



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

Cambios en el ritmo circadiano de la actividad locomotora en el ratón triple transgénico para la enfermedad de Alzheimer (3xTg-AD) en un protocolo de jet lag, correlaciones con la sensibilidad de la retina y marcadores histopatológicos en el núcleo supraquiasmático.

**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PRESENTA

M. en C. Irma Angélica González Luna

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Mauricio Díaz Muñoz

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR :

Dr. Manuel Miranda Anaya (UMDI-UNAM)

Dra. Sofía Y. Díaz Miranda (INB-UNAM)

Querétaro, México, diciembre 20121



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

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de este proyecto No: 221008.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM, Becario No: 94253342.

A mi tutor, Dr. Mauricio Díaz Muñoz por su amable y caluroso acompañamiento, porque junto con la Dra. Olivia Vázquez hacen del laboratorio B11 un lugar de trabajo, lleno de risas, comida, pasteles, alegrías, compañerismo y solidaridad. ¡Mil gracias por todo!

Al Dr. Manuel Miranda Anaya, por su enorme apoyo y asesoría siempre, por sus valiosas críticas, por su participación vital e invaluable en este proyecto, por su afecto y empatía, gracias Doctor, no lo hubiera logrado sin usted.

A la Dra. Sofía Diaz Miranda por la donación de los ratones (3xTg-AD y NoTg), por sus aportaciones al proyecto en cada tutorial, por sus palabras de aliento siempre.

A la Dra. Cinthia Juárez Tapia, por su valiosa y determinante participación, asesoría y apoyo en la realización de este proyecto, pero sobre todo por esos ratos de diversión absoluta y amistad desde el día que nos conocimos.

A la Dra. Edith Arnold por su amable y siempre dispuesta asesoría, además del préstamo del equipo necesario en la realización de los electrorretinogramas.

A la M. en C. Azucena Ruth Aguilar Vázquez por su asesoría y apoyo técnico, en las inmunohistoquímicas. Por tu amoroso acompañamiento Azu querida.

A la M. en C. Adriana González de la Unidad de Proteogenómica, por compartir su conocimiento en la realización de los PCR.

Al MVZ. Martín García por su gran trabajo y paciencia en el cuidado de los ratoncitos. A Angélica y Jorge Servín por el enorme apoyo técnico dentro del laboratorio y bioterio.

A mis padres, Josefina y Jesús que me han dado todo lo necesario para llegar a este punto de mi vida, sin ustedes jamás podría haberlo hecho. GRACIAS INFINITAS. A mis hermanitas Luz y Silvia que son mis compañeras de vida y que aunque no estemos cerca, sé que ahí están.

A Gerardo, por ser tan divertido y complicado, porque me ha enseñado que las contradicciones de la vida nos dan la posibilidad de explorar nuevos caminos y andarlos con valentía y mucho amor, ¡gracias amore!

A mi Cucharita preciosa (con esta van dos tesis para ti) que su sola presencia saca de mí una fuerza que no sabía que tenía, porque cada día de los 18 años que llevas conmigo aprendo algo que me acerca más a entender de lo que se trata esta vida. GRACIAS POR ACOMPAÑARME, TE AMO.

A mi Piquito lindo (de Picolicandia) porque volteaste mi mundo de cabeza y me enseñaste que las cosas llegan en el momento preciso, cuando es lo mejor y cuando estamos más preparados para recibirlos. Por ser mi gran maestra con tu sabiduría y tu alma vieja que siempre se manifiesta con las palabras precisas. TE AMO LOCAMENTE.

A mis hermanos que elegí hace 23 años, Gerardo y Paco, que me han sostenido siempre con su amor, sus palabras, sus poemas, su distancia y su visión sabia de la vida.

A mis amigas pseudoqueretanas, que me han acompañado con risas, llantos, alegrías y tristezas, palabras de aliento, regaños y sobre todo mucho cariño: Oliss, Caro, Candela, Mere, Deni, Marita y Paulina, las quiero muchísimooo, agradezco a la vida haberlas puesto en mi camino.

Se han descrito alteraciones circadianas de la actividad locomotora en ratones 3xTg-AD, pero no se han caracterizado completamente. Un cambio en el inicio de los ciclos luz/oscuridad (LD) induce una condición transitoria conocida como Jet lag, y se produce un realineamiento entre los osciladores centrales y periféricos a un ritmo diferente, lo que representa un desafío en el sistema circadiano. La presencia progresiva de las características histopatológicas del cerebro de la enfermedad de Alzheimer, como las placas amiloides y los ovillos neurofibrilares de la proteína tau hiperfosforilada, en zonas como la corteza, el hipocampo y el subiculum, se asocian con los efectos de la enfermedad en los procesos cognitivos, pero su presencia en el Núcleo Supraquiasmático (NSQ) ha sido poco explorada. En el presente estudio, comparamos ratones 3xTg-AD y ratones No transgénicos, a los 3, 8 y 13 meses, en el ritmo circadiano de la actividad locomotora después de un avance y retraso de fase para inducir un jet lag, en un ambiente sin rueda. Los ratones 3xTg-AD más jóvenes presentan diferencias en el ángulo de fase de la actividad, acrofase, efecto de enmascaramiento, ciclos transitorios hasta la sincronización y aumento de la actividad de manera diferencial después de los avances; además, se observó un acortamiento del período en libre movimiento en oscuridad constante en los ratones jóvenes. Para probar una posible disfunción retiniana que pudiera interferir con el efecto sincronizador fótico, comparamos el electroretinograma (ERG), y para evaluar las alteraciones locomotoras circadianas examinamos los marcadores histopatológicos cerebrales y la activación glial en el NSQ. Los resultados muestran un deterioro temprano de la respuesta retiniana a los destellos de luz en condiciones mesotópicas, observado en la amplitud de la onda B del ERG. No se observaron placas amiloides, pero sí la presencia incipiente de los ovillos neurofibrilares de la proteína hiperfosforilada a los 13 meses de edad. También encontramos de una reducción significativa de la gliosis del NSQ cuando la proteína Tau está presente. Este estudio aporta nuevas características conductuales y fisiopatológicas en los ratones 3xTg-AD en el ritmo de la actividad locomotora y la sensibilidad visual ante la presencia de marcadores histopatológicos en el NSQ.

PALABRAS CLAVE: Enfermedad de Alzheimer, ritmos circadianos, jet lag, núcleo supraquiasmático, actividad locomotora, retina.

Circadian alterations in locomotor activity have been described in 3xTg-AD mice, but they have not been fully characterized. A shift in LD conditions induce a transitory condition known as a Jet lag, and a realignment between central and peripheral oscillators occurs at a different rate representing a challenge in the circadian system. The progressive presence of the brain's histological characteristics of Alzheimer's disease such as amyloid plaques and neurofibrillary tangles of hyperphosphorylated tau protein, in areas such as cortex, hippocampus, and subiculum, are associated with the effects of the disease on the cognitive process, but their presence in SCN has been little explored. In the present study, we compared 3xTg-AD and no transgenic mice, at 3, 8, and 13 months old (Mo) the changes in locomotor activity circadian rhythms after an LD shift to induce a jet lag, in an environment without a wheel. Youngest 3xTg-AD mice present differences in activity's phase angle, acrophase, masking effect, transient cycles to entrainment, and increasing activity differentially after advances than after delays not described before; also, a shortening the free-running period in constant darkness was noted in young mice. To test a possible retinal dysfunction that could interfere with photic entrainment, we compared the electroretinogram, and to evaluate circadian locomotor alterations we examined brain histopathological markers and glial activation in the suprachiasmatic nucleus (SCN). Results show an early deterioration in the retinal response to light flashes in mesopic conditions, noted in B wave amplitude of ERG, but no amyloid plaques and incipient presence of the neurofibrillary tangles of hyperphosphorylated protein were noted at 13 Mo. We also report a significant reduction in SCN gliosis when the Tau protein is present. Thus, our study brings new behavioral and physiopathological characteristics in the 3xTg-AD mice in locomotor activity rhythm and visual sensitivity before the presence of histopathological markers in the SCN.

KEYWORDS: Alzheimer disease, circadian rhythms, jet lag, suprachiasmatic nucleus, locomotor activity, retina.

INTRODUCCIÓN

1. RITMOS CIRCADIANOS

1.1. Ritmos biológicos: definición y clasificación.....8

1.2. Ritmos circadianos: reloj endógeno en mamíferos.....11

1.3. Bases moleculares del reloj circadiano.....12

1.3. Vías de entrada.....14

 1.3.1. La luz, el principal sincronizador en mamíferos.....16

 1.3.2. Retina19

 1.3.3. Fototransducción.....20

 1.3.4. La retina como órgano de regulación circadiana.....21

 1.3.5. Electrorretinograma.....22

1.4. Centro de integración.....24

 1.4.1. El marcapaso: N. Supraquiasmático.....24

 1.4.2. Núcleo.....25

 1.4.3. Corteza.....26

1.5. Vías de salida.....26

 1.5.1. Actividad Locomotriz.....27

1.6. Sincronización.....29

 1.6.1. Jet Lag.....29

2. LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.....31

2.1. Patología amiloide.....32

2.2. Taupatía.....34

2.3. Gliopatía.....36

2.4. Astrocitos y ritmos circadianos.....37

3. RITMOS CIRCADIANOS Y ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.....	38
3.1. Alteraciones circadianas en la EA.....	38
3.2. N. Supraquiasmático y EA.....	39
3.3. Patologías oftálmicas y EA.....	40
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	40
HIPÓTESIS.....	41
OBJETIVOS.....	41
MATERIAL Y MÉTODOS.....	42
1. SUJETOS EXPERIMENTALES.....	42
2. REGISTRO DE ACTIVIDAD LOCOMOTRIZ.....	42
3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL (JET LAG Y LIBRE CORRIMIENTO).....	43
4. ANALISIS DE RITMO CIRCADIANO DE LA ACTIVIDAD LOCOMOTRIZ..	44
5. ELECTORRETINOGRAMAS.....	45
6. INMUNOHISTOQUÍMICA.....	45
7. ANÁLISIS DE DATOS.....	46
RESULTADOS.....	47
1. REGISTRO DE ACTIVIDAD LOCOMOTRIZ.....	47
2. ANÁLISIS ELECTORRETINOGRAMAS.....	52
3. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICA.....	56
DISCUSIÓN.....	58
CONCLUSIONES.....	63
BIBLIOGRAFÍA.....	66

1. RITMOS CIRCADIANOS

1.1. Ritmos biológicos: definición y clasificación

Un ritmo (Del lat. *rhythmus*, y este del gr. *ῥυθμός* *rythmós*, der. de *ῥεῖν* *reîn* 'fluir') es un orden acompasado en la sucesión o acaecimiento de las cosas (<https://dle.rae.es/ritmo>). Se puede interpretar entonces, que un ritmo biológico es la fluctuación de cualquier fenómeno dentro de un sistema biológico que se repite en intervalos regulares de tiempo. Estos ritmos biológicos, están relacionados con fenómenos geofísicos (mareas oceánicas, día solar, mes lunar o cambios estacionales), y sociales (actividades de depredadores y competidores), ambos aportan una presión selectiva a estos procesos de organización rítmica. De esta manera, los ritmos biológicos han favorecido la adaptación de los organismos vivos a los ciclos diurnos y estacionales del ambiente, lo que les ha permitido evolucionar y así favorecer su supervivencia (Brady et al., 1979).

Esta organización temporal y rítmica de los procesos fisiológicos, bioquímicos y conductuales de un organismo es fundamental, ya que permite activar mecanismos efectores antes de que se presente un cambio ambiental, funcionando como mecanismos anticipatorios, los cuales hacen posible la *homeostasis predictiva* (ej: secreción de cortisol), permitiendo al organismo responder con la máxima eficacia al menor costo energético (Kandel et al., 1997; Cardinali et al., 1999). Por el contrario, si se presenta una alteración en esta organización temporal, este funcionamiento armónico se puede ver tan comprometido, que se generen alteraciones fisiológicas, las cuales, si se mantienen en el tiempo pueden provocar estados patológicos de diversa índole.

Un organismo presenta dos tipos de *ritmos*: *exógenos*, aquellos que en condiciones constantes (sin influencia externa) no se manifiestan, es decir, requieren de un mecanismo cíclico del ambiente para poder expresarse (ejemplo: actividad locomotora); y *endógenos*, aquellos que en condiciones constantes, se manifiestan, dejando ver su naturaleza y frecuencia intrínseca, es decir, no requieren de una señal externa para que se presenten (Cermakian & Sassone-Corsi, 2002). Estos

ritmos endógenos se pueden ajustar a la presencia de una señal externa llamada sincronizador o *zeitgeber* (*Zeit=tiempo, geber=proveedor*) (Heyde et al., 2018). A este proceso de ajuste se le llama *sincronización*, que es cuando el periodo del ritmo biológico es igual que el periodo del ritmo geográfico, es decir, que los tiempos en que se presenta un ritmo endógeno y el sincronizador son los mismos. Cuando esto sucede, también se establece una *relación de fase* estable entre el sincronizador y el ritmo endógeno.

Se considera que los ritmos biológicos circadianos son la manifestación de una minuciosa y fina regulación fisiológica en el dominio del tiempo (Aguilar et al., 2007) De esta manera, la cronobiología se puede representar gráficamente de manera muy general con la participación de tres elementos: *Zeitgeber* (componente exógeno o ambiental), oscilador central (componente endógeno) y vías de salida o ritmos biológicos manifiestos, así como la relación entre ambos: la sincronización entre el componente exógeno y el endógeno, su acoplamiento y retroalimentación (Figura 1).

