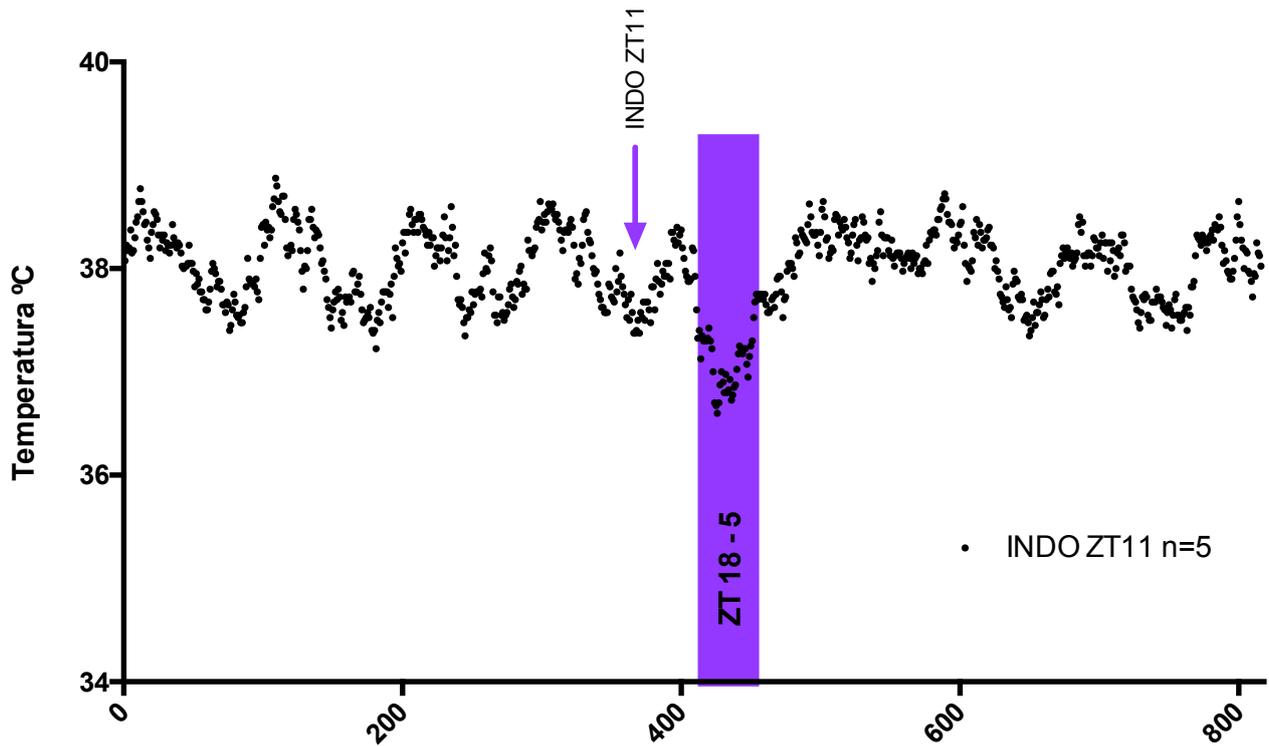


Figura 2. Efecto tardío de INDO en ZT11 sobre la temperatura. Arriba se observa la diferencia de temperatura, se observa un efecto criogénico desde ZT18 hasta ZT5. Abajo es la temperatura y la recuperación del ritmo 48hrs después. INDO ZT11 n=5.

8.2 MODELO DE CONSUMO ELEVADO DE SAL: INDUCCIÓN DE SED, ACTIVIDAD NEURONAL Y CAMBIOS EN LA PERMEABILIDAD DE LOS ÓRGANOS CIRCUNVENTRICULARES

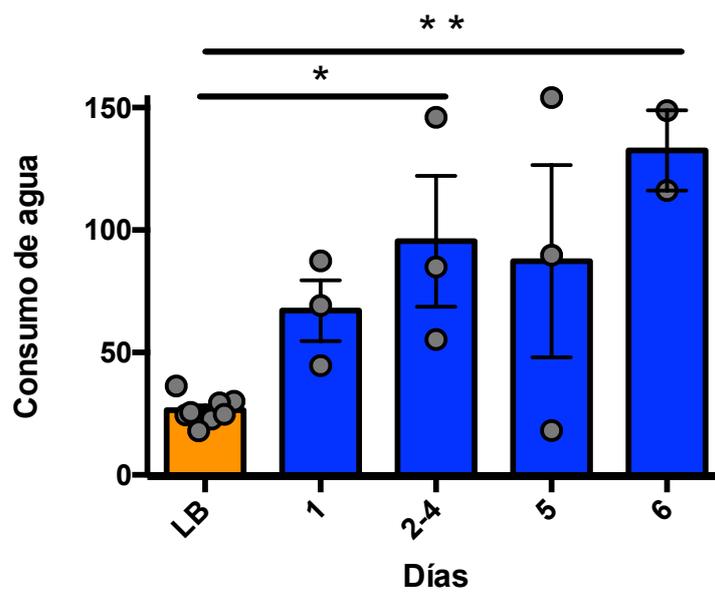
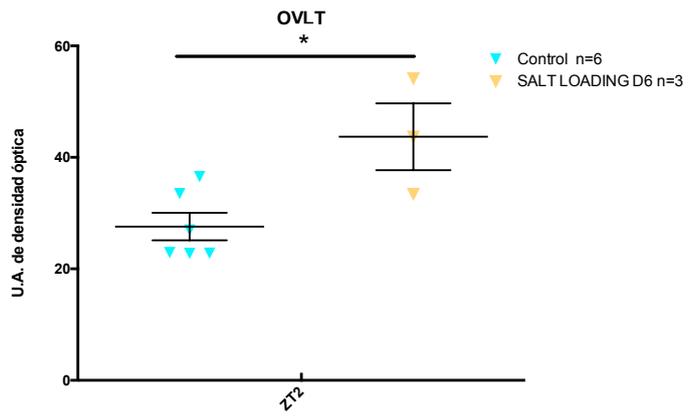
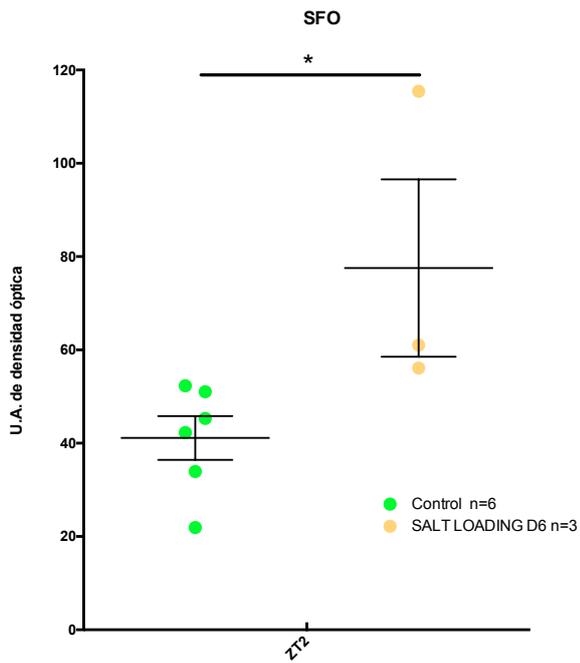
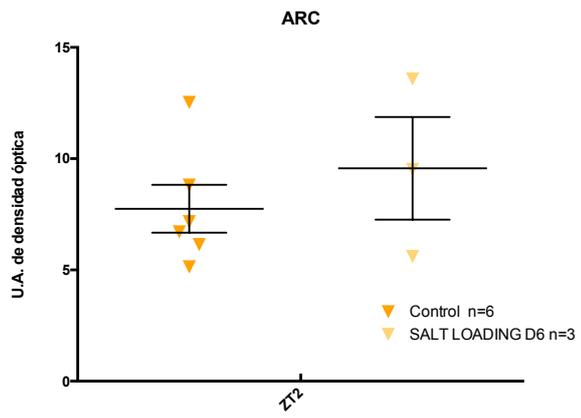
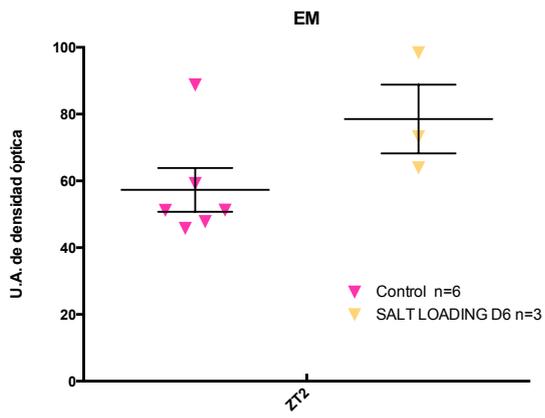
Existen modelos en los cuales se han encontrado cambios en la permeabilidad de los OCVs, sin embargo la explicación a estos cambios se ha relacionado con la modificación de la arquitectura del endotelio, debido al incremento de factores de crecimiento endoteliales que culminan en la angiogenesis (Langlet 2013a y Morita 2013a). Estos procesos suelen tardar horas o hasta días por lo que es poco factible que la angiogénesis pueda hacer modificaciones tan rápidas como minutos de la permeabilidad de los OCVs. Por lo que otros factores como las PGs previos a la angiogénesis puedan ser más importantes en estos fenómenos.

Uno de los modelos que induce un incremento de la permeabilidad específico del OVLT y del SFO es la ingesta elevada de agua con sal (Morita 2013a). La ingesta de agua con 2% de NaCl durante días induce cambios evidentes en la fisiología y se utiliza como modelo de incremento de osmolaridad. En este modelo los animales consumen más agua (Fig 3E), tienen activación de regiones encargadas de: detectar cambios osmolares como el OVLT y el SFO, de regiones integradoras como el MnPO y de regiones efectoras que liberan AVP y OXT como el SON y el PVN (Fig 3 F-J). Presentan al sexto día un incremento en la permeabilidad del OVLT y SFO (en ZT2) similar a lo reportado por Morita 2013a (Fig 3C, D).

Sin embargo, los animales se encuentran en un mal estado pasado ese tiempo, esto se puede ejemplificar con la temperatura circadiana durante los 6 días que duró el experimento (Fig 3K). Presentan un decremento muy pronunciado en la temperatura con una reducción de casi 4°C con respecto línea base. Este efecto se creyó que era dependiente de la ingesta de alimento, ya que se ha reportado que el reto con sal induce un decremento del consumo de comida y pérdida de peso (Greenwood M. P. 2015). Por este motivo se probó si suplementar el agua con sal y sacarosa al 5% podía recuperar el

control circadiano de la temperatura y el estado saludable de los animales, lo cual se puede observar en la Figura 4D donde se rescato el control circadiano de temperatura al menos durante los primeros dos días del reto con sal. Su consumo de agua con sal se encuentra incrementado (Fig 4A) y el de comida se encuentra disminuido (Fig 4B), similar al reto con solo sal 2%. Igualmente los animales pierden peso en los primeros días del reto con sal (Fig 4C).

A partir de estos datos se decidió realizar los experimentos en el día 3 donde no presentan cambios en la temperatura e igualmente presentan un incremento similar de la permeabilidad del OVLT, pero no del SFO (Fig 4G-H).



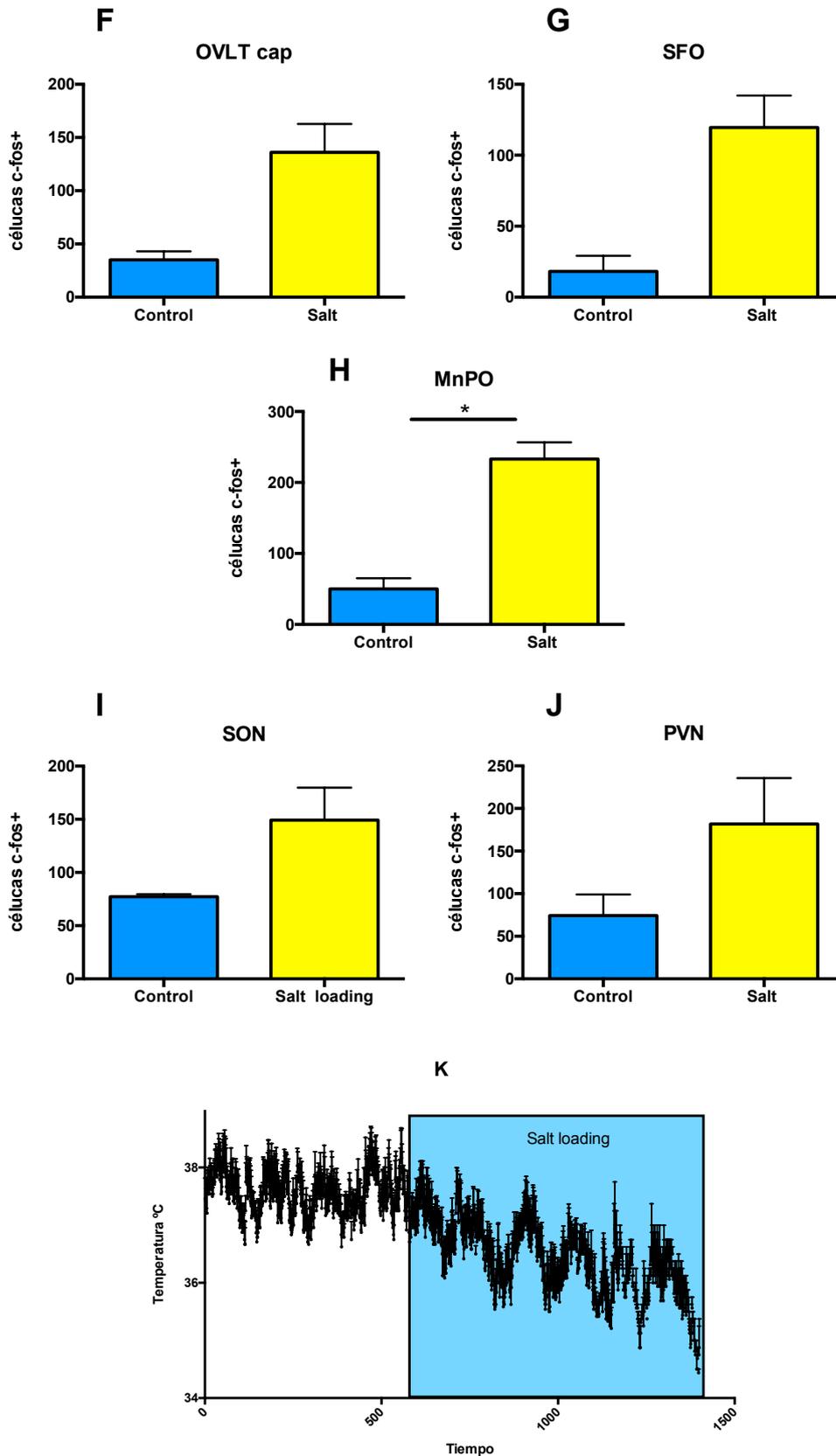


Figura 3. Efecto del reto con sal sobre la permeabilidad de la EM, ARC, SFO y OVLT al sexto día en ZT2 (A, B, C, D). Valores significativos de p con una prueba de t de Student **C**, $p = 0.0375$; **D**, $p = 0.0193$. Control ZT2 $n=6$; Salt loading ZT2 $n=3$. Además del cambio en el consumo de agua (E), temperatura (K) y expresión de c-Fos en la Lámina Terminalis (OVLT, SFO, MnPO), SON y PVN al sexto día en ZT2 (F-J). **E**, mostró valor de $p=0.0057$ con una ANOVA de una vía, **H**, mostró valor de $p=0.0111$ en una t de Student. Control $n=2$; Salt $n=3$.

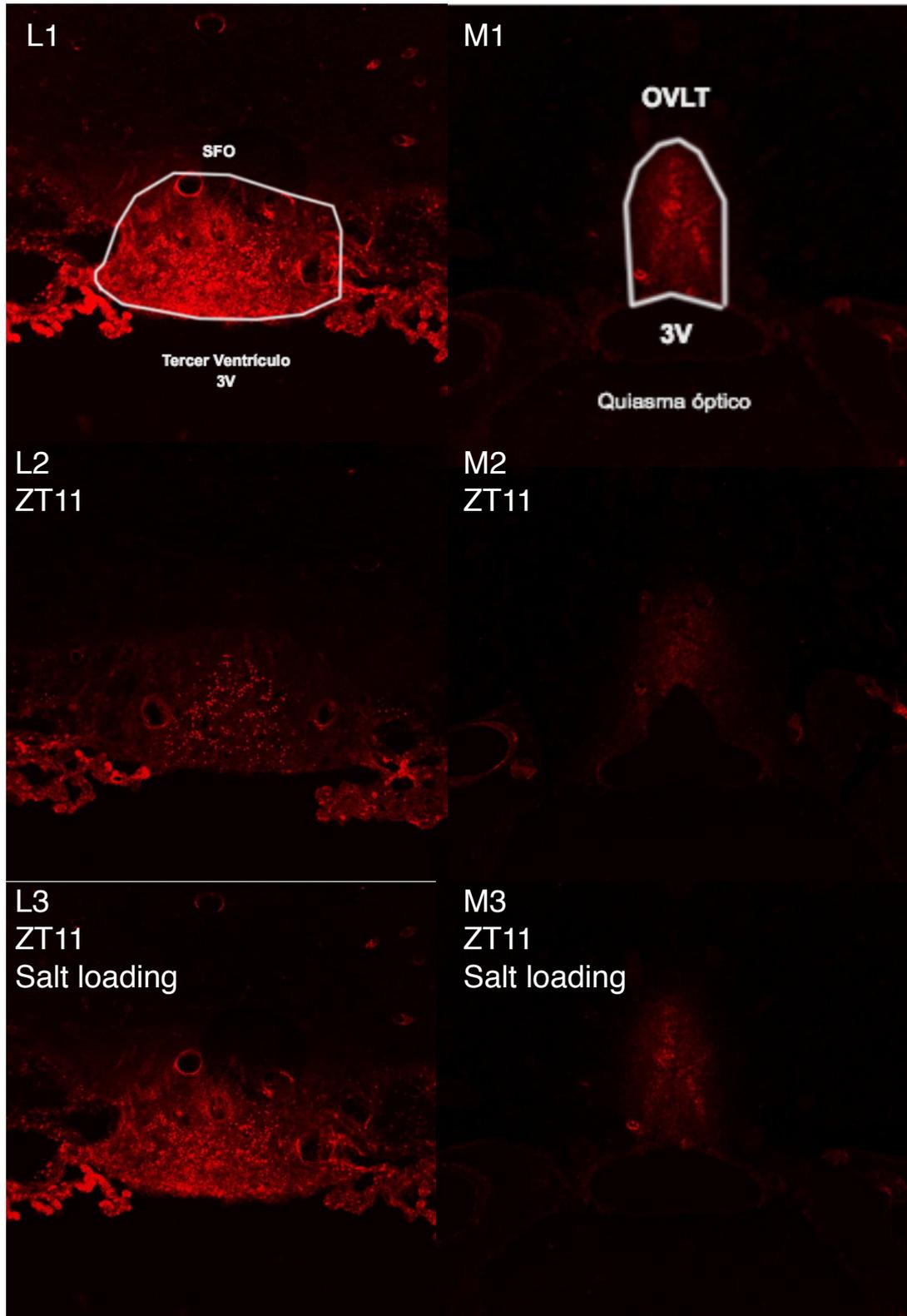


Figura 3. Imágenes representativas de los cambios de permeabilidad después de 6 días del reto con sal. L1 y M1, muestran el área de interés que se analizó, las imágenes han sido modificadas. L2 y M2, muestra la permeabilidad de EB en condiciones control, L3 y M3, muestran el efecto del reto con sal sobre la permeabilidad del SFO y OVLT, respectivamente.