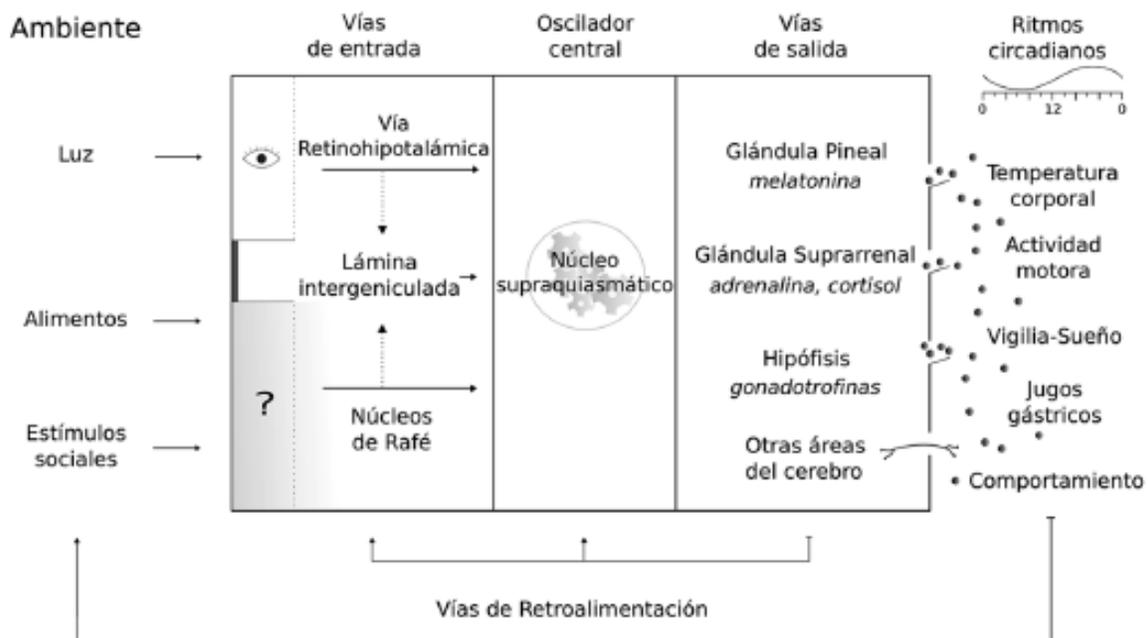


Figura 1. El sistema circadiano de mamíferos conformados por estímulos ambientales (luz, alimentos, ejercicio), vías de entrada (vía retinohipotalámica, lámina intergeniculada y núcleos del rafé) que llevan la información a un oscilador central (NSQ) que activa las áreas cerebrales y glándulas que mediante vías nerviosas y hormonas producen las oscilaciones en las constantes fisiológicas, actividad locomotriz, sueño (Caba 2015).

Según (García Fernández 1998), los ritmos biológicos se clasifican según la frecuencia en la que se presentan:

Ritmos de frecuencia media (período en curso libre de 30 min y 6 días):

- ✓ Ritmos ultradianos (menores a 30 min). Como las fases del sueño de ondas lentas y paradójico, el ritmo cardíaco y respiratorio.
- ✓ Ritmos circamareales (aprox. 12 h). La actividad de especies costeras.
- ✓ Ritmos circadianos (20-28 h). Permiten ordenar ciertas actividades y funciones como el ciclo sueño-vigilia, la actividad motora, la liberación de melatonina, la termorregulación, procesos relacionados con comportamiento como la búsqueda de alimento, refugio, etc.
- ✓ Ritmos infradianos (28 h – 6 días). Niveles hormonales de la glándula suprarrenal.

Ritmos de frecuencia baja (periodo en curso libre > 6 días).

- ✓ Ritmos circalunares (aprox. 29 días). La menstruación y la reproducción en animales de la zona intermareal.
- ✓ Ritmos circanuales (aprox. 356 días). Ritmos estacionales que ordenan comportamientos como la migración y la reproducción en especies estacionales, además de la hibernación y/o la estivación en condiciones extremas de temperatura y disponibilidad de alimento

Muchos de estos ritmos coexisten dentro de un mismo organismo, pero todos presentan los mismos componentes que se pueden analizar mediante una función sinusoidal (**Figura 2**).

- **Periodo:** es el intervalo de tiempo entre dos puntos de referencia idénticos que conforman una oscilación.
- **Mesor:** es la media aritmética, es decir, es el promedio de todos los valores que se obtienen a lo largo de un ciclo. En cronobiología esta media es a partir de la curva matemáticamente ajustada a un coseno o cosinor.
- **Amplitud:** es la magnitud en la variación del fenómeno, la cual podemos estimar desde la cresta o Acrofase (punto máximo) hasta el valle o Nadir (punto mínimo). En el caso de una señal con forma sinusoidal o cosenoidal se define como la diferencia entre la media y el valor máximo.

- **Fase:** es el momento en que ocurre un evento dentro del ciclo. La representación de los distintos ritmos se denomina *mapa de fases* e indica la relación temporal entre los distintos procesos fisiológicos.
- **Ángulo de fase:** es la diferencia de fases entre dos señales. Una corresponde al agente sincronizador y la otra a la variable indicadora (Ψ). Si una es la fase de referencia, cuando la fase de la otra variable ocurre antes, será un avance y si ocurre después, será un retraso de fase (Vega, 1993).

Entre los ritmos biológicos, los ritmos circadianos son los más estudiados en mamíferos, ya que se relacionan con el mantenimiento de la salud física, mental y con conductas sociales.

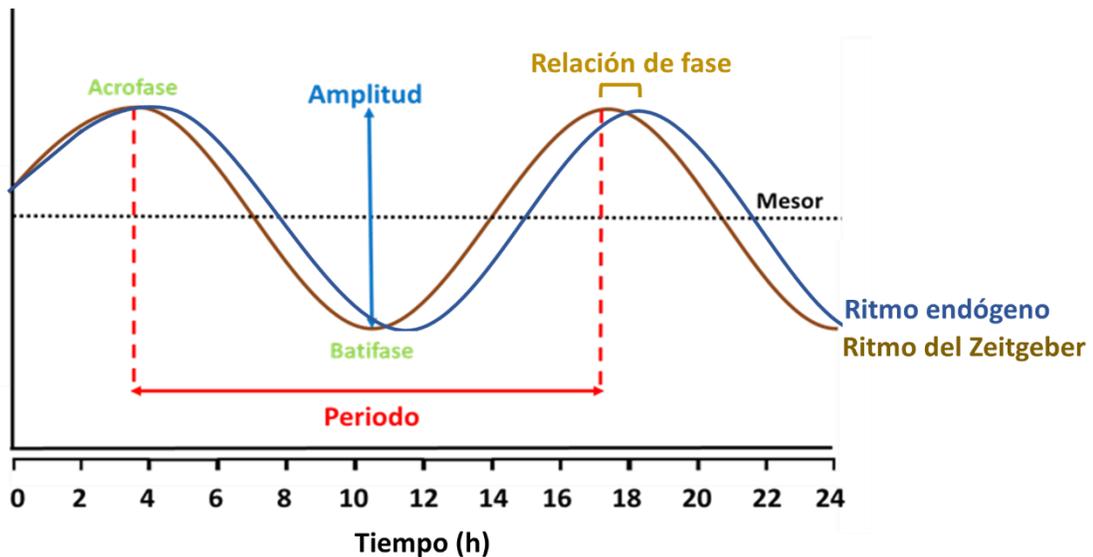


Figura 2. Esquema de los componentes de un ritmo.

1.2. Ritmos circadianos: reloj endógeno en mamíferos

Un ritmo circadiano (del latín *circa*—cerca y *diem*—día) es aquel que tiene una duración aproximada de 24 h, está sincronizado con el movimiento de rotación de la tierra (lo que determina las horas luz y oscuridad), y con esto conductas vitales para los organismos en la tierra, como los ciclo sueño-vigilia, picos hormonales, regulación de la temperatura, disponibilidad de alimento o reproducción. Estos procesos fisiológicos requieren una coordinación espacio-temporal muy fina, la cual se lleva a cabo gracias a la actividad eléctrica, celular y humoral de un *marcapasos*

o un reloj endógeno (Antle & Silver, 2005), el cual funciona como un director de orquesta que proporciona las señales precisas para que cada célula, órgano y/o tejido, generen su propia ritmicidad y lleven a cabo sus procesos de manera ordenada y eficiente. Esta función de marcapasos circadiano depende mayormente del Núcleo Supraquiasmático (NSQ), como lo demuestran los experimentos de lesiones donde se ha reportado la pérdida de la ritmicidad en la actividad locomotriz, en la regulación de la temperatura y secreción hormonal (Moore y Eichler, 1972; Kafka et al., 1985; Meijer y Rietveld, 1989; Albers et al., 1992). Igualmente, se ha demostrado que cuando se trasplanta tejido de un NSQ fetal dentro del tercer ventrículo, la ritmicidad de actividad locomotriz se restaura (Lehman et al., 1987). Al NSQ se le llama Marcapaso por estar genéticamente programado con los mecanismos que generan un ciclo de actividad eléctrica que dura 24 h aproximadamente y, porque se ocupa de sincronizar los ritmos periféricos con las señales fisicoquímicas que varían de manera natural con las 24 h de rotación de la tierra. Sin embargo, esto no quiere decir que la percepción y regulación del tiempo recaen únicamente en este núcleo. Diversidad de estudios demuestran que la representación del tiempo por parte de un organismo, depende de una comunicación precisa y sincrónica en cada una de las células y órganos que lo componen, los cuales modulan la actividad de diversas estructuras cerebrales y prácticamente de todos los tejidos periféricos que tienen el funcionamiento de osciladores, además, claro está, del medio ambiente externo (Challet et al., 2010).

1.3. Bases moleculares del reloj circadiano

Prácticamente todas las células nucleadas en el cuerpo de un mamífero contienen un reloj circadiano autónomo. Este reloj está formado por bucles o asas de retroalimentación transcripcional-traduccionales (TTFL por sus siglas en inglés), las cuales manejan las oscilaciones espontáneas de la expresión de genes y proteínas con un periodo circadiano. El asa positiva corre a cargo de los genes *Clock* y *Bmal1* (proteína similar al translocador nuclear 1 del receptor de aril hidrocarburos cerebral y muscular) mientras que el asa negativa está dada por los genes *Per* (Periodo) y *Cry* (criptocromo). Las proteínas codificadas por estos genes son CLOCK, BMAL1,

PER y CRY respectivamente. Esta maquinaria molecular (**Figura 3**) se echa a andar cuando CLOCK forma heterodímeros con BMAL1, que se une a cajas E-box para dirigir la transcripción rítmica de los genes *Per* y *Cry*, una vez transcritos, las proteínas PER y CRY forman heterodímeros, los cuales son transportados al núcleo donde se unen con dímeros CLOCK y BMAL1 actuando como potentes autorreguladores negativos al detener la transcripción de los genes *Per* y *Cry*. Al mismo tiempo, *Per2* estimula indirectamente la expresión de BMAL1 que lleva a la formación de heterodímeros CLOCK: BMAL1 que a su vez estimula la transcripción de *Per/Cry* para iniciar nuevamente el ciclo. Además, CLOCK: BMAL1 activan la transcripción de un receptor huérfano nuclear denominado Rev-Erb α que reprime la transcripción de *Bmal1* al unirse a la secuencia específica Rev-Erb α /ROR de su promotor, dando como resultado una caída en los niveles del RNAm de *Bmal1*, mientras que los niveles del RNAm de *Per* y *Cry* se incrementan. Cuando las proteínas CRY: PER se traslocan al núcleo para inhibir la transcripción de *Per* y *Cry* también inhiben la transcripción de Rev-Erb α lo que resulta en la activación de la transcripción del gen *Bmal1*. Además, las proteínas reloj también están sujetas a modificaciones post-transduccionales que parecen controlar su localización celular, su estabilidad y por tanto su actividad. Por ejemplo, la Caseína cinasa I ϵ y δ (CKI ϵ / δ) un factor crítico de regulación de PERs y CRYs en mamíferos. Muchos de ellos son en sí mismos factores de transcripción, por lo que dirigen cascadas de expresión génica. Ellos amplifican la señal circadiana de TTFL y coordinan a programas circadianos de expresión de genes célula y tejido específicos. Estos programas son el origen de nuestros ciclos fisiológicos, metabólicos y conductuales circadianos adaptativos (Chi-Castañeda & Ortega, 2017; Patton & Hastings, 2018).

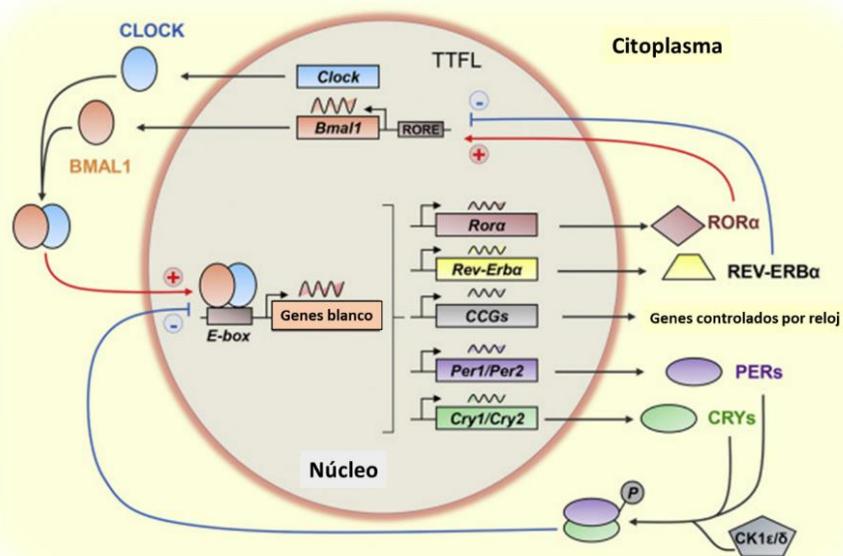


Figura 3. Asas transcripcionales del reloj molecular en mamíferos. En el asa central con el heterodímero CLOCK/BMAL1 activa la transcripción de los genes *Per* y *Cry* por la unión a los elementos E-box en sus propias regiones promotoras. Las proteínas resultantes PER y CRY heterodimerizan y se traslocan al núcleo e interactúan con el complejo CLOCK/BMAL1 para inhibir su propia transcripción. En resumen, ROR activa y REV-ERB reprime la transcripción mediada por RORE, formando el asa secundaria de autorregulación. Además de controlar la expresión rítmica de los llamados Genes controlados por reloj (CCG) (Baño-Otálora & Piggins, 2017).