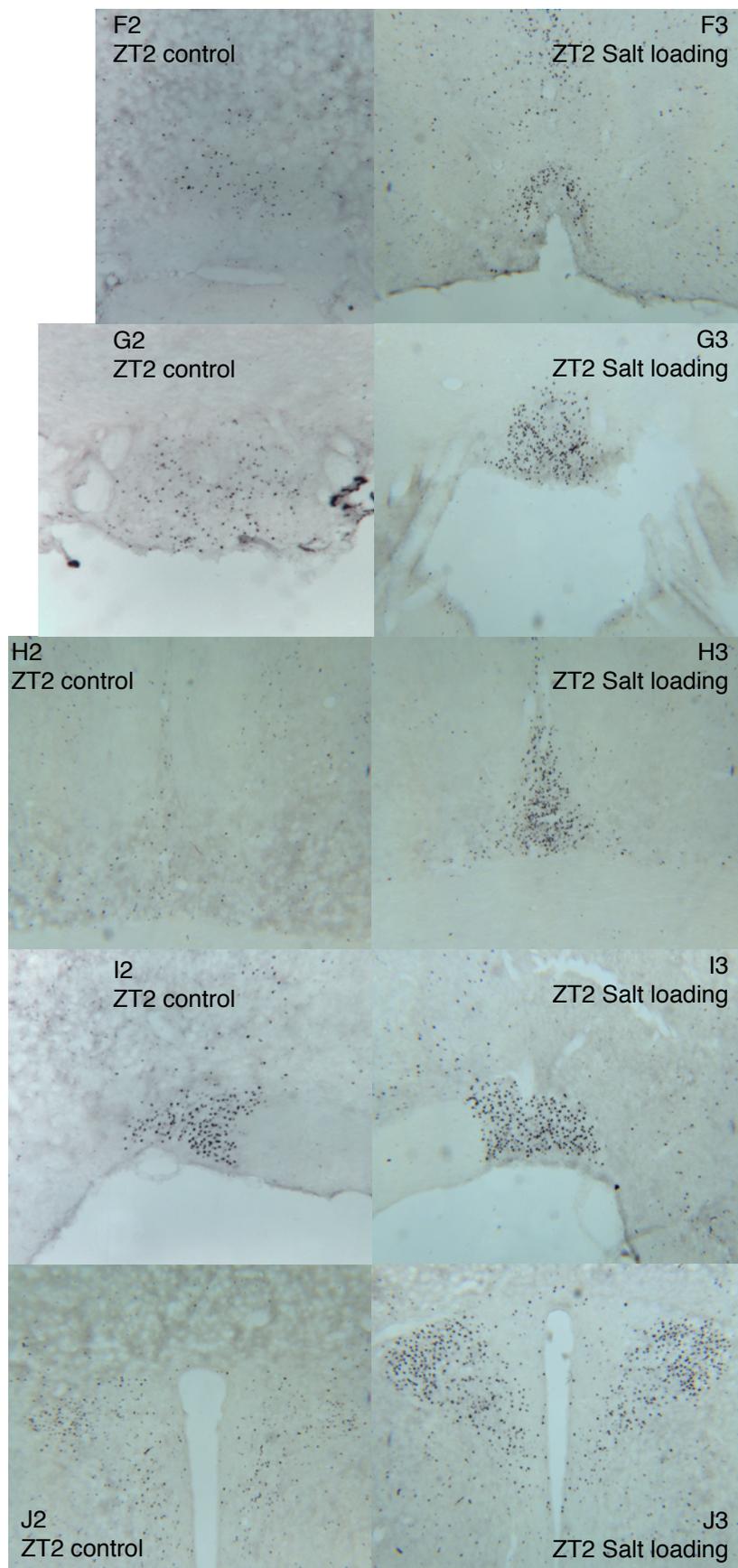
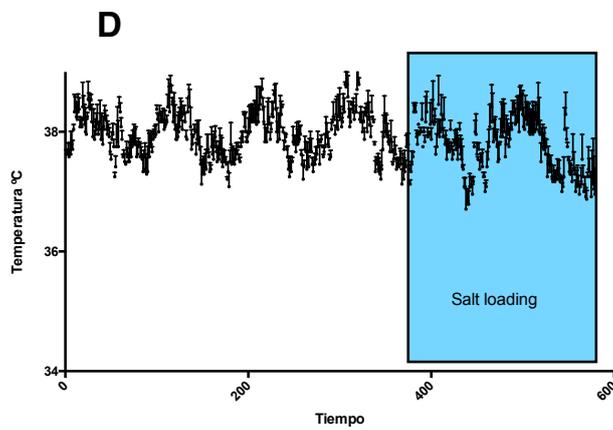
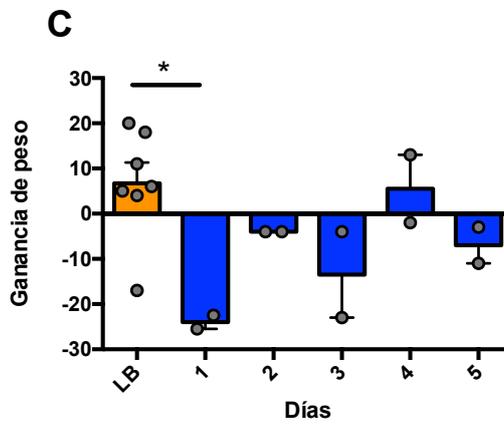
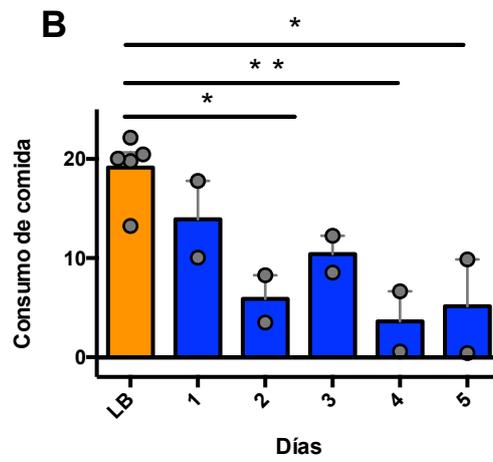
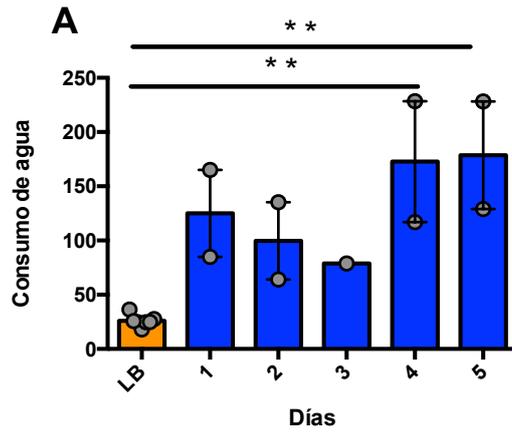


Figura 3. Imágenes representativas de inmunohitoquímica contra c-fos. F-J, OVLT, SFO, MnPO, SON y PVN, respectivamente. F2-J2, animales control en ZT2, F3-J3, animales con 6 días del reto con sal.



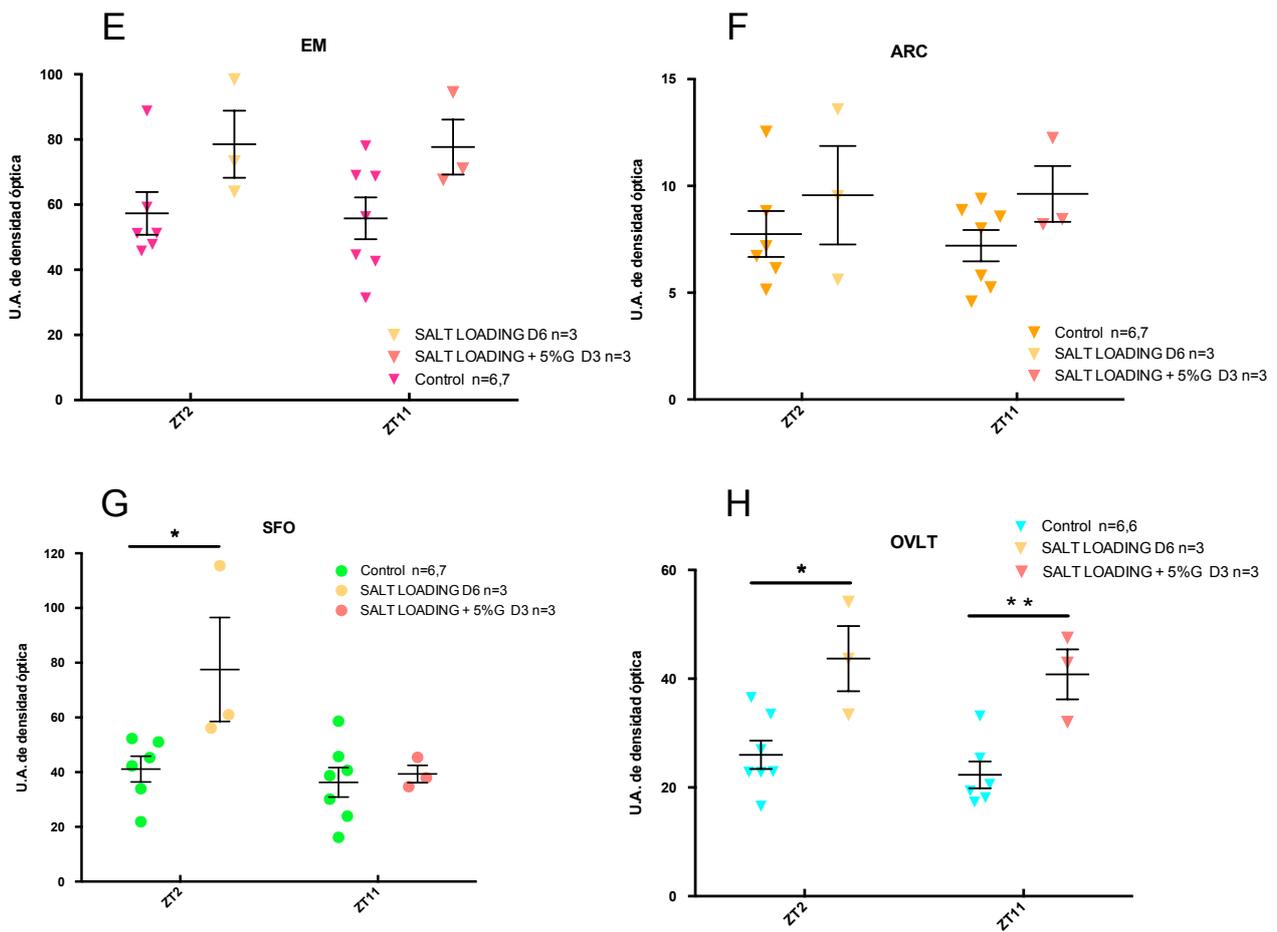


Figura 4. Efecto de la suplementación con sacarosa durante el reto con sal sobre la ingesta de agua (A), ingesta de comida (B), ganancia de peso (C) y temperatura (D). La ANOVA de una vía arrojó, **A**, $p=0.0025$, **B**, $p=0.0079$, **C**, $p=0.0397$. Además la permeabilidad de la EM, ARC, SFO y OVLT al tercer día en ZT11 comparadas con la permeabilidad al sexto día en ZT2 con sus respectivos controles de ZT11 y 2 (E-H). La prueba de t de Student entre Control y Reto con sal ZT11, **H**, arrojó una $p=0.0056$.

8.3 EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE PROSTAGLANDINAS ENDÓGENAS SOBRE LA PERMEABILIDAD DE LOS ÓRGANOS CIRCUNVENTRICULARES Y LA SED DURANTE EL CONSUMO ELEVADO DE SAL

Se desconoce si los cambios en la permeabilidad de los OCVs que se presentan durante el reto con sal son necesarios para iniciar alguna de las respuestas fisiológicas. Conociendo la importancia de las PGs sobre diversas respuestas durante un reto con sal y la evidencia de que participan en los cambios de permeabilidad de algunos OCVs (EM y OVLT), se decidió evaluar si las respuestas suscitadas durante el reto con sal (sed y activación del SON y PVN) podían depender de la permeabilidad de los OCVs que a su vez dependería de las PGs. Por lo cual, se inyectó INDO i.v. en ZT11 al tercer día del reto con sal y se observó si el consumo de agua se modificaba, esto se puede observar en (Fig 5 A) donde hubo un decremento pronunciado en el consumo de agua.

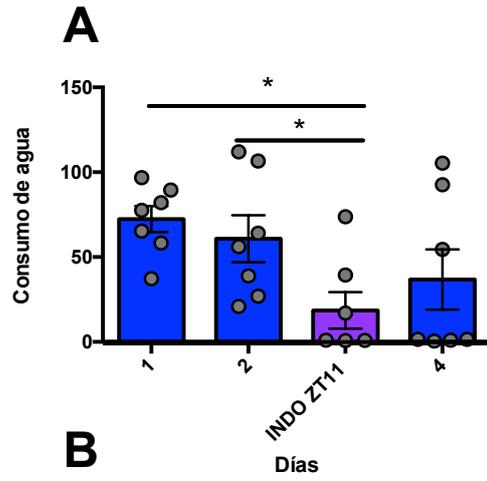
Sin embargo, al día siguiente algunos de los animales no recuperaron el consumo normal de agua con sal por lo que se creyó que era un aprendizaje tipo condicionamiento aversivo al sabor (CAS), el cual es la asociación entre un estímulo condicionado (agua con sal y sacarosa) y un estímulo incondicionado (malestar gastrointestinal inducido con INDO i.v.) provocando una respuesta condicionada como la aversión al nuevo sabor (Chambers 2018). Esto se creyó debido a que el sabor del agua con sal y sacarosa es relativamente novedoso (tres días). Se decidió precondicionar a los animales al sabor por al menos una semana, en la cual los animales tenían acceso al agua normal y al agua con sal y sacarosa. Al término de la semana se les retiró el agua normal y se les dejó únicamente el agua con sal y sacarosa. En el tercer día recibieron la inyección de INDO o VEH y se observó su consumo hasta ZT19 - ZT22. Igualmente se observó un decremento en el consumo de agua en la noche del día 3 (Fig 5 B) además el efecto fue específico en el consumo de agua dejando el consumo de alimento igual que el VEH (Fig 5 C).

Igualmente se observó que la INDO no podía disminuir el consumo normal de agua en animales sin el reto con sal (Fig 5 D). Esto indica que el efecto de INDO sobre la sed solo ocurre durante un reto con sal.

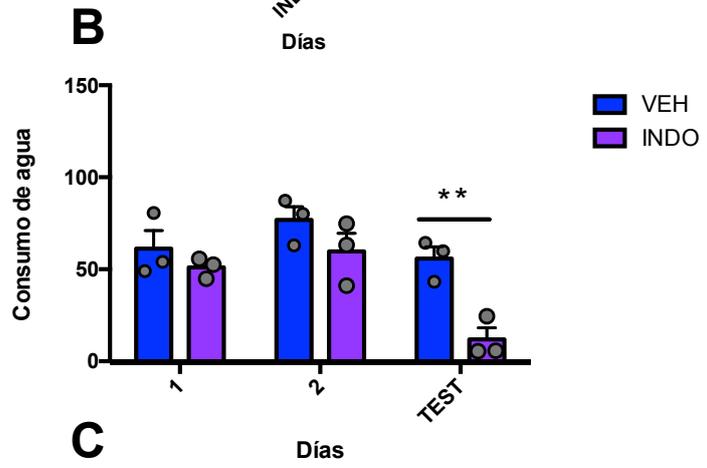
Se observó la permeabilidad en dos momentos, justo una hora después de la INDO ZT11 i.v. y en la fase tardía de actividad de los animales (ZT19-ZT22), esto para poder observar el consumo de agua. En ZT11, después de la inyección de INDO existe un incremento en la permeabilidad de la EM que difiere del control sin reto con sal, pero no del VEH con el reto con sal; esta presente el incremento en el OVLT y existe una tendencia a un incremento en la permeabilidad del SFO (Fig 6 A-D). Sorprendentemente, en ZT19-22 existe un incremento de la permeabilidad del SFO con INDO y no así del VEH, además se pierde la diferencia en el OVLT y en la EM (Fig 6 E-H). Esto indica que el SFO es el principal OCV modificado por la administración de INDO.

Por último, se evaluó la expresión de c-fos en el SFO debido a los resultados de su permeabilidad en ZT19-22. No se observó ninguna modificación entre el VEH e INDO, además ambos eran similares a los animales tratados por 6 días con el reto con sal únicamente (Fig 7). Indicando que la actividad de estas neuronas no se modificó por el cambio en la permeabilidad, Aunado a esto, sitios efectores como el SON no presentan diferencias, por lo que el efecto es particular sobre el consumo de agua de los animales, dejando la liberación de AVP y OXT intactas. Se propone que el efecto sobre la ingesta de agua se debe a sitios de integración que se requieran para la inducción de la sed, como las cortezas o el PVT, y no para la activación del SON.

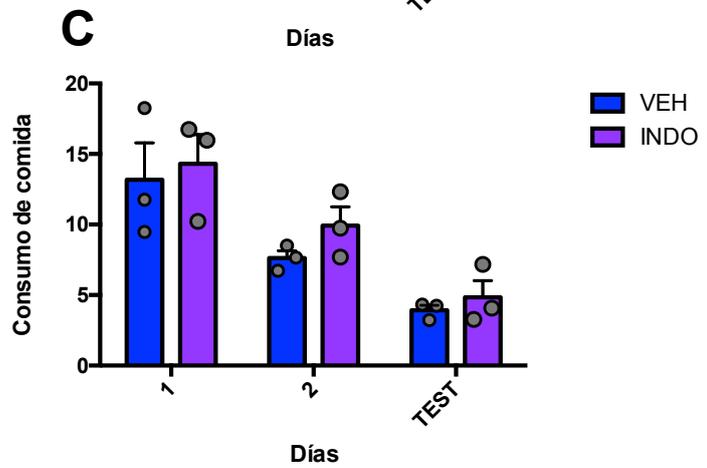
Afecta el consumo de agua



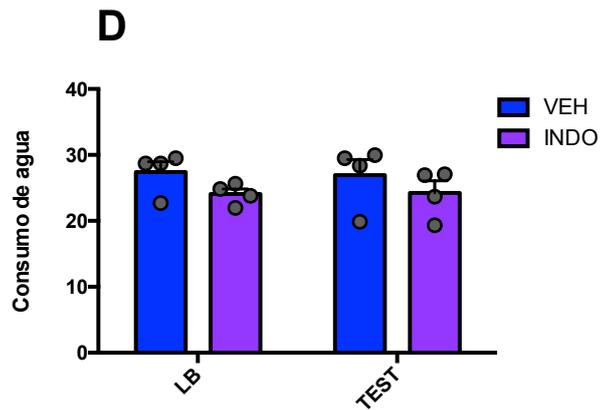
Afecta el consumo de agua, No es un aprendizaje tipo CAS



No afecta el consumo de alimento



No afecta el consumo normal de agua



No afecta el consumo elevado de agua después de una privación de agua de 2 días.

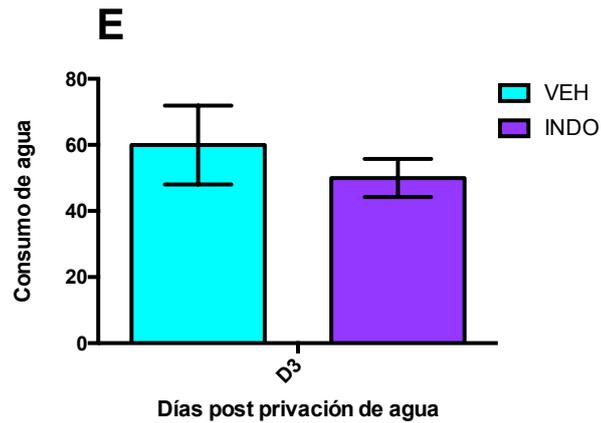


Figura 5. Efecto de INDO sobre la ingesta de agua (A), NO se debe a un aprendizaje tipo CAS (B), NO modifica el consumo de comida (C), NO modifica el consumo de agua fisiológico (D), NO afecta el consumo elevado de agua después de una privación de agua. Valores de p en **A**, ANOVA de una vía con medidas repetidas $p=0.0093$, **B**, ANOVA de dos vías con medidas repetidas en tiempo $p=0.0056$ y tratamiento $p=0.0165$, **C**, ANOVA de dos vías con medidas repetidas en tiempo $p=0.0003$.

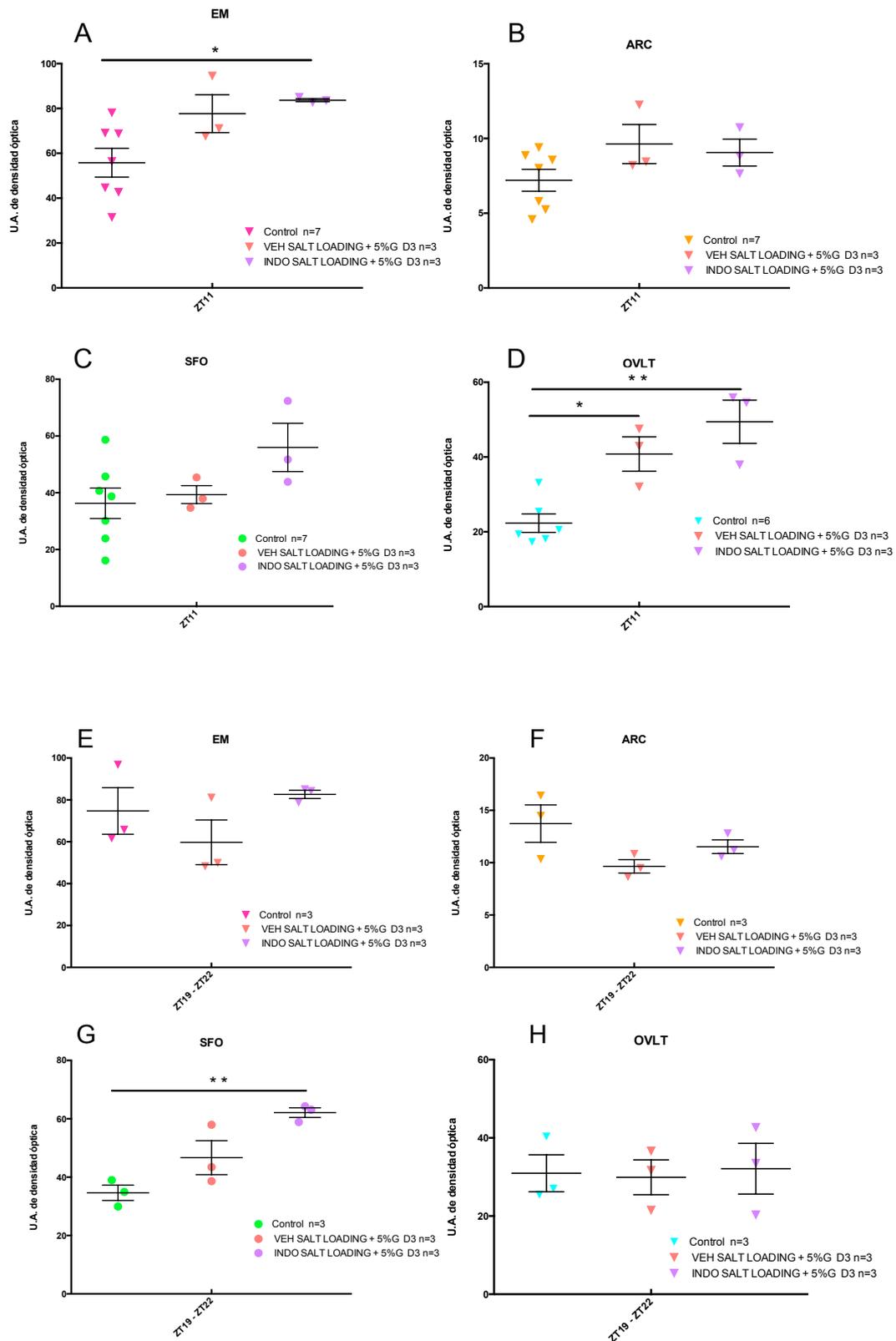


Figura 6. Efecto de INDO sobre la permeabilidad de los OCVs en ZT11 (A-D) y ZT19-22 (E-H). ANOVA de una vía, **A**, $p=0.0355$, **D**, $p=0.0014$, **G**, $p=0.0065$.