1.4. Vías de entrada

Una de las principales vías aferentes del Núcleo Supraquiasmático son los ojos, órganos típicamente considerados por su funcionamiento visual, pero que contienen una función circadiana intrínseca a través de los fotorreceptores, donde la información eléctrica inducida por la luz (lumínica) viaja por el nervio óptico hacia el cerebro, particularmente un grupo de axones conocido como el Tracto Retinohipotalámico (TRH), el cual termina en la parte ventral o retinocipiente del NSQ. Este TRH trae información de las células ganglionares de la retina que expresan melanopsina y que son intrínsecamente fotosensibles (iPRGCs, por sus siglas en inglés), para sincronizar el funcionamiento de las células del NSQ a los ciclos de luz-oscuridad en ausencia de fotorreceptores convencionales como los conos y bastones. Estas iPRGCs, a través de la melanopsina, se despolarizan en respuesta a la luz y permite la liberación de glutamato, péptido activado por la

Adenilato ciclasa pituitaria (PACAP, por sus siglas en inglés) y péptido intestinal vasoactivo (VIP, por sus siglas en inglés) en las terminales del TRH en el NSQ (Hankins et al., 2008) (**Figura 4**). También por aferencias fóticas desde la hojuela intergeniculada (IGL) de los núcleos talámicos hacia la región ventrolateral del NSQ (Golombek y Rosenstein 2010). Esta activación eléctrica activa cascadas de señalización intracelular que promueven la inducción de genes reloj, como *Per* y genes de expresión temprana como *c-Fos* que determinan ajustes de fase en las oscilaciones en el NSQ, de manera que cuando se evitó la generación de potenciales de acción se observó la disminución gradual de la expresión de genes reloj y sus proteínas en neuronas del NSQ (Aguilar et al., 2008; Patton & Hastings, 2018). Existen también otras aferencias no fóticas (información sensorial como ruidos, temperatura o movimiento), al NSQ que llegan del tálamo no visual, del cerebro medio, y del núcleo del Raphé del tronco encefálico, éstas estructuras funcionan a través del neuropéptido Y, dopamina y serotonina (Golombek y Rosenstein 2010).

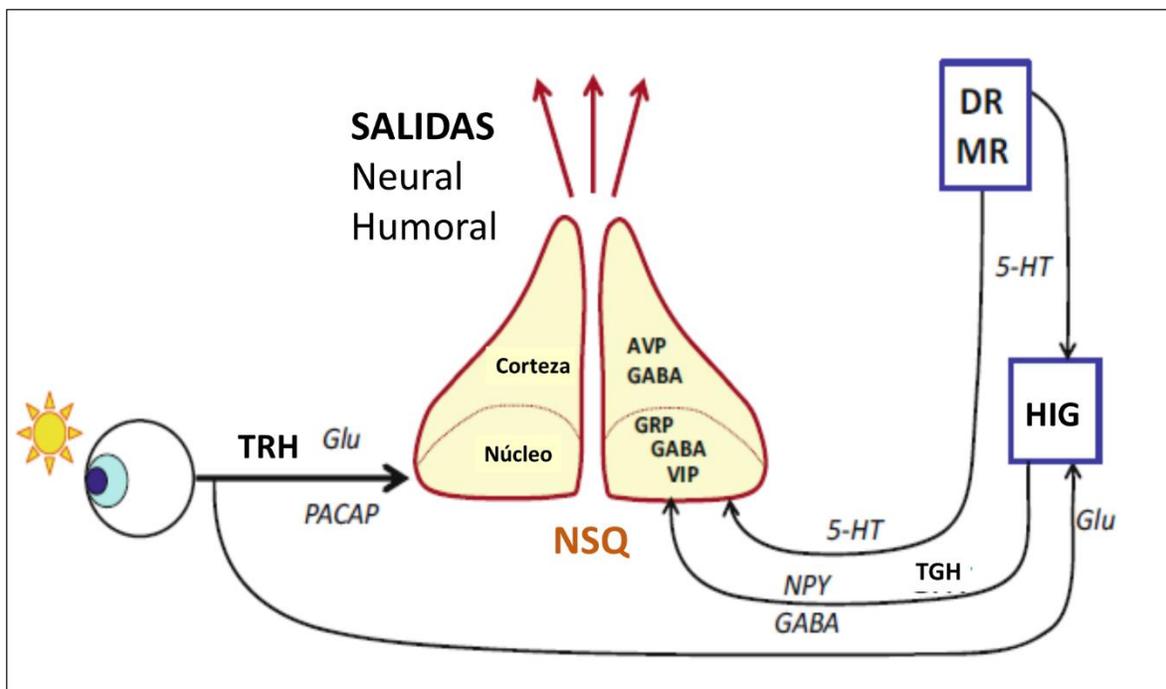


Figura 4. Entrada de luz a través de la retina hasta el Núcleo Supraquiasmático (Núcleo). La hojuela Intergeniculada (HIG) también es aferencia al NSQ (Baño Otalora & Piggins 2017).

1.3.1. La luz, el principal sincronizador en mamíferos.

El ciclo natural de la luz diaria es consecuencia de la rotación de la tierra sobre su propio eje. Éste fenómeno permite que los organismos vivos que habitan en la tierra estén supeditados a los ciclos luz-oscuridad de 24 h, la correcta sincronización circadiana permite a los organismos mantener en balance la conducta, los ciclos de sueño y el estado energético. A la luz se le considera el principal *zeitgeber* o sincronizador en mamíferos, dotando a los organismos de la señal precisa y óptima para iniciar un proceso de sincronización interna y con el ambiente externo, lo que permite la anticipación de los organismos a los cambios en el ambiente y asegurar su supervivencia. En los mamíferos, la retina es el único órgano fotosensible, lo que significa que es ahí donde se lleva a cabo la detección de la cantidad de luz ambiental, gracias a los fotorreceptores, conos y bastones, y especialmente gracias a la melanopsina, el fotorreceptor que se expresa en un pequeño grupo de células ganglionares y que genera una respuesta con su pico máximo con una luz de ~480 nm, la cual corresponde a la porción azul del espectro visual (Hankins et al., 2008). Como ya se dijo, el NSQ se ajusta a las señales luminosas externas, a través del TRH, el cual se forma en parte por los axones de las iPRGC, éstas liberan glutamato, PACAP (VIP) en las terminaciones que contactan con las neuronas del NSQ. Estos neurotransmisores se unen a sus respectivos receptores en la membrana plasmática de las neuronas del NSQ, produciendo la entrada de calcio a la célula, activando diversas cinasas. La magnitud y dirección de la respuesta a la luz son fase-dependiente de la hora en que se presenta el estímulo luminoso, cambiando también las vías de señalización intracelular que se activan en las neuronas del NSQ. Es decir, si el estímulo se aplica durante la primera mitad de la noche, el calcio que ingresa a la neurona induce la liberación de calcio de los depósitos intracelulares a través de los receptores a rianodina; el calcio que entra al citosol se une a calmodulina (CaM) y el complejo calcio/CaM activa a la cinasa CaMK-II, la cual fosforila a la proteína CREB (cAMP response element binding, por sus siglas en inglés). CREB interactúa con el CRE (elemento de respuesta al AMPc, por sus siglas en inglés) induciendo la expresión del gen *Per* provocando un retraso

en el reloj circadiano (**Figura 5**). De manera diferencial, si el estímulo luminoso se aplica durante la segunda mitad de la noche, la entrada de calcio extracelular activa el óxido nítrico sintetasa (NOS) que induce la síntesis de óxido nítrico (NO), el NO estimula la formación de guanosina monofosfato cíclico (cGMP), el cual activa la proteína cinasa G (PKG), induciendo la expresión de genes reloj para inducir avance de fase en el reloj circadiano (Mercado-López, 2011; Morse & Sassone-Corsi, 2002).

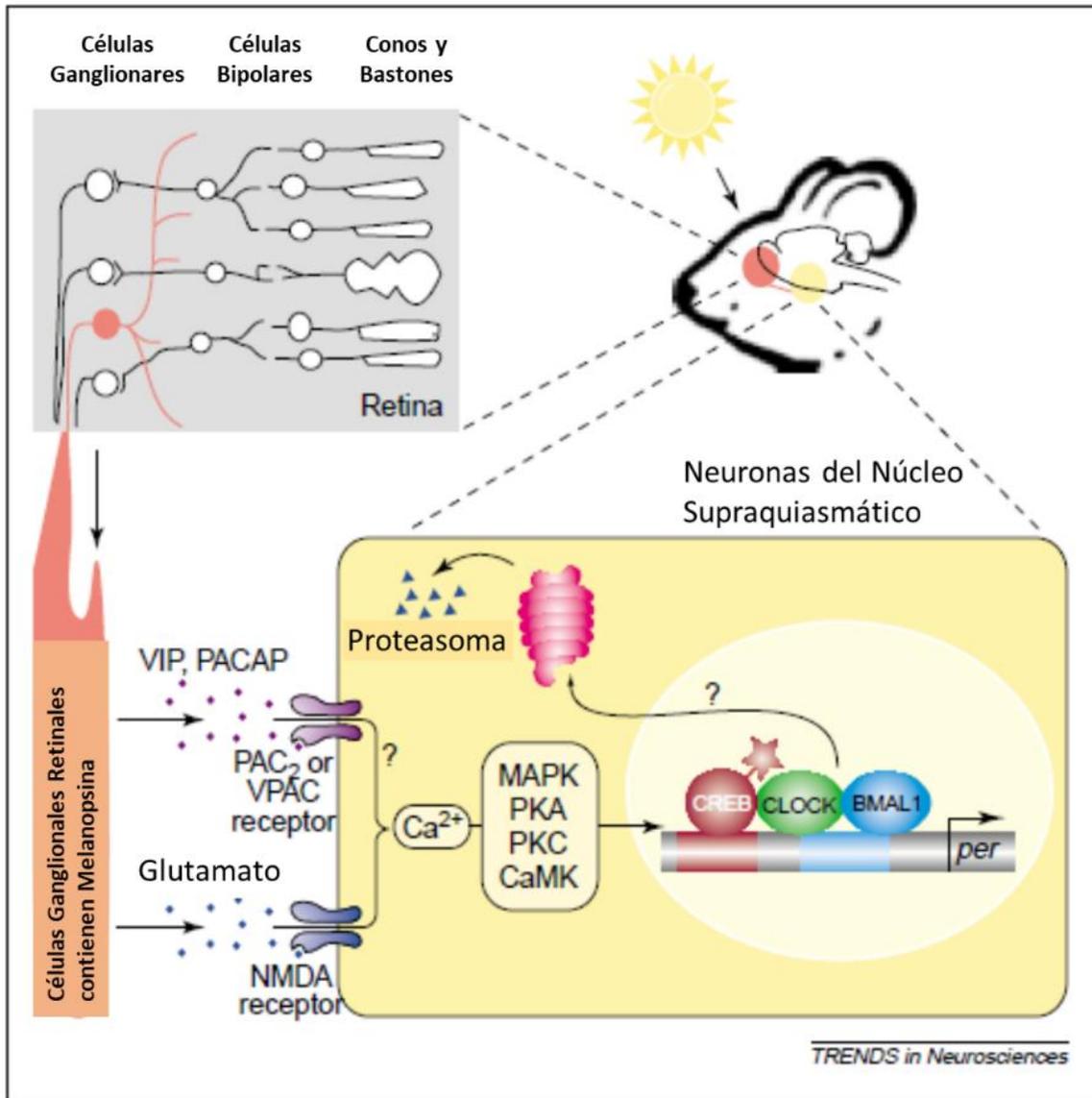


Figura 5. Esquema que muestra el circuito en la retina por el cual las células ganglionares proyectan al NSQ. Esquema modificado de Morse & Sassone-Corsi 2002.

Existen dos tipos de sincronización, según la velocidad con que se logra (**figura 6**). Es un reajuste de Tipo 0 cuando hay desplazamientos de fase hasta de 12 horas y se produce mediante la reducción previa de la amplitud del reloj circadiano. Un reajuste de Tipo 1 se caracteriza por pequeños cambios de fase de sólo unas horas con poca o ninguna reducción de la amplitud del marcapasos circadiano. Si se administra un estímulo luminoso, de intensidad intermedia durante la noche biológica en el punto de transición entre los cambios de retraso y avance de fase, puede reducir la amplitud de la oscilación a cero. Esto se denomina reajuste crítico, en el que no se puede determinar la fase con ausencia de los ritmos circadianos conductuales (Gooley 2017; Czeiler et al., 1989).

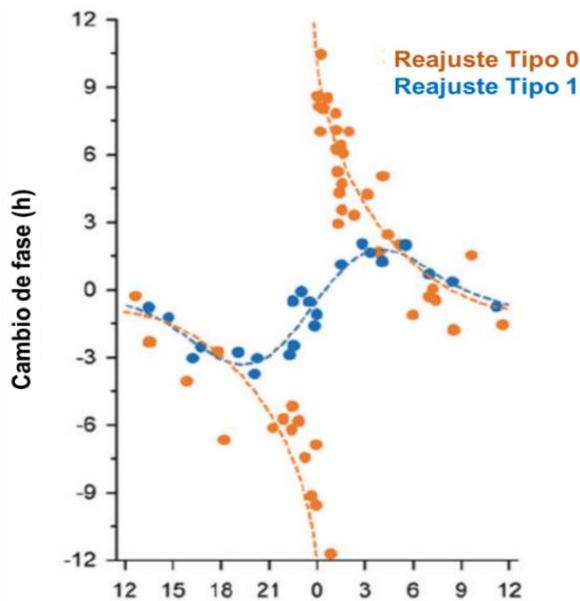


Figura 6. Reinicio circadiano fase-dependiente. El sistema circadiano humano muestra un reajuste de tipo 0 en respuesta a tres ciclos de exposición a luz blanca brillante (5 h, ~10.000 lx), mientras que el reajuste de tipo 1 se observa para una única exposición a la luz blanca brillante (6,7 h, ~10.000 lx). La fase circadiana de la exposición a la luz se representa en relación con el mínimo de la temperatura corporal (CBT) ritmo corporal central (CBT), definido como fase inicial. Por convención los desplazamientos de retraso de fase se indican por valores negativos en la curva de respuesta de fase (Czeisler et al., 1989).

Cuando se da la exposición a la luz, ésta tiene efectos indirectos sobre la conducta y sobre la función de órganos periféricos que suelen tener influencia del NSQ. Al ser la luz independiente del NSQ, no permite observar el control que tiene el NSQ sobre la salida fisiológica observada, a esto se le llama *enmascaramiento*, ya que promueve la respuesta inmediata de funciones como la actividad locomotriz, la secreción de melatonina, el aumento de glucosa en sangre, niveles de corticosterona y reducción de la frecuencia cardíaca que de manera regular presentan una regulación circadiana. Estos efectos pueden darse a través de fibras

simpáticas que no pasan por el NSQ, debido a que las células ganglionares de la retina tienen diferentes blancos como la zona hipotalámica subventricular (Challet 2010).

1.3.2. Retina

La retina de los mamíferos consiste en seis clases de neuronas: los fotorreceptores conos y bastones, las neuronas horizontales, bipolares, amácrinas y ganglionares (éstas últimas son las células de proyección hacia el encéfalo) cada una con múltiples subtipos ordenadas en 3 capas nucleares y 2 sinápticas como se muestra en la **figura 7**. En términos generales la retina se divide en dos grandes capas, la capa externa y la interna. La capa nuclear externa contiene los cuerpos celulares de los conos y bastones, la capa nuclear interna contiene los cuerpos celulares de las células bipolares, horizontales y amácrinas y dividiendo a estas capas se encuentran dos capas de neurópilo donde se hacen los contactos sinápticos. La capa plexiforme externa (OPL) donde se conectan conos y bastones, y de manera vertical las células bipolares y horizontales. La capa plexiforme interna (IPL), es una estación de relevo para las células bipolares que conectan con las células ganglionares. Junto con estos tipos celulares conviven las células de Müller, el componente glial de esta estructura nerviosa. Las proteínas y genes reloj se localizan principalmente en la capa interna de la retina (células horizontales, bipolares, amácrinas dopaminérgicas y ganglionares) (Ruan et al., 2006) y están prácticamente ausentes en fotorreceptores (Szegedi et al., 2020).

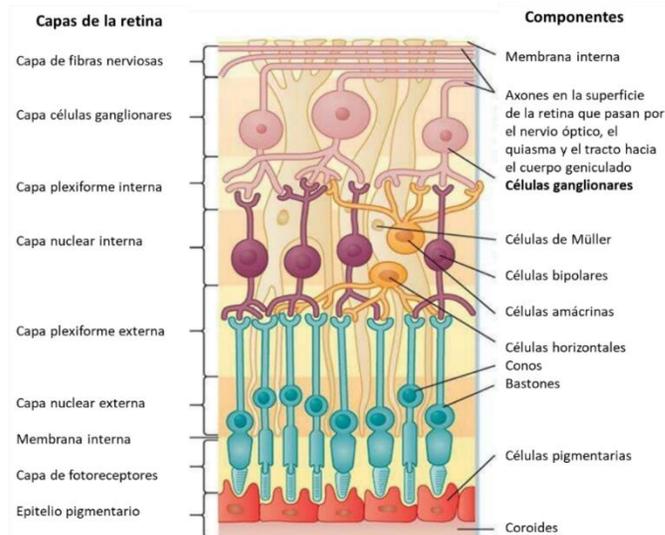


Figura 7. Organización celular de la retina. Modificado de Koeppen & Stanton, 2008.

1.3.3. Fototransducción

La fototransducción es el mecanismo por el cual las células encargadas (fotoreceptores) transforman un estímulo luminoso en una señal eléctrica. La retina de mamíferos contiene dos tipos de fotoreceptores: conos y bastones, responsables de la visión diurna y nocturna respectivamente. Ambos tipos celulares se conforman de un segmento externo (encargado de la fototransducción), un segmento interno (la maquinaria biosintética) y una terminación sináptica (donde hacen contacto con otras células). El segmento externo se compone de una membrana plasmática plegada en forma de discos independientes en el caso de los bastones y continuos, en el caso de los conos. Esta amplia superficie membranosa permite la inserción de la mayor cantidad de proteínas fotorreceptoras (opsinas), la rodopsina en los bastones y la conopsina en los conos. Estas opsinas son proteínas de 7 dominios transmembranales (**Figura 8**) que se unen a proteínas G, en ellas se insertan los cromóforos, 11-cis-retinaldehído que con el contacto con la luz (fotón) se isomeriza y pasa de su forma 11-cis, a su forma trans, este cambio conformacional activa a la proteína G (transducina), la cual induce la activación de la fosfodiesterasa del monofosfato cíclico de guanosina (cGMP, por sus siglas en inglés). En la oscuridad, el GMP mantiene abierto un canal catiónico (Na^+) que regula una corriente despolarizante o “corriente oscura”. que permite la secreción tónica del glutamato por parte del fotorreceptor hacia los receptores presentes en las células bipolares, permitiendo la generación de potenciales de acción. Esto provoca que la concentración citoplásmica del nucleótido disminuya, permitiendo que los canales disparados por cGMP se cierren y se produzca la hiperpolarización del fotorreceptor lo que interrumpe la liberación de glutamato y con ello la excitación del siguiente tipo de células, las ganglionares (CG), las cuales llevan esta información a través del nervio óptico (por acción del PACAP) hasta llegar al encéfalo para la formación de imágenes. Las ipRGC que expresan melanopsina envían sus axones al NSQ para regular la sincronización de los ritmos circadianos en respuesta a los cambios en los niveles de luz del entorno (Dominguez-Solís y Pérez-León 2015).

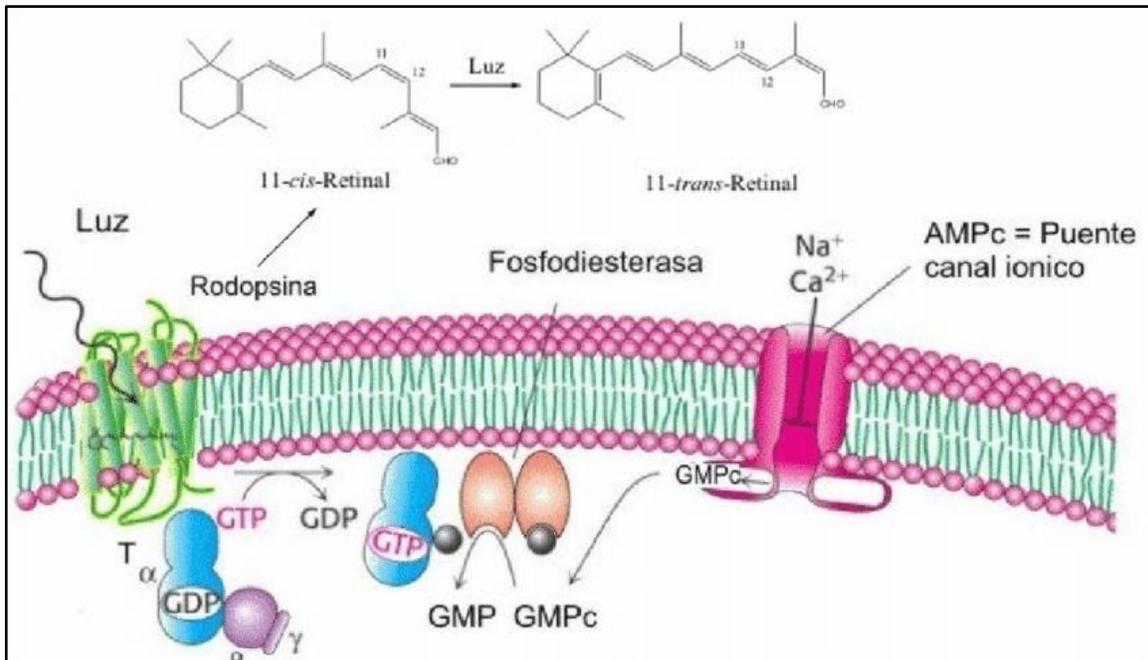


Figura 8. Fototransducción (Zepeda Velázquez y Lira Rocha 2017).

1.3.4. La retina como órgano de regulación circadiana

La retina posee un sistema completo de reloj circadiano: una *vía de entrada* por la cual la luz sincroniza la ciclicidad del reloj retinal a los ciclos de luz-oscuridad, una *maquinaria molecular*, expresa los genes y proteínas reloj Per1, Clock y Bmal1 en los fotorreceptores, generando oscilaciones de 24 h; una *vía de salida* neuroquímica que transmite la influencia del reloj a través de la retina al resto del cerebro (McMahon et al., 2014). De manera inversa, la retina recibe inervación y entrada hormonal del cerebro (incluyendo al NSQ), lo cual permite que el reloj central regule la ritmicidad (Smeraski et al. 2004; Korf and von Gall 2006).

Esto permite la generación de oscilaciones de 24 h en temperatura, la expresión de genes, la comunicación sináptica y metabolismo de la misma retina. Esto le da la capacidad de la anticipación de procesos fisiológicos (liberación de la melatonina, la síntesis de dopamina y GABA, la amplitud de la onda b del ERG, etc) ante los cambios en los ciclos ambientales de luz y oscuridad, lo cual es vital para la correcta adaptación del organismo (McMahon et al., 2014).

Las ipRGC son tan sólo el 5% del total de las células ganglionares y son las encargadas de funciones no visuales como la constricción pupilar, regulación

neuroendócrina y la sincronización circadiana, esto último gracias a que actúan como fotorreceptores por la acción de la melanopsina, un cromóforo homólogo a la rodopsina y conopsina. Esto se supo cuando depletaron el gen de la melanopsina en ratones (knockout de *Opn4*) y éstos no respondieron a los pulsos de luz, además de que los cambios de fase se vieron deteriorados, presentaron problemas en el reflejo pupilar y en la fotosincronización (Panda et al., 2002; Lucas et al., 2003; Lucas, 2013).

Las ipRGCs, son mucho más sensibles a la luz de 480 nm, esto es más o menos 20 nm de diferencia entre la sensibilidad de los fotoreceptores clásicos. A diferencia de los fotoreceptores ciliares (conos y bastones de vertebrados), los receptores rabdoméricos (en invertebrados, y las ipRGCs) utilizan la cascada de señalización a través de la fosfolipasa C (PLC, por sus siglas en inglés) y río abajo el fosfatidilinositol bifosfato (PIP2, por sus siglas en inglés), permitiendo la apertura de canales iónicos y despolarización de la membrana, éstos usan proteínas G de la familia Gq/11 (Graham & Wong, 2008). Hay 5 tipos de ipRGCs (M1-M5), las cuales tienen diversas propiedades biofísicas como la resistencia membranal, la capacitancia, las corrientes de calcio y potasio, pero todas son más sensibles en condiciones de oscuridad. Los axones de estas células llegan a la parte retinorecipiente del NSQ, donde esta información regula la secreción de la melatonina de la glándula pineal al torrente sanguíneo, desde el NSQ, a los núcleos paraventricular del hipotálamo, al núcleo intermedio lateral de la espina dorsal, de ahí pasa por el ganglio cervical superior, hasta llegar a la glándula pineal (Saptadip, 2020).

1.3.5. Electrorretinograma

El electroretinograma representa la forma más accesible para explorar la función retinal, siendo una representación gráfica de cambios en los potenciales de campo eléctrico inducidos por un el estímulo luminoso. Esta herramienta en su modalidad flash (empleada en este estudio), evidencia la integridad y la transferencia de información a través de la retina, y puede definir el origen celular de manera general gracias al aspecto individual de la forma de las ondas producto del estímulo

luminoso (Cameron et al., 2008). El electroretinograma tiene diversos componentes u ondas (**Figura 9**).

Onda A: Es el primer componente de un ERG refleja el primer evento en la transducción visual, el potencial negativo generado por la activación de conos y bastones por el flash de luz, siendo en los ratones mayor la participación de los bastones debido a que es una especie nocturna y el número de conos que posee es menor al humano que es una especie diurna (Cameron et al., 2008).

Onda B: el segundo componente y más notable por su tamaño es la onda B, que es una deflexión positiva reflejando la actividad del grupo de neuronas de segundo orden, principalmente células bipolares ON. La hiperpolarización de células bipolares y horizontales contribuye de manera subsecuente a la repolarización después del pico de la onda B (Cameron et al., 2008).

Potenciales oscilatorios, frecuentemente aparecen superpuestas en la onda b, se acepta que el origen generalmente proviene de la activación de neuronas de tercer orden (amácrinas y/o ganglionares) (Cameron et al., 2008).

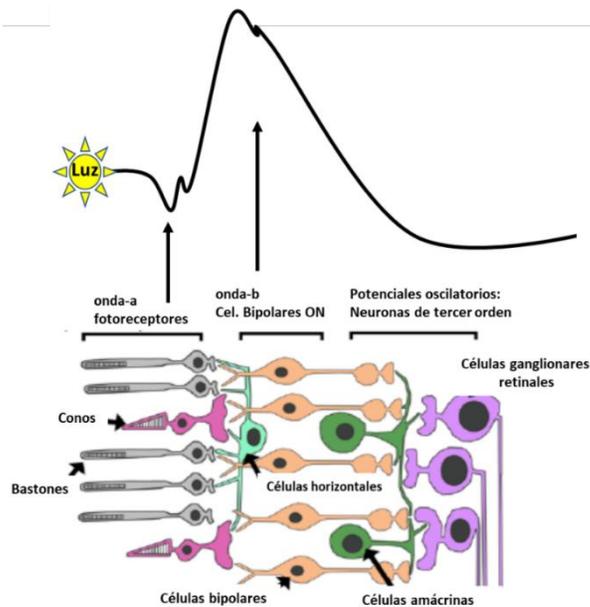


Figura 9. Representación esquemática de un ERG flash (arriba) y las células encargadas de cada componente (abajo). En el eje X tiempo, eje Y voltaje, unidades arbitrarias), la flecha amarilla indica el momento del flash. La deflexión negativa es la onda a originada por la activación de los fotoreceptores. El siguiente paso, es la activación de las de las células bipolares ON (origen de la onda b, la deflexión positiva). Subsecuentemente las células bipolares activan las células ganglionares, las cuales pasan la señal de la luz al nervio óptico. Las células horizontales y amácrinas modulan el flujo de la señal a través de la retina y contribuyen a los potenciales oscilatorios (ondas de alta frecuencia super impuestas sobre la onda b). Modificado de Cameron et al., 2008.