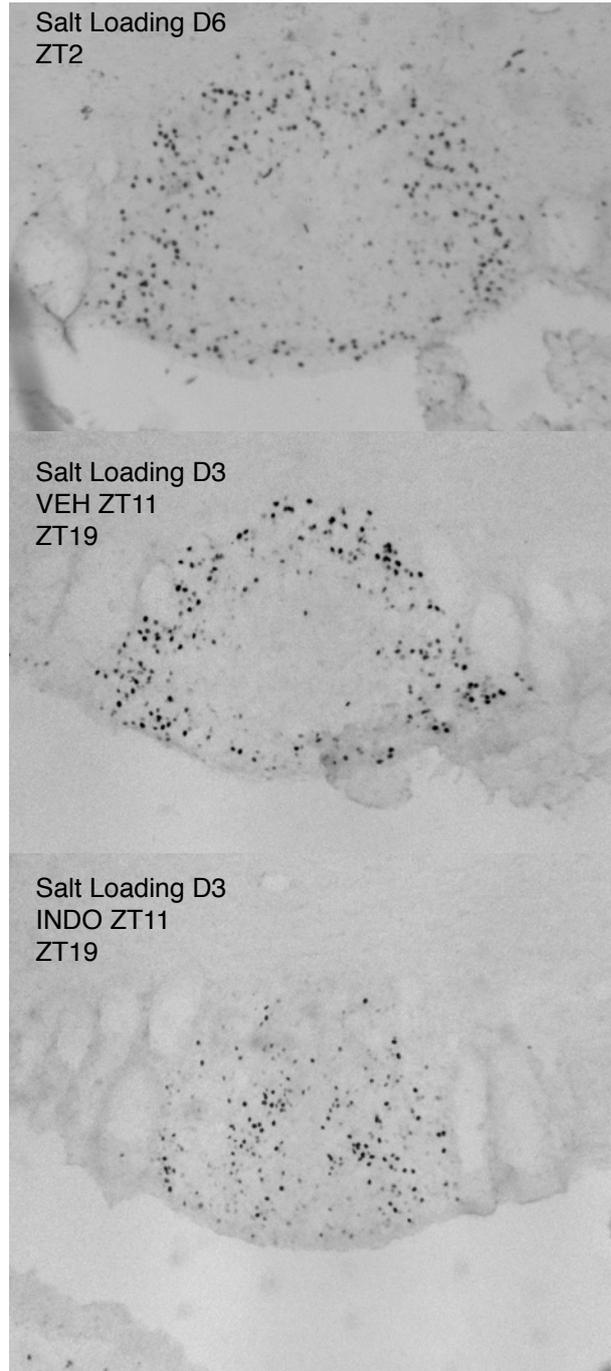
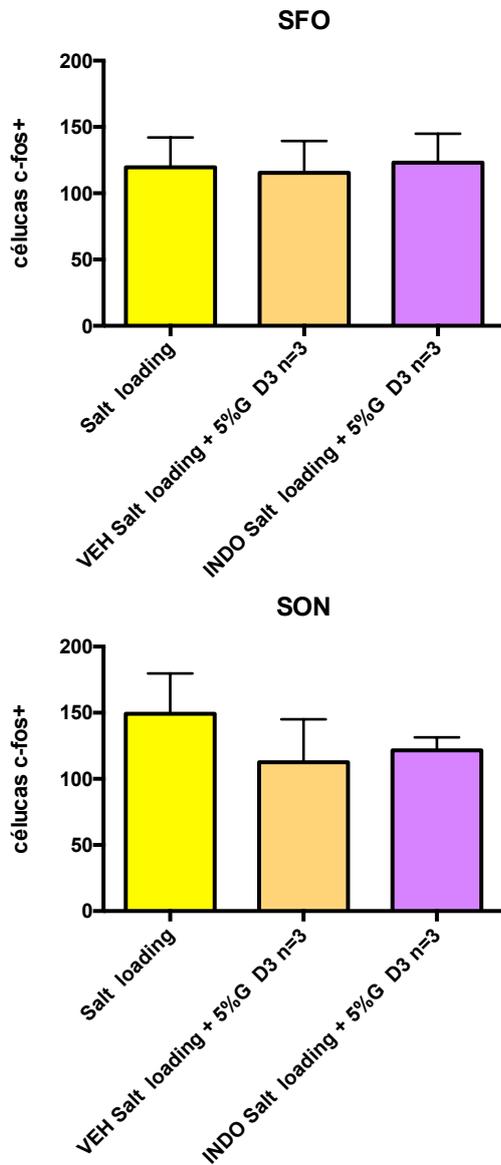


Figura 7. No hay efecto sobre la actividad del SFO o SON en ZT19-22 después de INDO ZT11. Se muestra en comparación la activación que se obtiene con 6 días de Salt Loading en ZT2 la cual es la misma. Imágenes representativas del SFO en las distintas condiciones.

9. DISCUSIÓN

9.1 PARTICIPACIÓN DE LAS PROSTAGLANDINAS ENDÓGENAS SOBRE LA PERMEABILIDAD DE LOS ÓRGANOS CIRCUNVENTRICULARES

Nuestros datos sugieren que no existe una diferencia notable entre la acrofase y la batifase del ritmo de permeabilidad de los OCVs como se había reportado anteriormente. Esta discrepancia se puede explicar debido a diferencias técnicas, en este estudio para evitar que la respuesta ante estrés influyera sobre la permeabilidad, se administraron remotamente las sustancias sin molestar a los animales. Mientras que en el método anterior, se manipulaban a los animales previo a la administración del colorante. Esto señala que el estrés tan agudo como 5 minutos puede modificar la permeabilidad de los OCVs. Durante el estrés se liberan hormonas (corticosterona y adrenalina) y hay activación generalizada del SNS. Igualmente las mismas PGs son importantes para las respuestas de hipertermia (Kluger 1987) y son liberadas rápidamente por la EM y el hipotálamo medio basal en respuesta a catecolaminas como noradrenalina (Ojeda 1979). Cualquiera de estos factores podría ser causante de los cambios observados sobre los OCVs. Estos resultados señalan que el estrés induce la detección de un ritmo en la permeabilidad que de manera remota no se puede observar. Sorprendentemente, la administración de INDO una hora antes de ZT2 y no así en ZT11 disminuye la permeabilidad del ARC-EM. Esto señala una posible producción circadiana de PGs que a su vez pueden actuar a nivel del endotelio promoviendo de forma rápida y paracrina la modificación de la permeabilidad endotelial particularmente en ZT2.

9.2 TERMOREGULACIÓN

Interesantemente, existe un decremento de temperatura corporal debido a la administración de INDO de ZT1 a 2 y no así de ZT10 a 11. Lo cual coincide con el decremento de la permeabilidad, sugiriendo la hipótesis de una producción circadiana de PGs que a su vez regula tanto a la permeabilidad como a la temperatura corporal.

La producción circadiana de PGs podría ser local dentro del mismo ARC-EM, ya que la glia de este núcleo presenta enzimas de síntesis de PGs (Eskilsson 2014) y produce PGE2 (Sandrine de Seranno 2010).

Para interpretar los resultados de la temperatura y la permeabilidad es necesario conocer la regulación circadiana de la temperatura donde se ha propuesto la participación del ARC y del NSQ (Guzman-Ruiz 2015). Particularmente, las proyecciones del ARC hacia el MnPO mantienen alta la temperatura en la segunda mitad de la fase de actividad vía α MSH. Por lo que el efecto criogénico de INDO se podría deber a una inhibición de las neuronas α MSH del ARC asociado a la disminución de la permeabilidad. Esta disminución de la actividad de neuronas α MSH, podría inhibir la termogénesis y la vasoconstricción vía el MnPO (FigD1).

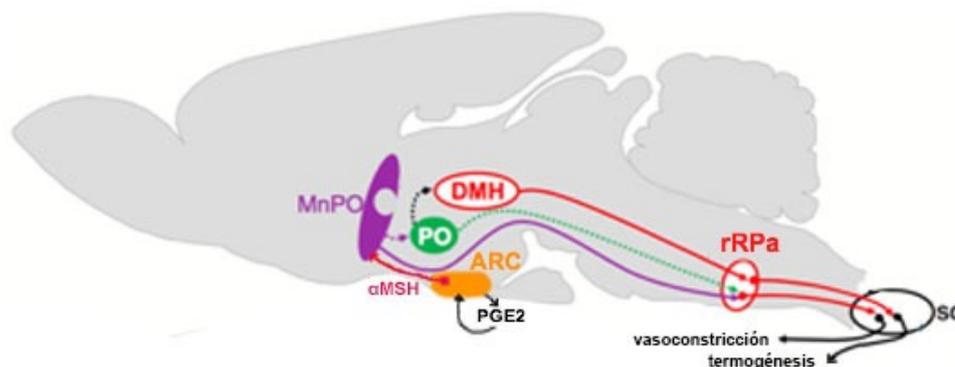


Figura Discusión 1: Esquema de la interacción PGE2-ARC-MnPO. El ARC libera α MSH hacia el MnPO debido a un incremento de PGs (posiblemente PGE2). Esta liberación activa las ya conocidas vías de incrementar la temperatura. Modificado de McKinley 2015.

Como ya se había reportado anteriormente (Scales 1987) la administración de INDO tiene un efecto criogénico tardío en ZT11, aquí reportamos que el efecto en promedio dura de ZT18 hasta ZT5 teniendo su acrofase en ZT22. Es interesante que este periodo sobrelape con el periodo de mayor actividad del ARC (Guzman-Ruiz 2014), sugiriendo que la actividad circadiana del ARC depende de la permeabilidad. El presente resultado sugiere que la producción de PGs mantiene la permeabilidad del ARC-EM y esta producción inicia

a partir de ZT18 hasta ZT5 lo cual mantiene la actividad neuronal circadiana del ARC. En este ámbito sería interesante observar la permeabilidad en ZT22, la acrofase del efecto criogénico de INDO, en condiciones basales y una hora después de la administración de INDO, para observar el probable decremento de permeabilidad. Este decremento circadiano de permeabilidad debido a la administración de INDO disminuiría el acceso de moléculas como glucosa, impidiendo la activación circadiana de neuronas (FigD2), indicando que las señales energéticas que el ARC recibe dictan su actividad. A su vez estas señales se integraría en el MnPO para modificar la temperatura corporal y optimizar el gasto energético dependiendo de la señal energética que el ARC recibe de la circulación.