1.4. Centro de integración

1.4.1. El marcapaso: N. Supraquiasmático

El núcleo supraquiasmático (NSQ) de los mamíferos, es una estructura hipotalámica, localizada bilateralmente cerca de la línea media del cerebro, en la porción ventral del hipotálamo anterior y dorsal al quiasma óptico, contiene cerca de 20,000 neuronas densamente agrupadas (**Figura 10**). La actividad de este grupo celular genera una representación interna del tiempo mediante su actividad eléctrica intrínseca, autosostenida y sincronizada. Esta información envía señales de salida que llegan a otros órganos y que sirven para organizar los procesos fisiológicos con una precisión temporal exquisita. La capacidad intrínseca de las células de organizarse para establecer una estructura dinámica e interconectada se entiende como una *propiedad emergente* (Kuhlman et al., 2007). El NSQ tiene carácter marcapasos debido al fuerte acoplamiento intercelular que proporciona la actividad rítmica sináptica electrofisiológica. Este acoplamiento está acompañado de un control molecular de las oscilaciones rítmicas eléctricas en el NSQ, el cual se da por la expresión cíclica de conductancias hiperpolarizantes de potasio durante la noche y conductancias despolarizantes de sodio durante el día. Las neuronas del NSQ presentan oscilaciones en el potencial de membrana de entre 6 a 10 mV, comenzando a despolarizarse durante el inicio del día subjetivo con un potencial de membrana en reposo de -55 y -50 mV y generando potenciales de acción en frecuencias cercanas a las 10 Hz. (Kuhlman y McMahon, 2004; Patton AP & Hastings MH, 2018). Sin embargo, el mecanismo exacto por el cual se generan estos ritmos eléctricos y la manera en la cual se unen al reloj molecular, es aún desconocido. Existen candidatos para esta función, y son los segundos mensajeros, como las oscilaciones circadianas de AMP cíclico y calcio, dado que los genes *Per* contienen elementos de respuesta a cAMP (CREs, por sus siglas en inglés) en sus promotores. Los niveles de cAMP en el NSQ tienen su pico en el día circadiano, lo cual correlaciona con el pico de disparo neuronal de Ca^{2+} . En contraste las células astrogliales tiene su pico en antifase a las oscilaciones neuronales, es decir en la noche cuando las neuronas son inactivas (Patton AP & Hastings MH, 2018).

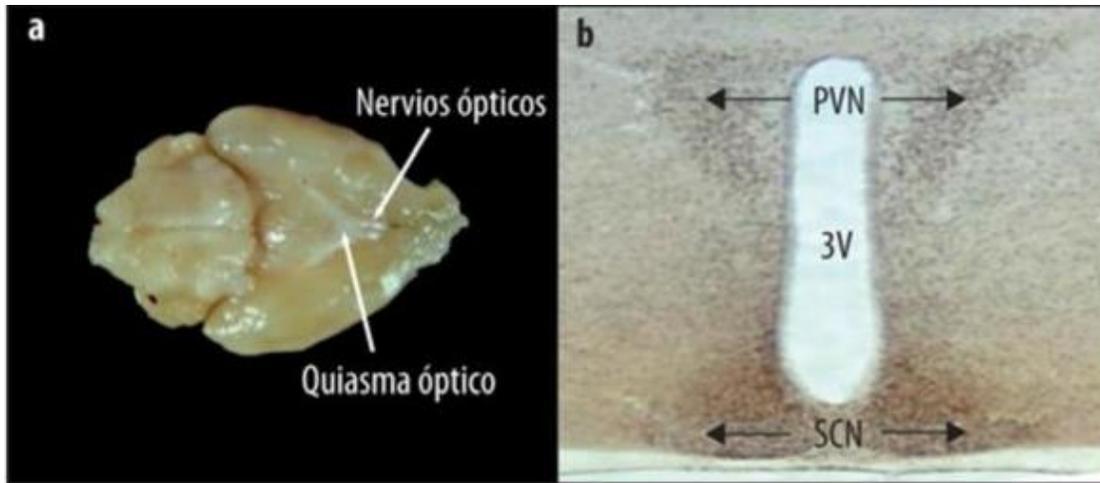


Figura 10. a. vista ventral del cerebro de ratón dónde se ve el quiasma y ambos nervios ópticos. b. Fotografía del NSQ ubicado dorsalmente al quiasma óptico, cada núcleo a los lados del tercer ventrículo (3V), y en la parte superior el Núcleo Paraventricular.

El principal neurotransmisor que se encuentra en el NSQ es el ácido gama aminobutírico (GABA), lo sintetizan prácticamente todas las neuronas, y actúa a través de dos vías: una a través de receptores ionotrópicos (GABA_A) y metabotrópicos (GABA_B) (Ono et al., 2020). La señalización GABA_A se sugiere es opuesta a la señalización de VIP, de manera que mantiene las diferencias de fase de las subpoblaciones neuronales del NSQ que codifican la longitud del periodo, esta señalización está presente principalmente en la región dorsal durante periodos largos. La señalización a través de receptores GABA_B, ubicados mayormente en la región dorsal correspondiente a la región de neuronas AVP positivas; la manipulación farmacológica de los receptores GABA_B puede cambiar la fase de los ritmos eléctricos si se activan, atenúan las respuestas a la luz e influyen la liberación de GABA mediante la autorregulación de canales de calcio voltaje dependientes (Patton AP & Hastings MH, 2018). El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio del NSQ, el cual ejerce su acción despolarizando neuronas del NSQ a través de receptores ionotrópicos y metabotrópicos (Caba et al., 2008).

Anatómica y funcionalmente, el NSQ presenta dos subdivisiones principales: el núcleo y la corteza, diferenciándose por los neurotransmisores que prevalecen en ellas y su correspondiente funcionamiento.

1.4.2. Núcleo

Es la región ventrolateral (inmediatamente dorsal al quiasma óptico), la cual está poblada por neuronas que expresan el VIP y el péptido liberador de gastrina (GRP, por sus siglas en inglés) principalmente, mismas que co-localizan con las que expresan GABA; a esta región se le ha denominado también centro, núcleo o retinoreciciente, ya que aquí es donde se concentran las aferencias de la retina. Esta zona del NSQ es particularmente importante para la resincronización mediada por luz gracias a la actividad de las neuronas que expresan VIP (Jones JR 2018). Así mismo, la pérdida de sus receptores VPAC2 resulta en comportamiento arrítmico, no repuesta a la luz, deterioro en el ritmo de las TTFL (Patton AP & Hastings MH, 2018).

1.4.3. Corteza

A la otra subdivisión, la región dorsomedial, se le ha llamado corteza, la cual rodea a la región ventrolateral y en donde se encuentran neuronas que contienen arginina vasopresina (AVP) colocalizando también con GABA, esta zona recibe aferencias del núcleo y dirige las salidas a otras regiones corticales y subcorticales (**Figura 11**).

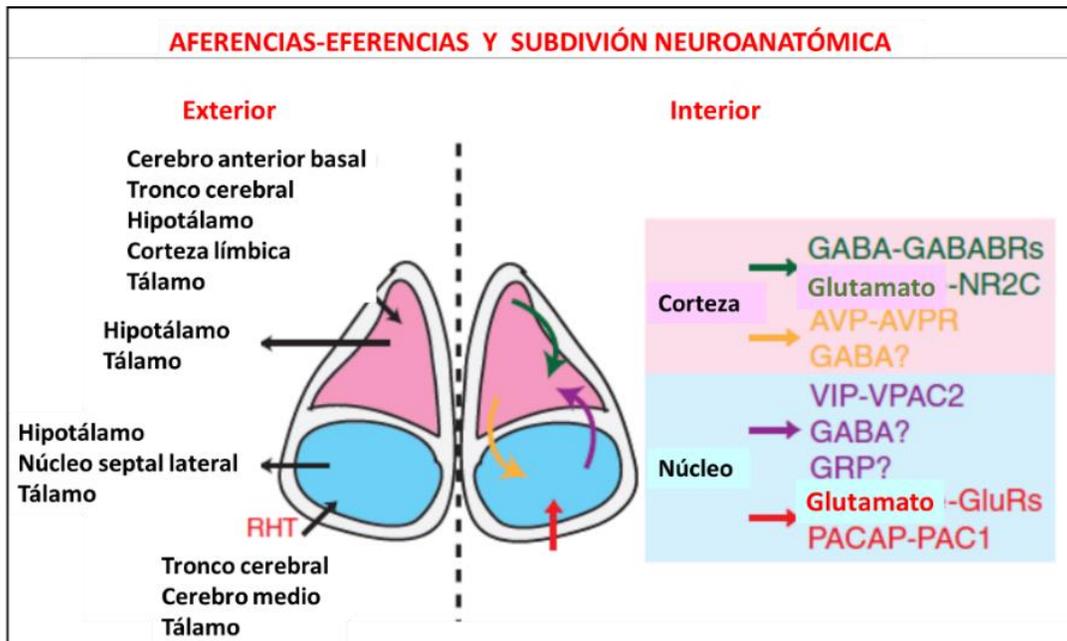


Figura 11. Aferencias y eferencias del NSQ. Modificado de Patton AP & Hastings MH, 2018

1.5. Vías de salida

La función básica del NSQ es generar señales temporales que se expresan como ritmos conductuales y fisiológicos de un mamífero. Esto involucra una cantidad enorme de procesos fisiológicos que están supeditados a una temporalidad muy precisa (ciclos sueño-vigilia, actividad locomotriz, ingesta de alimentos, producción de hormonas, periodos reproductivos, etc.) en los que el NSQ debe mantener una red compleja de comunicación neuroquímica y eléctrica. Sin embargo, esta complejidad tiene dentro de sí la peculiaridad de que el NSQ proyecta a otras estructuras de manera escasa. EL NSQ transmite su información temporal al resto del organismo a través de cuatro tipos de conexiones: 1) directas con neuronas neuroendócrinas (neuronas liberadoras de GnRH y neuronas con receptores a estrógenos), 2) directas con neuronas autonómicas del NPV que transmiten la señal del reloj a los órganos, 3) con estructuras hipotalámicas que están entre el NSQ y el PVN (como el NPVsub, DMH y área preóptica medial (MPA) y 4) áreas fuera del hipotálamo que sincronizan comportamientos controlados como la actividad motora (núcleo geniculado lateral y PVT) (Buijs & Kalsbeek 2001). El área preóptica (MPOA), el hipotálamo ventromedial (VMH), dorsomedial (DMH), región retroquiasmática y el arqueado, participan en la modulación de procesos homeostáticos (Aguilar-Roblero et al., 2004). La principal salida va hacia el Núcleo Paraventricular (PVN), localización de neuronas que controlan el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (la mayoría se dirigen a la zona subaventricular (SPZ), que reside justo dorsal al NSQ, mientras que proyecciones menos intensas alcanzan otras dianas hipotalámicas, principalmente mediales.

1.5.1. Actividad Locomotriz

El sistema motor está organizado de manera jerárquica, estando en el nivel más alto la corteza frontal dorsolateral, donde se gesta el propósito del movimiento; el siguiente nivel es la planeación del movimiento, el cual está dado por las interacciones entre la corteza parietal posterior (la cual manda la información sensorial acerca del ambiente y la posición del cuerpo en el espacio) a la corteza

premotora. En el nivel más bajo está la ejecución del movimiento por los circuitos motores en la médula espinal (Kandel et al., 2000).

La transición de sueño-despertar se asocia con un pico en la secreción de cortisol: “the Cortisol Awakening Response” (CAR, por sus siglas en inglés). El proceso de despertar se asocia con un cambio rápido y recíproco entre la activación en regiones corticales y subcorticales, a esto se le llama “flip-flop”, provocando la activación de vías neuronales mutuamente inhibitorias orquestados por un sistema control en el tallo cerebral. Interconexiones entre neuronas inhibitorias aminérgicas (con mayor actividad durante el despertar y menor durante el sueño de movimientos oculares rápidos o MOR) y neuronas excitatorias colinérgicas (con mayor actividad durante el sueño MOR y menor al despertar) son la base de ese cambio flip-flop. Bajo la influencia del NSQ, la actividad del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA) aumenta gradualmente hacia el final del sueño nocturno. En particular, el eje HHA secreta ACTH y cortisol durante los episodios de sueño no MOR cuando el hipocampo está inhibido.

El NSQ está involucrado en la regulación de CAR en al menos 3 vías diferentes:

- 1) Entrada pre-despertar al núcleo paraventricular del eje HHA el cual sincroniza la función neuroendócrina.
- 2) La vía neural extrapituitaria para reducir la sensibilidad adrenocortical a ACTH en el periodo pre-despertar y, por tanto, frenar los niveles de la primera muestra de cortisol al despertar.
- 3) Las vías neurales extrahipofisarias sensibles a la luz para aumentar la sensibilidad suprarrenal a la ACTH después de despertarse y, mejorar la dinámica del CAR (Clow et al., 2010).

Las lesiones de la SPZ ventral reducen notablemente los ritmos circadianos del sueño y de la actividad locomotriz, con efectos menores en los ritmos de la Tb (Lu et al., 2001). De ahí pasa al núcleo Dorsomedial Hipotalámico (DMH, por sus siglas en inglés), un área involucrada en la respuesta al estrés, en alimentación y en la liberación circadiana de corticoesteroides, este núcleo proyecta densamente al área hipotalámica lateral (LHA, por sus siglas en inglés) y al área perifornical, donde las neuronas contienen orexina, un neuropéptido promotor del despertar. Cuando se

lesiona este DMH se provoca una marcada reducción en el tiempo que pasa despierto un organismo, en la actividad locomotriz en el promedio de temperatura (Chou et al., 2003; Hunt et al., 2010).

La señal del NSQ es transmitida mediante contactos sinápticos con las motoneuronas pre-autonómicas y neuro-endócrinas del hipotálamo. De esta manera, el control de la fisiología diaria por el NSQ va más allá de la simple organización horaria de actividad conductual, ya que, envía esta información dependiendo del contexto y con esto delega el control de las actividades fisiológicas y conductuales del organismo a regiones cerebrales más apropiadas. Así, la manera en la que el NSQ comunica esta información al resto del organismo, es a través de mecanismos neurales (señales eléctricas entre neuronas del sistema nervioso periférico) y humorales (secreción rítmica de factores paracrinicos gran cantidad de péptidos, como la vasopresina, TGF-alfa, procineticina-2 y citocina parecida a cardiotrofina (Kalsbeek et al., 2011).