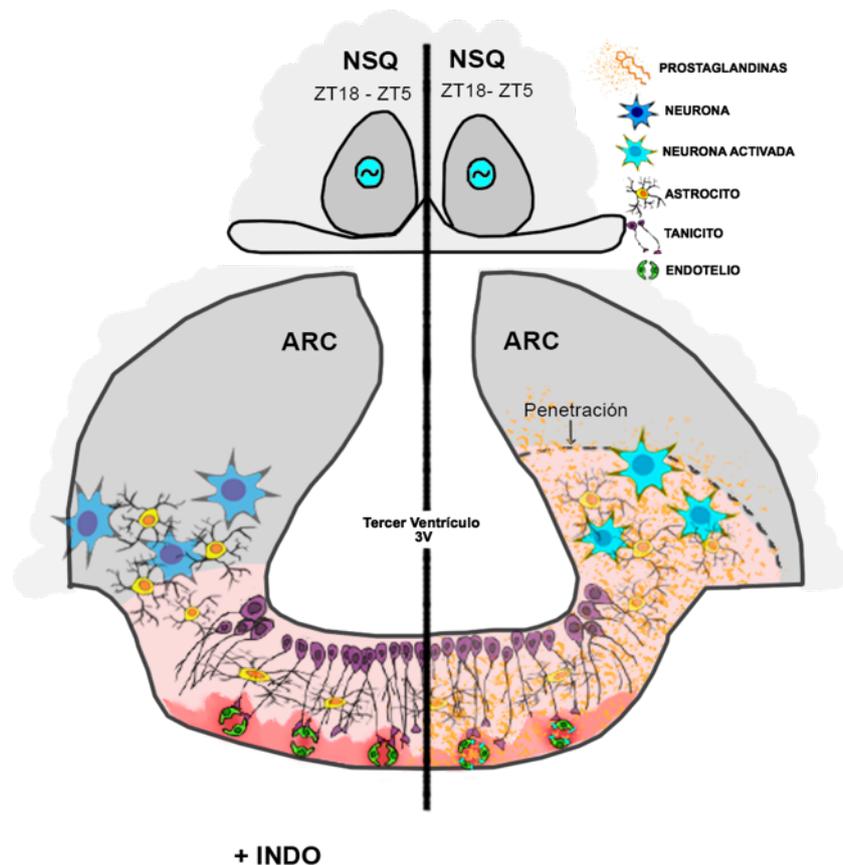


Figura Discusión 2: Esquema de la interacción NSQ-ARC a través de la síntesis de circadiana de PGs. El NSQ da la temporalidad y se muestra el ZT donde existe el efecto sobre la temperatura con INDO, en ZT18-ZT5 el NSQ manda la información a los astrocitos y tanicitos del ARC para producir PGs. Estas PGs modifican al endotelio incrementando a su vez la permeabilidad del ARC. Este incremento promueve el acceso de sustancias hacia el ARC y culmina en la activación de las neuronas del ARC. Modificado de Rodríguez B. 2017.

El OVLT presenta un decremento de la permeabilidad debido a la administración de INDO en ZT11. Sin embargo, este efecto no correlaciona con las funciones conocidas del OVLT las cuales no se vieron modificadas e.g. temperatura, inducir sed. No se indujo un cambio en la temperatura corporal 1 hora después de INDO y no se decremento el consumo de agua durante la noche después de la administración de INDO en ZT11, a pesar de la participación del OVLT en la inducción de sed en el periodo anticipatorio (ZT22-24). Por lo que concluimos que el efecto de INDO en ZT11 es poco congruente con las funciones de termoregulación e inducción de sed del OVLT, sin embargo podría afectar alguna una función no evaluada fuera de sus funciones circadianas.

9.3 OSMOREGULACIÓN

Debido a que se modifica la permeabilidad del OVLT y del SFO durante el reto con sal se hipotetizó que este incremento se debía a una producción de PGs en estos OCVs y era necesario para incrementar el consumo de agua y la inducción de actividad de neuronas magnocelulares del SON. Sorprendentemente, la administración de INDO en ZT11 al tercer día del reto con sal indujo una drástica disminución en la ingesta de agua durante toda la noche, este efecto no se debe a un malestar de los animales ya que comieron similar a los controles. Además, no se debe a un aprendizaje tipo CAS e INDO no modifica el consumo normal de agua sin el reto con sal. Sin embargo, la permeabilidad elevada de los OCVs se mantuvo e incluso aumento en el SFO, además la actividad de las neuronas del SFO y las del SON no disminuyó. De estos experimentos concluimos que las PGs son necesarias para inducir la sed, sin embargo su papel es difícil de interpretar ya que la actividad de nucleos que participan en estas respuestas, SFO y SON, sigue intacta, por lo que es necesario indagar si el efecto es periférico o central mediante una administración i.c.v. de INDO.

10. CONCLUSIÓN

Varios estudios señalan la importancia de la retroalimentación que el hipotálamo recibe a través de los OCVs para mantener la homeostasis y la organización de la fisiología corporal; para dar respuestas integradas que intervengan en e.g. el estado metabólico o la osmolaridad del individuo. Esta retroalimentación se ve alterada al existir desbalances metabólicos u osmolares iniciando una reorganización del OCV permitiendo un mayor acceso de sustancias mediante el incremento de la permeabilidad. Sin embargo, se desconocía si esta reorganización de los OCVs era necesaria para organizar e integrar la fisiología y las respuestas suscitadas ante los desbalances. Los resultados de este trabajo arrojan evidencia de la participación de las PGs en la regulación circadiana de la permeabilidad endotelial del ARC-EM manteniendo el acceso de sustancias hacia el ARC en ZT2. Esta reorganización de la permeabilidad endotelial podría modificar la actividad neuronal del ARC y su ausencia ocasionaría una deficiencia en la integración metabólica provocando un decremento en el gasto energético, observado en la reorganización de la temperatura corporal. Por otro lado, las PGs también se requieren para la inducción de la sed en un reto con sal, sin embargo para dilucidar este fenómeno se requiere más entendimiento entre la interacción que guardan las PGs con los circuitos de la sed. Estos resultados señalan la importancia de las PGs para la fisiología de los OCVs y la importancia de la retroalimentación de los OCVs para la organización de la fisiología.

11. REFERENCIAS

- Abbott, N. Joan et al. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nat Rev Neurosci* ;7(1):41-53.
- Abbott, Stephen B. G. & Saper, Clifford B.(2017). Median preoptic glutamatergic neurons promote thermoregulatory heat loss and water consumption in mice, *15;595(20): 6569-6583*. doi: 10.1113/JP274667.
- Aguilar-Roblero, Raúl et al. (2015). Introduction to Circadian Rhythms, Clocks, and Its Genes. En Mechanisms of Circadian Systems in Animals and Their Clinical Relevance (pp. 1-11). Springer, Cham. doi: 10.1007/978-3-319-08945-4.
- Banks et al. (2015). Lipopolysaccharide-induced blood-brain barrier disruption: roles of cyclooxygenase, oxidative stress, neuroinflammation, and elements of the neurovascular unit. *Journal of Neuroinflammation*, 25;12:223. doi: 10.1186/s12974-015-0434-1.
- Bell, Balyssa B. et al. (2017). Differential contribution of POMC and AgRP neurons to the regulation of regional autonomic nerve activity by leptin. *Molecular Metabolism*, 8:1-12. doi: 10.1016/j.molmet.2017.12.006.
- Blatteis, C. M. et al. (1983). Suppression of Fever after Lesions of the Anteroventral Third Ventricle in Guinea Pigs. *Brain Research Bulletin*, 11(5):519-26.
- Blatteis, C. M. et al. (2005). Cytokines, PGE2 and endotoxic fever: a re-assessment. *Prostaglandins & other Lipid Mediators*, 76(1-4):1-18.
- Buller, Kathryn M (2001). Circumventricular Organs: Gateways to the Brain Role Of Circumventricular Organs In Pro-Inflammatory Cytokine-Induced Activation Of The Hypothalamic– Pituitary–Adrenal Axis. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, **28**, 581–589.
- Buijs, Frederik N. et al. (2016) The Circadian System: A Regulatory Feedback Network of Periphery and Brain. *Physiology* 31: 170–181.

- Buijs, Frederik N. et al. (2017) Suprachiasmatic Nucleus Interaction with the Arcuate Nucleus; Essential for Organizing Physiological Rhythms. *eNeuro*, 24;4(2), doi: 10.1523/ENEURO.0028-17.2017.
- Buijs, R. M. (1996). The anatomical basis for the expression of circadian rhythms: the efferent projections of the suprachiasmatic nucleus. *Progress in Brain Research*, 111:229-40.
- Buijs, R. M. et al. (2013). The circadian system and the balance of the autonomic nervous system. *Handbook of Clinical Neurology*, Vol. 117 (3rd series), 117:173-91. doi: 10.1016/B978-0-444-53491-0.00015-8.
- Burnstock, Geoffrey & Loesch, Andrzej (2017). Sympathetic innervation of the kidney in health and disease: Emphasis on the role of purinergic cotransmission. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* 204, 4–16.
- Cahill, Paul A. & Redmond, Eileen M. (2016). Vascular endothelium e Gatekeeper of vessel health. *Atherosclerosis*, 248 97-109.
- Candelario-Jalil, Eduardo et al. (2007). Cyclooxygenase Inhibition Limits Blood-Brain Barrier Disruption following Intracerebral Injection of Tumor Necrosis Factor- in the Rat. *The journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 323(2):488-98.
- Canon, Walter (1929). Organization for Physiological Homeostasis. *Physiological Reviews*, <https://doi.org/10.1152/physrev.1929.9.3.399>.
- Chambers (2018). Conditioned taste aversions. *World J Otorhinolaryngol Head Neck Surg*. 4(1): 92–100.
- Ciofi, Philippe (2011). The arcuate nucleus as a circumventricular organ in the mouse. *Neuroscience Letters*, 7;487(2):187-90. doi: 10.1016/j.neulet.2010.10.019.
- Dalvi, Siddhartha et al. (2015). Exogenous arachidonic acid mediates permeability of human brain microvessel endothelial cells through prostaglandin E2 activation of EP3 and EP4 receptors. *Journal of Neurochemistry*, 135(5):867-79. doi: 10.1111/jnc.13117.
- Dantzer, R. et al. (1998 a). Cytokines and Sickness Behavior. *Annals of the New York Academy Science*, 1;840:586-90.
- Dantzer, R. et al.(1998 b). Molecular Basis of Sickness Behavior. *Annals of the New York Academy Science*, 29;856:132-8.

De Seranno, Sandrine et al. (2004). Vascular Endothelial Cells Promote Acute Plasticity in Ependymogial Cells of the Neuroendocrine Brain. *The Journal of Neuroscience*, 24(46): 10353-63.

De Seranno, Sandrine et al. (2010). Role of Estradiol in the Dynamic Control of Tanycyte Plasticity Mediated by Vascular Endothelial Cells in the Median Eminence. *Endocrinology*, 151(4):1760–1772.

Duvernoy, Henri M. & Risold, Pierre-Yves (2007). The circumventricular organs: An atlas of comparative anatomy and vascularization. *Brain Research Reviews*, 56(1):119-47.

Engström, Linda et al. (2012). Lipopolysaccharide-Induced Fever Depends on Prostaglandin E2 Production Specifically in Brain Endothelial Cells. *Neuroendocrinology*, 153(10):4849-61.

Eskilsson, Anna et al. (2014). Distribution of Microsomal Prostaglandin E Synthase-1 in the Mouse Brain . *The Journal of Comparative Neurology*, 522(14):3229-44. doi: 10.1002/cne.23593.

von Euler US (1935). Uber die spezifische blutdrucksenkende Substanz des menschlichen Prostata and Samenbtasensekretes. *Klin Wochenschr* 14: 1182.

von Euler US (1936). On the specific vaso-dilating and plain muscle stimulating substances from accessory genital glands in man and certain animals (prostaglandin and vesiglandin). *J Physiol*; 88(2): 213-34.

Ferreira SH, Moncada S, Vane JR (1971). Indomethacin and aspirin abolish prostaglandin release from the spleen. *Nat New Biol*. 1971 Jun 23;231(25):237-9.

Flores-Benitez D. et al. (2009). Control of tight junctional sealing: roles of epidermal growth factor and prostaglandin E2. *Am J Physiol Cell Physiol* 297: C611–C620, doi:10.1152/ajpcell.00622.2008.

Ghulé VV et al. (2012). Prostaglandin-induced cervical remodelling in humans in the first trimester is associated with increased expression of specific tight junction, but not gap junction proteins. *J Transl Med*; 10:40. doi: 10.1186/1479-5876-10-40.

Gizowski, C. et al. (2016). Clock-driven vasopressin neurotransmission mediates anticipatory thirst prior to sleep. *Nature* 29;537(7622):685-8.

Gizowski, Claire et al. (2018). Activation of Organum Vasculosum neurons and water intake in mice by vasopressin neurons in the Suprachiasmatic Nucleus. doi: 10.1111/jne.12577.

Goldblatt, M. W. (1935). Properties of human seminal plasma. *J Physiol*; 84(2): 208–218.

Greendwood et al. (2015). A comparison of physiological and transcriptome responses to water deprivation and salt loading in the rat supraoptic nucleus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 308(7):R559-68. doi: 10.1152/ajpregu.00444.2014.

Guerrero-Vargas, Natalí N. et al. (2014). Reciprocal interaction between the suprachiasmatic nucleus and the immune system tunes down the inflammatory response to lipopolysaccharide. *Journal of Neuroimmunology*, 273(1-2):22-30. doi: 10.1016/j.jneuroim.2014.05.012.

Guzmán-Ruiz, M. et al. (2014). The Suprachiasmatic Nucleus Changes the Daily Activity of the Arcuate Nucleus α -MSH Neurons in Male Rats. *Endocrinology*, 155(2):525-35. doi: 10.1210/en.2013-1604.

Guzmán-Ruiz, M. et al. (2015). Role of the Suprachiasmatic and Arcuate Nuclei in Diurnal Temperature Regulation in the Rat. *The Journal of Neuroscience*, 35(46):15419-29. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1449-15.2015.

Handler, J. (1981). Vasopresin-prostaglandin interactions in the regulation of epithelial cell permeability to water. *Kidney International*, 19(6):831-8.

Hattar, Samer et al. (2006). Central Projections of Melanopsin-Expressing Retinal Ganglion Cells in the Mouse. *The Journal of Comparative Neurology* 497:326–349 .

Hayaishi, Osamu (2000). Molecular mechanisms of sleep–wake regulation: a role of prostaglandin D₂. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 355, 275-280.

Herrera-Moro Chao, D. et al. (2016). The Suprachiasmatic Nucleus Modulates the Sensitivity of Arcuate Nucleus to Hypoglycemia in the Male Rat. *Endocrinology*, 157(9):3439-51. doi: 10.1210/en.2015-1751.

Hofer, H (1958). "Zur Morphologie der circumventriculären Organe des Zwischenhirns der Säugetiere". *Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft*, 55: 202–251.

Hoffman, WE & Schmid, PG (1979). Cardiovascular and antidiuretic effects of central prostaglandin E₂. *J Physiol*; 288:159-69.

Hollis, Jacob H. et al. (2008). The trajectory of sensory pathways from the lamina terminalis to the insular and cingulate cortex: a neuroanatomical framework for the generation of thirst. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294: 1390–1401 .

Hunter (1997). Anteroventral Third Ventricle Lesion Suppresses Fever, but Not Stress- Induced Hyperthermia in Rats. *Annals of the New York Academy Science*, 813:420-6.

Jia, Zhanjun et al. (2013). mPGES-1-derived PGE₂ mediates dehydration natriuresis. *Am J Physiol Renal Physiol* 304: 214–221.

Johnston, M. G. et al. (1976). The Modulation of Enhanced Vascular Permeability by Prostaglandins Through Alterations in Blood Flow (Hyperemia). *Agents Actions*; 6(6):705-11.

Kalsbeek, Andries et al. (2011). Circadian disruption and SCN control of energy metabolism. *FEBS Letters*, 585, 1412–1426

Kanehisa, Furumichi, M., Tanabe, M., Sato, Y., and Morishima, K.; KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res.* 45, D353-D361 (2017).

Katsuura, Goro et al. (1990). Involvement of organum vasculosum of lamina terminalis and preoptic area in interleukin 1P-induced ACTH release. *Am J Physiol* 258(1 Pt 1):E163-71

Kiecker, Clemens (2017) The origins of the circumventricular organs. *Journal of Anatomy*. *J Anat*; 232(4):540-553 doi: 10.1111/joa.12771.

Kobayashi K et al. (2010). Inflammatory mediators weaken the amniotic membrane barrier through disruption of tight junctions. *J Physiol* 588(Pt 24): 4859–4869, doi: 10.1113/jphysiol.2010.197764.

Kluger, M. J. et al. (1987). Further Evidence That Stress Hyperthermia is a Fever. *Physiology and Behavior*, 39(6):763-6.

Knoll et al. (2017). Interleukin-1 β signaling in fenestrated capillaries is sufficient to trigger sickness responses in mice. *Journal of Neuroinflammation*, 14(1): 219. doi: 10.1186/s12974-017-0990-7.

Kozak et al. (1998). IL-6 and IL-1 beta in fever. Studies using cytokine-deficient (knockout) mice. *Ann N Y Acad Sci*. 29; 856:33-47.

Krall, Catherine M. et al. (2010). Food deprivation alters thermoregulatory responses to lipopolysaccharide by enhancing cryogenic inflammatory signaling via prostaglandin D2. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298: R1512–R1521.

Kurumbail RG et al. (1996). Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature*; 384(6610): 644-8.

Langlet, Fanny et al. (2013a). Tanycytic VEGF-A Boosts Blood-Hypothalamus Barrier Plasticity and Access of Metabolic Signals to the Arcuate Nucleus in Response to Fasting. *Cell Metabolism* 17, 607–617.

Langlet, Fanny (2013b). Etude de l'interface Sang-Noyau Arqué Hypothalamique au cours d'un déséquilibre énergétique : Plasticité de l'éminence médiane et impact sur la régulation de la prise alimentaire (Tesis doctoral) Ecole Doctorale Biologie-Santé de Lille. Francia.

Langlet, Fanny et al. (2013c). Tanycyte-Like Cells Form a Blood–Cerebrospinal Fluid Barrier in the Circumventricular Organs of the Mouse Brain. *J Comp Neurol*, 521(15):3389-405. doi: 10.1002/cne.23355.

Langlet, Fanny (2014). Tanycytes, a gateway to the metabolic hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 26(11):753-60.

Lazarus, Michael et al. (2007). EP3 prostaglandin receptors in the median preoptic nucleus are critical for fever responses. *Nature Neuroscience*, 10(9):1131-3.

Leib, David E. et al. (2017). The Forebrain Thirst Circuit Drives Drinking through Negative Reinforcement. *Neuron* 96, 1272–1281.

Legan, Sandra J. & Karsch, Fred J. (1975). A Daily Signal for the LH Surge in the Rat. *Endocrinology*, 96(1):57-62.

Lejeune M et al (2011). Prostaglandin E2 Produced by *Entamoeba histolytica* Signals via EP4 Receptor and Alters Claudin-4 to Increase Ion Permeability of Tight Junctions. *Am J Pathol*; 179(2): 807–818. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.05.001

Leon-Mercado, Luis et al. (2017). The Arcuate Nucleus: A Site of Fast Negative Feedback for Corticosterone Secretion in Male Rats. *eNeuro*, pii: ENEURO.0350-16.2017. doi: 10.1523/ENEURO.0350-16.2017

Li, Yuyuan et al, (2017), Prostaglandin E2 in the Regulation of Water Transport in Renal Collecting Ducts. *Int. J. Mol. Sci.* 18(12). pii: E2539. doi: 10.3390/ijms18122539.

Li, Zhonghua et al. (2006). Kupffer cell-generated PGE2 triggers the febrile response of guinea pigs to intravenously injected LPS. *AJP Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 290(5):1262-70.

Liu, Su et al. (2001). Involvement of the suprachiasmatic nucleus in body temperature modulation by food deprivation in rats. *Brain Research*, 929, 26–36.

Luong C et al (1996). Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2. *Nat Struct Biol*; 3(11):927-33.

Marvel, F. A. et al. (2004). Reversible inactivation of the dorsal vagal complex blocks lipopolysaccharide-induced social withdrawal and c-Fos expression in central autonomic nuclei. *Brain, Behavior, and Immunity*, 18(2):123-34.

McKinley, M. J. et al. (2001). Neural Pathways from the lamina terminalis influencing cardiovascular and body fluid homeostasis. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 28, 990–992.

McKinley, M. J. et al. (2004). Vasopressin Secretion: Osmotic and Hormonal Regulation by the Lamina Terminalis. *Journal of Neuroendocrinology* Vol. 16, 340-347.

McKinley, M. J. et al. (2015). The median preoptic nucleus: front and centre for the regulation of body fluid, sodium, temperature, sleep and cardiovascular homeostasis. *Acta Physiologica*, 214(1):8-32. doi: 10.1111/apha.12487.