1.6. Sincronización

1.6.1. Jet Lag

La sincronización significa que los ritmos endógenos de los organismos se muestran en su fase óptima con respecto a su entorno, así como su periodicidad de 24 h. La luz solar es el principal sincronizador o zeitgeber, pero la luz artificial, el alimento el ejercicio, drogas y diversas situaciones de índole social funcionan como sincronizadores también.

El Síndrome de Jet lag está asociado a un viaje transmeridiano a través de al menos dos husos horarios se define un conjunto de signos y síntomas entre los que destaca el insomnio o somnolencia excesiva diurna, disturbios en el sueño, fatiga y malestar generalizado (Arendt, 2018). El Síndrome Jet Lag ha sido retirado del Manual Diagnóstico y Estadístico de desórdenes Mentales (DMS, por sus siglas en inglés) y se ha incluido dentro de la clasificación de los Desórdenes del Ritmo Circadiano del Sueño (Thorpy, 2012). Aunque el ritmo endógeno de un organismo no dure exactamente 24 h, éste tiene la capacidad de sincronizarse al ambiente externo, es decir, se establece una relación de fase estable entre el oscilador y el sincronizador.

Cuando las condiciones no permiten esta sincronización, se da un proceso de desincronización del ritmo circadiano endógeno (de las funciones biológicas del individuo) con el ciclo ambiental de 24 h de luz-oscuridad. Esto pasa fácilmente en los viajes transmeridianos, jornadas laborales mixtas (Diekman & Bose, 2018). Cuando esto pasa, el NSQ se va adaptando al cambio horario de manera paulatina y diferente al resto de los osciladores periféricos, los cuales lo hacen a su propio ritmo, de manera que existe un estado de desincronización tanto interna como externa, en donde los procesos fisiológicos pueden pasar por ciclos transitorios antes de llegar a su total sincronización y/o presentar retrasos o adelantos en la manifestación de su ritmo. En promedio, en humanos, el reloj central se desplaza aproximadamente 1 hora al día, se necesita aproximadamente 1 día por cada hora de cambio de huso horario para que la adaptación sea completa, aunque esto presenta grandes variaciones entre individuos (Arendt 2018).

Estudios epidemiológicos (estudios principalmente hechos en trabajadores con cambios de horarios) demuestran que los efectos a largo plazo de esta desincronización tienen consecuencias a largo plazo, como deficiencias cognitivas, problemas gastrointestinales, incremento en el riesgo de padecer cáncer, obesidad, síndrome metabólico, infertilidad y enfermedades cardíacas. El factor más importante para hacer frente al jet lag es preservar el sueño, ya que se ha visto también que las alteraciones en el sueño son factores de riesgo para la Enfermedad de Alzheimer (EA).

Según Sellix (2012), en ratones *knock in* del gen de la luciferasa con el gen *Per2*, la vejez afecta el proceso de resincronización ante un avance de fase de 6 h, y tardan más días en alcanzar una fase estable, aunque el NSQ viejo mostró cambios más grandes y rápidos en los ritmos en la expresión de la proteínas PER2::LUC en relación con el NSQ joven. Sin embargo, la fase del ritmo de luminosidad por expresión del PER2::LUC en neuronas del NSQ presentó mayor variabilidad, por lo que la conclusión de este estudio es que la vejez disminuye la amplitud del ritmo del marcapasos, se alarga el tiempo para lograr la resincronización y disminuye la resistencia del NSQ a las perturbaciones externas.

2. LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La Enfermedad de Alzheimer (EA) representa un problema de salud pública a nivel mundial debido a su alta incidencia, ya que afecta a cerca de 50 millones de individuos alrededor del mundo, y esta cifra llegará a 152 millones para el 2050 y al triple en el 2050 (Cenini et al., 2020). Es considerada una enfermedad multifactorial, debido a la ausencia de una causa exacta. La EA es la etiología más común de demencia siendo una patología dependiente de la edad, neurodegenerativa e irreversible. Afecta principalmente a personas de edad avanzada (por encima de los 65 años).

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa que se caracteriza por amnesia e incapacidad de crear nuevas memorias en edades tardías (después de los 65 años). Histopatológicamente la EA incluye agregados o placas de β -amiloide ($A\beta$) y marañas neurofibrilares (MNF) de proteína tau hiperfosforilada en zonas cerebrales relacionadas con procesos cognitivos como el hipocampo, amígdala, la corteza prefrontal, subíulum, además de que se han encontrado estas lesiones en áreas tan diversas como retina, hipotálamo, cerebelo (Sengoku, 2020). Además de las lesiones antes mencionadas, la EA se caracteriza por la presencia de degeneración neuronal, pérdida de sinápsis y gliosis reactiva, las cuáles se correlacionan con un deterioro cognitivo y pérdida de la memoria (Mattson et al., 1998; Guimerà et al., 2002, Bohm et al., 2005).

En primera instancia la manifestación del deterioro cognitivo en la EA parece ser el resultado de la pérdida neuronal progresiva y ordenada en áreas cerebrales involucradas en la memoria, la capacidad lingüística, el razonamiento, el pensamiento abstracto y el sueño entre otros (**Figura 12**) (Rogawski et al., 2003; Bojarzki et al., 2007). En etapas avanzadas, se ven afectadas muchas otras regiones cerebrales llevando a conductas erráticas como agresividad, incontinencia urinaria, confinación en cama y aislamiento del mundo exterior. Su evolución es variable, pero, por término medio la supervivencia después del diagnóstico es de 8 a 10 años (Guimerà et al., 2002).

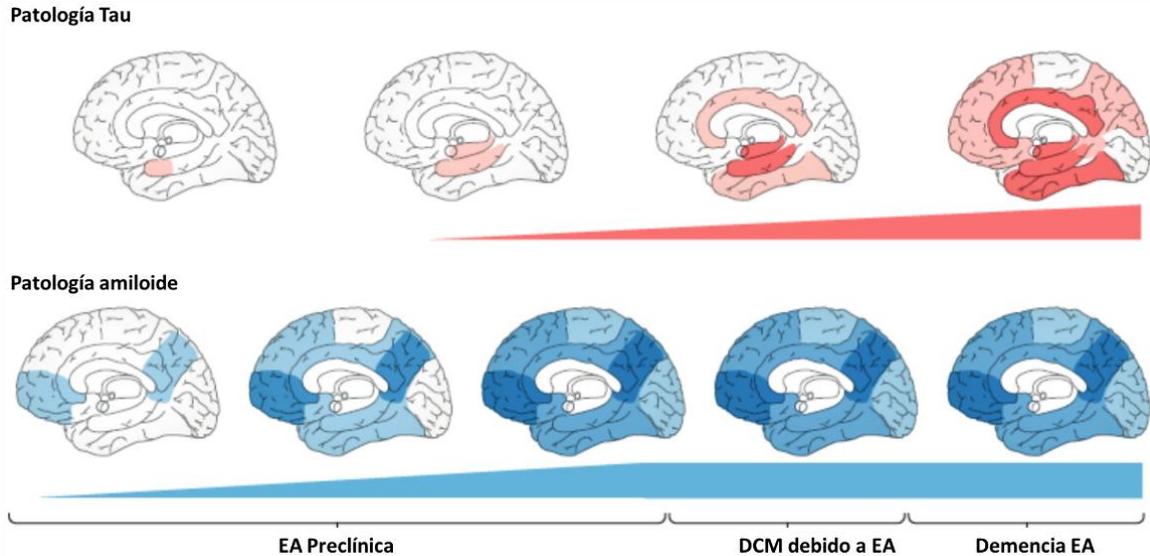


Figura 12. Las áreas rojas (patología tau) y azules (patología A β). La patología Tau se desarrolla primero en la corteza entorrinal y va hacia áreas límbicas en pacientes con deterioro medio cognitivo (DCM) debido a la EA y finalmente a la neocorteza durante la progresión de la EA. En contraste, el A β comienza en las cortezas de asociación y se difunde de la neocorteza a la aloccorteza. La patología A β está presente en estados muy tempranos, mientras que la patología tau se desarrolla considerablemente más tarde. Modificado de van der Kant 2020.

2.1. Patología amiloide

Las placas amiloides son estructuras microscópicas en el parénquima cerebral que consisten en una acumulación anormal de proteínas, detritus celulares y moléculas proinflamatorias. El compuesto que predomina es el β -amiloide, que es un producto del corte de la proteína precursora de amiloide (APP por sus siglas en inglés), una proteína de membrana de 695-770 aminoácidos, que es secuencialmente cortada por las enzimas β -secretasa (BACE) y γ -secretasa, resultando fragmentos de 40-42 aminoácidos de longitud (A β -40 y A β -42), sin embargo, también se generan fragmentos de diversas longitudes ya sea por la acción de otras secretasas o por el recorte post-transduccionales que realizan exopeptidasas (Dunys et al., 2018). Estos fragmentos se producen en endosomas y su liberación al espacio extracelular es influenciado por la actividad sináptica (Cirrito et al., 2005).

La formación del amiloide se da debido al mal plegamiento y el autoensamblaje de la proteína en estructuras filamentosas con una arquitectura β plegada, la cual se estabiliza gracias a un motivo molecular de "cremallera estérica". El grado de amiloidogenicidad de estas proteínas mal plegadas se da gracias a que obliga a las

moléculas no plegadas de la misma proteína a plegarse de forma similar por medio de un templado y a que las hojas β -plegadas se unen entre sí por un enlace hidrógeno para formar polímeros filiformes (Walker, 2020).

La distribución anatómica de las placas amiloides es variable entre individuos, pero en general, se ha establecido un patrón de presentación que va de las áreas de asociación del neocórtex en los estadios más tempranos, después en el allocórtex, hipocampo y la amígdala, después las placas llegan a los ganglios basales y diencefalo y por último aparecen en el cerebro medio y la médula oblongada, las áreas sensoriales y motoras primarias. También se han visto que estos depósitos de $A\beta$ se hacen presentes de manera importante en la red default o red neuronal por defecto (Shin et al., 2011; Hampel et al., 2018; Jagust et al., 2020; Walker, 2020). El procesamiento de la APP se da de manera fisiológica o no amiloidogénica gracias al corte que hace α -secretasa, entre Lys 16 y Leu17 del dominio $A\beta$ de la APP, esto genera un fragmento C-terminal (α -CTF/C38) y un largo ectodominio APP α , este último fragmento tiene propiedades neurotróficas y neuroprotectoras. El procesamiento patológico o amiloidogénico se da cuando la APP en su isoforma 695 es cortada por la BACE1 en el extremo N-terminal del dominio $A\beta$, entre Met596 y Asp597, generando un largo ectodominio APP β y un fragmento C-terminal unido a la membrana (β -CFT/C99), el cual es cortado a su vez por la γ -secretasa en la región intramembranal para liberar el péptido βA intacto y el dominio intracelular de la APP (AICD) (Tan & Gleeson 2019). La APP y la β -secretasa están dentro de la célula, pero en vías independientes de endocitosis, y se juntan en las vesículas de clatrina o en endosomas tempranos, donde la APP es cortada por la secretasa (Tatarnikova et al., 2015) (**Figura 13**).

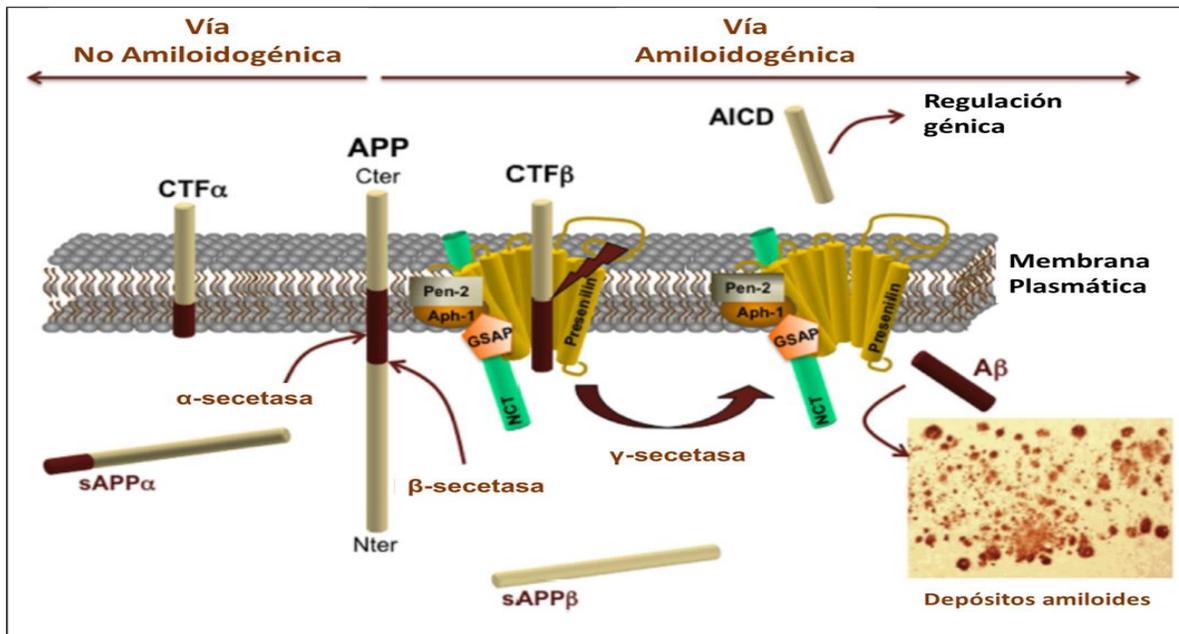


Figura 13. Representación esquemática del procesamiento de la APP por la β-, y γ secretasa. Este procesamiento se divide en no-amiloidogénico a la izquierda y la vía amiloidogénica a la derecha. α- y β-secretasas cortan la APP en su dominio extracelular para liberar respectivamente un fragmento soluble sAPPα o sAPPβ en el espacio extracelular y generar los fragmentos carboxi-terminal CTFα o CTFβ. Estos CTFs pueden ser después procesados por el complejo γ-secretasa para generar AICD y Aβ. El complejo γ-secretasa está compuesto de presenilina, nicastrina (NCT), proteína activada γ-secretasa (GSAP), pen-2 y aph-1 (Tomado de Vingdeux et al., 2012).