Miller, Brooke H. & Takahashi Joseph S. (2013). Central circadian control of female reproductive function. *Frontiers in Endocrinology* 4:195, doi: 10.3389/fendo.2013.00195.

Minami, Takeshi et al. (1997). Roles of nitric oxide and prostaglandins in the increased permeability of the blood-brain barrier caused by lipopolysaccharide. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 5 35–41.

Maria Rosa Montinari et al (2019). The first 3500 years of aspirin history from its roots – A concise summary. *Vascul Pharmacol*; 113:1-8. doi: 10.1016/j.vph.2018.10.008

Morita, Shoko & Miyata, Seiji (2013b). Accessibility of low-molecular-mass molecules to the median eminence and arcuate hypothalamic nucleus of adult mouse. *Cell Biochemistry Function*, 31(8):668-77. doi: 10.1002/cbf.2953.

Morita, Shoko et al. (2013a). Changes in pericytic expression of NG2 and PDGFRB and vascular permeability in the sensory circumventricular organs of adult mouse by osmotic stimulation. *Cell Biochem Funct*, 32: 51–61.

Morita, Shoko et al. (2016). Heterogeneous vascular permeability and alternative diffusion barrier in sensory circumventricular organs of adult mouse brain. *Cell Tissue Res*, 363:497–511.

Müller-Fielitz, Helge et al. (2017). Tanycytes control the hormonal output of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Nature communications*, 8(1):484. doi: 10.1038/s41467-017-00604-6.

Murdoch, WJ et al. (1993). A review--role of eicosanoids in vertebrate ovulation. *Prostaglandins*, 46(2):85-115.

Nakamura, Kazuhiro et al. (1999). Immunocytochemical localization of prostaglandin EP3 receptor in the rat hypothalamus. *Neuroscience Letters*, 260 117–120.

Nakamura, Kazuhiro (2011). Central circuitries for body temperature regulation and fever. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 301: 1207–1228.

Narumiya, Shuh et al. (1999). Prostanoid Receptors: Structures, Properties, and Functions. *Physiological Reviews*, 79(4):1193-226.

Ohmura T et al. (2007). Regulation of lung endothelial permeability and inflammatory responses by prostaglandin A₂: role of EP₄ receptor. *Mol Biol Cell.*;28(12):1622-1635. doi: 10.1091/mbc.E16-09-0639.

Ojeda, S. R. et al. (1975). Effect of Inhibitors of Prostaglandin Synthesis on Gonadotropin Release in the Rat. *The Endocrine Society*, 97(4):843-54.

Ojeda, S. R. et al. (1979). Release of Prostaglandin Es by Hypothalamic Tissue: Evidence for Their Involvement in Catecholamine- Induced Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Release. *Endocrinology*, 104(3):617-24.

Ojeda, S. R. & Campbell, W. B. (1982). An Increase in Hypothalamic Capacity to Synthesize Prostaglandin E₂ Precedes the First Preovulatory Surge of Gonadotropins. *Endocrinology*, 111(4):1031-7.

Oka, Takakazu et al. (2000). Relationship of EP₁₋₄ Prostaglandin Receptors With Rat Hypothalamic Cell Groups Involved in Lipopolysaccharide Fever Responses. *The Journal of Comparative Neurology*, 428(1):20-32.

Oka, Takakazu et al. (2004). Prostaglandin E-2 as a mediator of fever: The role of prostaglandin (EP) receptors. *Frontiers in Bioscience*, 9:3046-57.

Oka, Takakazu et al. (2003). Characteristics of thermoregulatory and febrile responses in mice deficient in prostaglandin EP₁ and EP₃ receptors. *Journal of Physiology*, 551(Pt 3):945-54.

Olesen, Emma T.B. & Fenton, Robert A. (2013). Is There a Role for PGE₂ in Urinary Concentration?. *J Am Soc Nephrol*, 24(2):169-78. doi: 10.1681/ASN.2012020217.

Parnova, R. G. et al. (1997). Role of prostaglandin E₂ in regulation of low and high water osmotic permeability in frog urinary bladder. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1356(2):160-70.

Picot D et al. (1994). The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H₂ synthase-1. *Nature*. 1994 Jan 20;367(6460): 243-9.

- Piper PJ, Vane JR (1969). Release of additional factors in anaphylaxis and its antagonism by anti-inflammatory drugs. *Nature.*; 223(5201):29-35.
- Prevot, V. et al. (2010). Gonadotrophin-Releasing Hormone Nerve Terminals, Tanycytes and Neurohaemal Junction Remodelling in the Adult Median Eminence: Functional Consequences for Reproduction and Dynamic Role of Vascular Endothelial Cells. *Journal of Neuroendocrinology*, 22, 639–649
- Qiu X et al. (2014). COX2 and PGE2 mediate EGF-induced E-cadherin-independent human ovarian cancer cell invasion. *Endocr Relat Cancer* ;21(4):533-43. doi: 10.1530/ERC-13-0450.
- Rainsford KD (1999). Profile and mechanisms of gastrointestinal and other side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Am J Med.*;107(6A):27S-35S; discussion 35S-36S.
- Refinetti Roberto et al. (1995). Effects of Suprachiasmatic Lesions on Temperature Regulation in the Golden Hamster . *BrainResearchBulletin*, Vol.36, No. 1, pp. 81-84.
- Rodríguez, Esteban M. et al. (2005) Hypothalamic Tanycytes: A Key Component of Brain–Endocrine Interaction. *International Review of Cytology*, 247:89-164.
- Rodríguez-Cortés, Beatriz (2017). Influencias metabólicas y circadianas sobre el núcleo arqueado (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Rodríguez-Lagunas MJ et al. (2013). Effect of eicosapentaenoic acid-derived prostaglandin E3 on intestinal epithelial barrier function. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*; 88(5):339-45. doi: 10.1016/j.plefa.2013.02.001.
- Romanovsky et al. (2003). The organum vasculosum laminae terminalis in immune- to-brain febrigenic signaling: a reappraisal of lesion experiments. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 285(2): 420-8.
- Samuelsson B. et al. (1975). Prostaglandins. *Annu. Rev. Biochem.* 1975.44:669-695.

Sano, Hiroaki et al. (1995). Effects of Suprachiasmatic lesions on circadian rhythms of blood pressure, heart rate and locomotor activity in the rat. *Japanese Circulation Journal*, 59(8):565-73.

Sato, T. et al. (1974). Ovulation block by indomethacin, an inhibitor of prostaglandin synthesis: a study of its site of action in rats. *J Reprod Fertil*, 39(1):33-40.

Scales, Wendy E. & Kluger, M. J. (1987). Effect of antipyretic drugs on circadian rhythm in body temperature of rats. *American Physiological Society*, 253(2 Pt 2):R306-13.

Schindelin, J. et al. (2012), "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis", *Nature methods* 9(7): 676-682, PMID 22743772, doi:10.1038/nmeth.2019 (on Google Scholar)

Sherwood, Lauralee (2014). The Peripheral Endocrine Glands. In *Human Physiology: From Cells to Systems 9th Edition*. (pp. 682-684)

Shi, Yan-Chuan et al. 2013. Arcuate NPY Controls Sympathetic Output and BAT Function via a Relay of Tyrosine Hydroxylase Neurons in the PVN. *Cell Metabolism*, 17(2):236-48. doi: 10.1016/j.cmet.2013.01.006.

Sisó, Sílvia et al. (2010). Sensory circumventricular organs in health and disease. *Acta Neuropathology*, 120(6):689-705. doi: 10.1007/s00401-010-0743-5.

Stan, Radu V. et al. (2012). The Diaphragms of Fenestrated Endothelia: Gatekeepers of Vascular Permeability and Blood Composition. *Developmental Cell* 23, 1203–1218.

St-Louis, Ronald et al. (2012). Reactive Oxygen Species Are Required for the Hypothalamic Osmoregulatory Response. *Endocrinology*, 153(3):1317-29. doi: 10.1210/en.2011-1350.

Su KC et al. (2013). Bile acids increase alveolar epithelial permeability via mitogen-activated protein kinase, cytosolic phospholipase A2 , cyclooxygenase-2, prostaglandin E2 and junctional proteins. *Respirology* 18(5):848-56. doi: 10.1111/resp.12086.

Sugimoto et al. (1994). Distribution of the messenger RNA for the prostaglandin E receptor subtype EP3 in the mouse nervous system. *Neuroscience* 62: 919–928.

Sullivan, Lynn M. & Mathias, Melvin M. (1982). Eicosanoid production in rat blood as affected by fasting and dietary fat. *Prostaglandins Leukotrienes and Medicine* 9(2):223-33

Takahashi et al. (1997). Circumventricular organs and fever. *The American journal of physiology*, 273(5):R1690-5. doi: 10.1152/ajpregu.1997.273.5.R1690.

Tanaka, Mutsumi et al. (2009). Roles of two preoptic cell groups in tonic and febrile control of rat tail sympathetic fibers. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 296(4):R1248-57. doi: 10.1152/ajpregu.91010.2008.

Tanaka, Marcelo N et al. (2008). Prostaglandin E2-EP1 and EP2 receptor signaling promotes apical junctional complex disassembly of Caco-2 human colorectal cancer cells. *Cell Biol*; 9: 63, doi: 10.1186/1471-2121-9-63

Tansey, E. A. & Johnson, C. D. (2015). Recent advances in thermoregulation. *Adv Physiol Educ* 39: 139–148.

Tilton, Ronald G. et al. (1999). Role for Nitric Oxide in the Hyperpermeability and Hemodynamic Changes Induced by Intravenous VEGF. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 40:689-696.

Vane JR (1971). Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol.*;231(25):232-5.

Wan, Weihua et al. (1993). Neural and Biochemical Mediators of Endotoxin and Stress-Induced c-fos Expression in the Rat Brain. *Brain Research Bulletin*, 34(1):7-14.

Xu, Jie et al. (2018). Genetic identification of leptin neural circuits in energy and glucose homeostases. *Nature*, 556(7702):505-509. doi: 10.1038/s41586-018-0049-7.

Yamamoto, Hideki et al. (1987). Role of SCN in daily rhythms of plasma glucose, FFA, insulin and glucagon. *Chronobiol Int.* 1987;4(4): 483-91.

Zhang, J. & Rivest, S. (1999). Distribution, regulation and colocalization of the genes encoding the EP2- and EP4-PGE2 receptors in the rat brain and neuronal responses to systemic inflammation. *European Journal of Neuroscience*, 11(8):2651-68.

Zhang, Yunhui et al (2013). Determination of Prostaglandin E1 in dog plasma using liquid chromatography–tandem mass spectrometry and its application to a pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B*, 937, 97–102.

Zhang, Zhi-Hua et al. (2011). EP3 receptors mediate PGE2-induced hypothalamic paraventricular nucleus excitation and sympathetic activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 301(4): 1559–1569, doi: 10.1152/ajpheart.00262.2011.

Zimmerman, Christopher A. et al. (2016). Thirst neurons anticipate the homeostatic consequences of eating and drinking. *Nature*, 537(7622): 680–684.