2.2. Taupatía

A pesar de que las placas de βA han sido el principal hallazgo en cerebros de pacientes diagnosticados con la EA desde que se identificó esta patología, existe una gran cantidad de estudios que demuestran que la presencia de ellas no correlaciona totalmente con el deterioro cognitivo, y por el contrario la presencia de MNF de proteína tau hiperfosforilada (pTau) sí correlaciona estrechamente con los síntomas cognitivos de la enfermedad y la progresión de la misma, es por esto que se considera un evento central en la neurodegeneración en la EA.

La proteína tau se expresa en células nerviosas centrales y periféricas, principalmente en axones y sinapsis, además de en células gliales. Existen 6 isoformas de la proteína tau, que van de 352 a 441 aminoácidos, los cuales se expresan en el cerebro humano a partir del splicing alternativo de un solo gen MAPT (proteína asociada a microtúbulos), en el cromosoma 17, el cual incluye 16 exones; en el cerebro de ratón sólo la isoforma 4R se expresa. Cuando recién se forma el

péptido tau sufre diversas modificaciones postransduccionales como cortes proteolíticos, fosforilaciones, ubiquitinación, glicosilación, metilación y acetilación, todos estos procesos se dan de manera fisiológica, sin embargo, cuando se ven desregulados es cuando contribuyen a la patogénesis de las taupatías. Los procesos de fosforilación y desfosforilación regulan la habilidad de la proteína tau para interactuar con los microtúbulos y filamentos, de esta manera cuando se da una hiperfosforilación (por mutaciones que actúan en nivel de proteína cambian o borran aminoácidos) disminuye su habilidad de polimerizar a los microtúbulos axonales (Goedert & Spillantini, 2019). Si los niveles de la proteína tau son elevados, interfiere en la unión de las proteínas motoras, cinesinas y proteínas del tipo de las cinesinas, lo que resulta en la inhibición del transporte axonal (**Figura 14**).

La taupatía es característica de otras enfermedades como la Enfermedad de Pick, la parálisis supranuclear progresiva y la degeneración corticobasal. La proteína tau es fosforilada (pTau) por diferentes cinasas como Cdk5, MAPK, GSK3 y PKA. Una de las mutaciones en esta proteína (P301L) provoca fosforilaciones en 14 residuos, lo que resulta en una reducción del número de receptores a glutamato tipo AMPA en la sinapsis, misma que contribuye al proceso de sinaptotoxicidad. El desarrollo de las MNF de pTau se da en zonas ricas en procesos neuronales y gliales y más carente de cuerpos celulares. Comienza en la región trans-entorrinal en el lóbulo temporal medial y progresa hacia el neocórtex y allocortex. La proteína tau como un promotor de ensamble axonal juega un rol determinante en el mantenimiento de las proyecciones axonales y la función sináptica, cuando esta proteína no está funcionando bien, la estabilidad de los microtúbulos se ve comprometida y se produce la disfunción sináptica (Naseri et al., 2019).

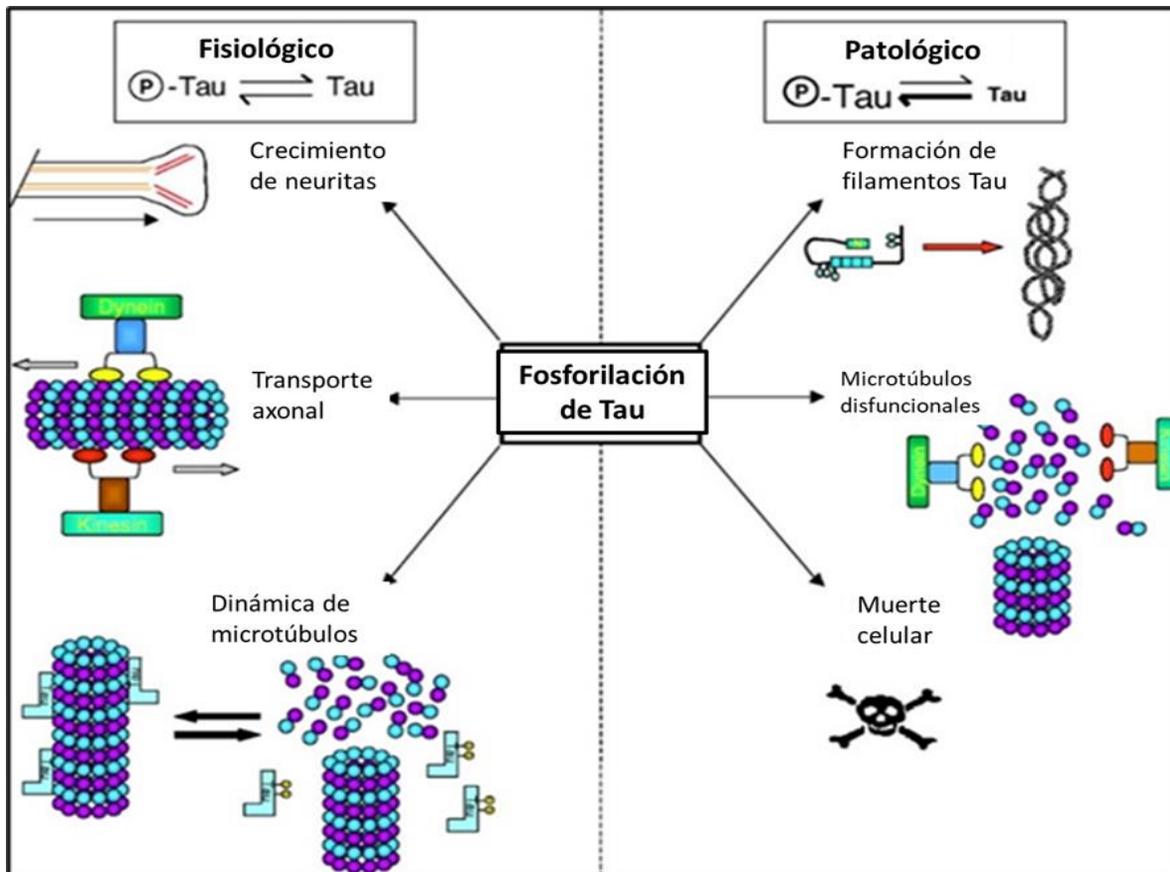


Figura 14. La fosforilación de tau juega un papel importante en la fisiología de la célula. Cuando se da de manera coordinada tiene especial relevancia en el crecimiento de neuritas, transporte axonal, estabilidad y dinámica de microtúbulos. En condiciones patológicas hay un desbalance entre la fosforilación /desfosforilación de tau, la hiperfosforilación de tau puede causar filamentos, interrupción de los procesos basados en los microtúbulos disminuyendo la unión de estos y quizá incrementando la muerte celular (Modificado de Jonhson & Stoothoff, 2004).

2.3. Gliopatía

Se estima que la mitad de la población celular en el cerebro humano corresponde a células gliales, aunque existen variaciones dependiendo de la estructura. En el NSQ está densamente poblado por glía, cuya proporción es de 3:1 (neuronas a glia). Las células gliales participan en una amplia variedad de funciones que van desde el desarrollo y la regulación de la transmisión sináptica, reciclamiento de neurotransmisores, plasticidad, regulación del flujo sanguíneo, mantenimiento de la Barrera hematoencefálica (BBB, por sus siglas en inglés), el aporte de energía a las neuronas, control de la secreción de neurotrofinas, regulación del balance iónico extracelular, promueven la reparación de tejidos y la remoción de detritus celulares

hasta la regulación de los ritmos circadianos, etc (Katsouri et al., 2019, Carter et al., 2019, Arranz & De Strooper 2019, Kwon & Koh, 2020).

En la EA los astrocitos tienen un papel benéfico inicial muy importante al activar el proceso inflamatorio necesario para la remoción del β -amiloide (además de la presencia de mayores niveles de TNF-alfa -citocina pro-inflamatoria- y bajos niveles de TNF-beta -citocina anti-inflamatoria-, además de IL1beta, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18). Sin embargo, si esta inflamación se mantiene por mucho tiempo, las habilidades y funciones de estas células se ven deterioradas, por lo que en un estado más avanzado de la EA hay un aumento en la cantidad y tamaño de placas, además de que aumenta la fosforilación de tau, y el incremento en las afectaciones de los procesos cognitivos (Ahmad et al., 2019; Kwon & Ko 2020). Existe una hipótesis neuroenergética en la cual el papel de los astrocitos es clave, ya que son las únicas células cerebrales capaces de almacenar glucógeno, el cual puede ser convertido a lactato en un estado de crisis energética, como lo es un proceso hipometabólico de glucosa, causado por un desbalance en el transporte de lactato neurona-astrocito. También, de manera paralela, el mayor factor de riesgo genético para la EA es la presencia de la apolipoproteína E (APOE), la cual se secreta de manera predominante por los astrocitos (Zulfiqar et al., 2019).

2.4. Astrocitos y ritmos circadianos

Los astrocitos influyen al NSQ por dos vías: Una mediante cambios morfológicos y de esta manera alteran el acceso entre neuronas, de manera que pueden regular la actividad sináptica del TRH en el núcleo del NSQ y de esta manera sincronizar a los ciclos de luz. La otra vía, es a través del incremento de su actividad en el periodo nocturno, ya que los niveles de glutamato también aumentan durante la noche (Patton & Hastings, 2018, Chi-Castañeda & Ortega 2017). Tso et al., (2018), mostraron que los astrocitos son osciladores circadianos y que la pérdida de ritmo o alargamiento del periodo en astrocitos incrementa el periodo de ritmos diarios en neuronas del NSQ y de actividad locomotriz, demostrando así que los astrocitos contribuyen a la determinación de los ritmos diarios fisiológicos y conductuales.

Brancaccio et al., 2017 muestra que los astrocitos del NSQ tienen un papel importante en el mantenimiento del tiempo circadiano, vía señalización glutamatérgica. Así mismo Ali et al., (2019) encontró que las uniones comunicantes donde la conexina Cx43 está involucrada en la expresión de genes reloj en los astrocitos y en la liberación rítmica del glutamato facilitan el proceso de sincronización y mantenimiento de los ritmos bajo condiciones de cambio como lo es un protocolo de jet lag o luz constante, probablemente a través de la modulación sináptica y plasticidad, además de la liberación de glutamato.

3. RITMOS CIRCADIANOS Y ENFERMEDAD DE ALZHEIMER (EA)

3.1. Alteraciones circadianas en la EA

Se ha sugerido una posible implicación cronobiológica (disturbios en la regulación de los ritmos circadianos) en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Musiek, 2015). La relación entre un funcionamiento circadiano alterado y el riesgo de desarrollar la EA ha recibido poca atención a pesar de que pacientes con la EA presentan diversos signos que indican una desregulación en los ritmos circadianos, como retraso en el ritmo de la temperatura corporal, fragmentación del ciclo sueño-vigilia (incremento de somnolencia, incremento en la latencia de sueño, aumento en los despertares, fragmentación del sueño, disminución del sueño MOR, incremento en la actividad nocturna) (Harper et al., 2005; Musiek et al., 2016), variabilidad en horarios de ingesta de alimento y de actividad locomotriz, además de la presencia del síndrome del ocaso o “sundowning”, un conjunto de conductas aberrantes (inquietud, arrebatos verbales, amenazas físicas y agresión) que se presentan al atardecer, y se presenta en ~40% de los pacientes con EA (Videnovic et al., 2014, Volicer et al., 2001). La presencia de este Síndrome del Ocaso y las alteraciones en los patrones del sueño, son problemas descritos en desórdenes neurológicos y psiquiátricos y son la causa principal de institucionalización de estos pacientes (Bedrosian & Nelson, 2013), lo que representa un problema claro de salud pública y manejo de espacios y recursos en estas instituciones. Estas alteraciones se relacionan con el funcionamiento del NSQ, que en estudios prospectivos indican cambios en los patrones de actividad circadiana (disminución de amplitud, retraso

de fase), que son considerados predictores de EA o Deterioro Cognitivo leve (MCI, por sus siglas en inglés), sugiriendo que el compromiso en los ritmos circadianos puede ser un fenómeno preclínico (Coogan et al., 2013). Desde los estudios de Stopa et al., en 1999 se encontraron cambios degenerativos en el NSQ en pacientes con EA severa, con encontraron pérdida neuronal y la presencia de MNF. Así mismo, más tarde, Harper et al., (2008) encontraron que la progresión neuropatológica en cerebros postmortem de enfermos con Alzheimer está asociada con las anormalidades circadianas mencionadas.

3.2. N. supraquiasmático y Enfermedad de Alzheimer

Además de las características patognomónicas de la enfermedad, existe evidencia de la presencia de degeneración en el NSQ, como muestra Harper et al. (2008) quienes evaluaron cerebros de pacientes con demencia y encontraron pérdida neuronal vasopresinérgicas y neurotensina, correlacionada con un incremento en la fragmentación de la actividad y disminución de esta. Stopa et al., en 1999 encontró características de degeneración en el NSQ en observaciones post-mortem de pacientes con EA.

En un modelo triple transgénico para la EA (3xTg-AD), Sterniczuk et al. (2010) encontraron una reducción en la actividad nocturna correlacionada con una disminución en las poblaciones neuronales VIPérgicas y vasopresinérgicas del NSQ de machos de 3 meses de edad. A pesar de esto, sólo un estudio en un modelo transgénico para la EA (APP-PSN1) describe la expresión de Per2 en el Núcleo Supraquiasmático (NSQ), asociado a alteraciones en sus ritmos de sueño y cambios modestos en la expresión de Per2, sin embargo, los autores Duncan et al. (2014), reportan poca significancia de los estudios debido a la pérdida de tejido durante el procesamiento. Esto pone en evidencia la necesidad de análisis más detallados sobre alteraciones de la función circadiana en otros modelos experimentales de la EA (Musiek 2015).

3.3. Patologías oftálmicas y manifestaciones retinales de la EA

La EA representa una de las patologías neurodegenerativas más complejas de entender en la actualidad, debido en parte, a la gran variedad de sistemas, órganos, y tipos celulares afectados. De los 12 pares craneales, 3 están dedicados a la función oculomotora (III, IV, VI) y uno (II) acarrea información sensorial de la retina al cerebro. La ausencia de biomarcadores certeros para un diagnóstico temprano y monitoreo confiable para esta enfermedad ha llevado al estudio de otras áreas diferentes al cerebro, entre los cuales el ojo, y particularmente la retina representa una ventaja metodológica en el estudio de procesos neurodegenerativos (Frost et al., 2010), ya que, al ser tejido de origen nervioso, representa una ventana al tejido cerebral afectado por la EA como bien se ha demostrado en diversos estudios (Liu et al., 2015; Gupta et al., 2016).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dado que la principal causa de institucionalización de los pacientes con algún tipo de demencia, incluyendo la Enfermedad de Alzheimer, es la presencia de signos y síntomas que tienen que ver con la regulación del sistema circadiano y son pocos los estudios que tienen esta perspectiva, nos preguntamos sí, a través de retar a este sistema mediante el establecimiento de un protocolo de jet lag a lo largo del desarrollo de la patología en un modelo murino para la EA, se pueden identificar alteraciones en la fisiología circadiana, comenzando por la retina, el núcleo supraquiasmático y la actividad locomotriz, con el objetivo de contribuir a la identificación temprana de la enfermedad.

HIPÓTESIS

1. La disminución en la funcionalidad de la retina de ratones 3xTg-AD, se dará de manera progresiva y en correlación con la presencia de los marcadores cerebrales de la EA (placas de A β y pTau) en el NSQ.
2. Las características circadianas del ritmo de la actividad locomotora de los ratones 3xTg-AD, tendrán alteraciones de manera progresiva y en correlación con la presencia de los marcadores cerebrales de la EA (placas de A β y pTau) en el NSQ.
3. El Núcleo Supraquiasmático de ratones 3xTg-AD presentará un aumento en la astrogliosis de manera progresiva en correlación con la presencia de los marcadores cerebrales de la EA (placas de A β y pTau).

OBJETIVOS

Identificar si en ratones 3xTg-AD a los 3, 8 y 13 meses existen diferencias respecto a sus controles y a sí mismos en las diferentes edades en:

1. El ritmo circadiano de actividad locomotriz después de cambios de fotoperiodo que induce un síndrome de jet lag por avance y retraso de horario y en condiciones constantes de oscuridad.
2. La integridad del funcionamiento de la retina evaluada mediante electroretinogramas/flash.
3. La posible correlación con alteraciones en los niveles de astrogliosis en el Núcleo Supraquiasmático.

1. SUJETOS EXPERIMENTALES

Todos los procedimientos fueron hechos bajo las directrices éticas del Instituto Nacional de Salud, Uso y Cuidado de los Animales de (NIH Publication No. 8023) y bajo la Norma Oficial Mexicana NOM-062-1999 y los lineamientos del Comité de Bioética del INB-UNAM. Se usaron ratones macho homocigotos triples transgénicos para la Enfermedad de Alzheimer (3xTg-AD). Estos ratones (*knock in*) contienen 3 transgenes de origen humano PS1M146V, APPSwe, y tauP301L en un fondo C57BL6/J; y ratones No-Transgenicos (NoTg) (Oddo et al., 2003). Este ratón control es el recomendado por Jackson Laboratory Company, NoTg B6129SF2/J stock No. 101045.

3x-Tg-AD B6 129-Tg (APPSwe, tauP301L)1LfaPsen1tm1Mpm/Mmjax.

Para el registro de la actividad locomotriz, los ratones fueron mantenidos individualmente en cajas acrílicas (30x20x15 cm) bajo un ambiente controlado con ciclos de luz:oscuridad (LD 12:12 h; fotofase 06:00-18:00 h; 300 lux) y temperatura $24\pm 1^{\circ}\text{C}$. Fueron alimentados con Rodent Lab Chow 5001, Purina Inc., y agua ad libitum. Un total de 60 machos fueron usados en el registro de actividad (30 3xTg-AD y 30 NoTg), de 3, 8, y 13 meses ($n= 10$ en cada grupo). Cada edad corresponde a una etapa de evolución de la EA: (antes del establecimiento de los marcadores patológicos), intermedio y avanzado.

2. REGISTRO DE ACTIVIDAD LOCOMOTRIZ

Los ratones se mantuvieron individualmente en cajas de acrílico (30x20x15 cm). La actividad locomotriz espontánea fue monitoreada individualmente usando un par de sensores infrarrojos localizados en las paredes de las cajas. La actividad locomotriz fue individualmente cuantificada como el número de interrupciones de los rayos infrarrojos. Los eventos fueron sumados y almacenados cada 10 min usando el software ACTIBIO (Miranda-Anaya 2017). Los registros de la actividad locomotriz y los cambios de LD (protocolo de jet lag) fueron presentados dentro de una cámara de crecimiento vegetal con un ambiente controlado (CONVIRON, ADAPTIS 1000),

una humedad relativa de 40% y un fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad (LD 12:12, luz blanca LED, 300 lx) regulado por un cronómetro. Tiempo Zeitgeber (ZT) fue usado como referencia; donde el encendido de las luces = ZT0 y el apagado de las luces = ZT12. Las cajas fueron limpiadas una vez a la semana durante la fotofase, y antes y después de la oscuridad continua (DD). La actividad locomotriz fue representada mediante actogramas de percentiles mediante el programa ClockLab.

3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL (JET LAG Y LIBRE CORRIMIENTO) Cada ciclo de LD u DD fue mantenida por al menos 14 días. En el comienzo, la actividad locomotriz fue registrada en LD 12:12 (INI) equivalente a las condiciones del bioterio (encendido 06:00 h, apagado 18:00 h); después, el fotoperiodo fue avanzado 6 h ADV (apagado de luces 12:00 h); después de dos semanas, el fotoperiodo fue retrasado 6 h (DEL, apagado de luces 18:00 h). Finalmente, los animales fueron dejados en oscuridad constante para conocer su periodo endógeno (DD) (**Figura 15**).

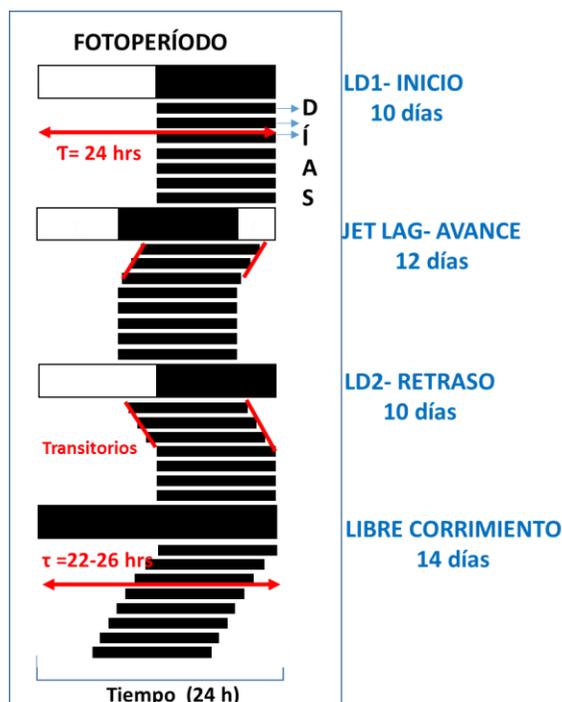


Figura 15. Esquema del protocolo de

4. ANALISIS DE RITMO CIRCADIANO DE LA ACTIVIDAD LOCOMOTRIZ

La actividad se analizó mediante actogramas dobles y perfiles de actividad media. Se consideraron los últimos 5 días de cada fotoperíodo en condiciones estables para reducir el efecto de los ciclos transitorios, para trazar el perfil de actividad media individual, así como el ángulo de fase del inicio de la actividad con las luces apagadas. Después de cambiar el fotoperíodo, se analizaron el número de ciclos transitorios hasta la resincronización y la acrofase de los últimos 5 días de cada fotoperíodo mediante el software ClockLab con los siguientes criterios: Onset on 9, off 6, 9 h sin actividad continua por encima del umbral para considerar el inicio y que se mantengan bloques de 6 h de actividad para considerar el apagado. Offset: on 3, off 8, se consideraron los bloques de actividad con una duración de 3 h previas y que pasaran 8 h sin actividad continua para considerar el final. El inicio de actividad que utilizamos fue una modificación basada en Sellix et al. (2012) debido a que los métodos de grabación y el modelo animal utilizado fueron diferentes. Por lo tanto, la estabilidad del inicio de la actividad en el avance se consideró en los últimos días de cada condición de LD cuando no se observaron diferencias en las comparaciones día a día (ANOVA de una vía). Se consideraron cinco días sin diferencias en el inicio para calcular el ángulo de fase del arrastre (\pm SEM). Los transitorios a la resincronización se evaluaron como días para alcanzar una nueva fase sin diferencias en (\pm SEM). También se comparó la cantidad media total, diurna y nocturna de actividad locomotriz entre los grupos. Para analizar los efectos de enmascaramiento de la luz, se utilizó como referencia un promedio de actividad de 6 h de tres noches antes del turno LD y se comparó con la actividad en el horario proyectado el primer día después del cambio de LD. Cuando se adelantó el LD, se utilizó la primera mitad (6 h) de la noche subjetiva, y cuando se retrasó el LD, se utilizó la segunda mitad (6 h) de la noche subjetiva; el cambio se graficó en diferencias porcentuales sobre su control. El período circadiano del ritmo de la actividad locomotriz en condiciones de DD se calculó mediante el periodograma de X2 (Sokolove y Bushell, 1978) disponible en el software Clock Lab; se consideró que el ritmo circadiano era significativo cuando la amplitud del periodograma estaba por encima del umbral de significación ($P < 0,5$).

5. ELECTORRETINOGRAMA

El electroretinograma de destello (fERG) de los ratones NoTg y 3xTg-AD a los 3, 8 y 13 meses se registró tras 24 h de adaptación a la oscuridad o a la luz a la intensidad regular del fotoperiodo. Los ratones fueron anestesiados con una mezcla de 70% de ketamina y 30% de xilacina (1 μ L/g de peso corporal, i.p.). Después, en cada ojo, se aplicó una gota de una solución de tropicamida al 0,5% y fenilefrina al 0,5% para la dilatación de la pupila (Díaz-Lezama et al., 2016). La córnea se mantuvo hidratada con Hipromelosa al 0.5%. La temperatura corporal se mantuvo con un juego de almohadillas térmicas. Se colocó un electrodo de anillo de cloruro de plata en la córnea de cada ojo y dos electrodos de referencia se colocaron subcutáneamente cerca de los ojos y el electrodo de tierra se colocó en la base de la cola. Para el registro en condiciones mesópicas (respuesta mixta de bastones y conos) se mantuvieron en oscuridad durante las 12 h anteriores al registro, que se realizó con el apoyo de una luz roja y estimulando un pulso de luz de 1 ms con una intensidad de 0.9 log cd x s/m² (PS33 Plus Photo Stimulator, GRASS Technologies, Warwick, RI). La respuesta también se evaluó en condiciones fotópicas, para lo cual los ratones se adaptaron a una luz de fondo de 25 cd/m² durante 1 h. Para ambas condiciones de ERG, las señales se amplificaron 2000 veces con un amplificador GRASS P511AC (banda pasante ajustada de 3 Hz a 0.3 kHz) y se digitalizaron con un convertidor A/D (unidad adaptadora Polyview, PVA-16, Grass Instruments). Se promediaron dieciséis señales sucesivas y se determinó la amplitud de la onda A y de la onda B, así como los tiempos implícitos de cada una (latencia).

6. INMUNOHISTOQUÍMICA

Los animales fueron anestesiados con una dosis de 1 mL/kg de pentobarbital sódico i.p. a una concentración de 6.6 g/100 mL (Cheminova®) para su perfusión transcardial con PBS 0.01 M, pH 7.4, y paraformaldehído al 4%. A continuación, los cerebros extraídos se postfijaron durante 2 h en la misma solución. Después, se pasaron a una solución de sacarosa al 30% hasta que el tejido quedó en el fondo del frasco. Los cerebros se congelaron utilizando medios de criopreservación a temperatura de corte óptima (OCT o Tissue-Tek®) para obtener cortes de 40 μ m de

grosor con un criostato Leica modelo CM1950. Los cortes centrales del NSQ se caracterizaron histopatológicamente para identificar los agregados de proteína β -amiloide con el anticuerpo monoclonal Anti- β -Amiloide (SIGMA, A3981) y la proteína Tau con el anticuerpo monoclonal 499, que reconoce un fragmento 14-26 de Tau humana (Ontiveros-Torres et al., 2016). La proteína ácida fibrilar glial (Monoclonal Anti-GFAP, SIGMA G3893) también se utilizó en el NSQ en portaobjetos alternados para cada anticuerpo. Se utilizaron anticuerpos secundarios biotinilados dirigidos contra inmunoglobulinas de ratón (AntiMo IgG). Se incubaron con el complejo avidina-biotina y se revelaron con diaminobencidina. Las fotomicrografías se tomaron con un microscopio Nikon modelo Eclipse Ci-E utilizando el software NIS-Elements Viewer. El análisis fractal se realizó en 2-3 individuos por grupo, 8 cortes/individuo, 3-5 células/corte (es decir, 48 a 120 células/grupo) con el software gratuito Fiji (Schindelin et al., 2012). La dimensión fractal es una medida de la complejidad de la microglía, que cuantifica el contorno de cada célula delimitado por los puntos finales y las longitudes de los procesos. FracLac para ImageJ calcula la dimensión fractal (DB) de la microglía para cada célula utilizando un protocolo de diagrama de caja que determina la cantidad de detalle de los píxeles con el aumento de la escala, donde N=el número de píxeles o "detalle" a una escala particular. (Morrison et al., 2017; Young y Morrison, 2018).

7. ANÁLISIS DE DATOS

Los datos se recogieron para la condición experimental (ratones no transgénicos y transgénicos) y el tiempo (3, 8 y 13 Meses) y se presentan como media \pm error estándar de la media. Se compararon para medidas independientes con ANOVA de una vía (para probar las diferencias entre los turnos de LD y las edades) y de dos vías (para comparar los grupos de control y experimentales para cada condición); los valores significativos se fijaron en $p < 0.05$. Las fluctuaciones diurnas de 24 h en la actividad locomotriz se analizaron con el programa ClockLab (Pfeffer et al., 2018). El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism 6.01.

1. REGISTRO DE ACTIVIDAD LOCOMOTRIZ

La **Figura 16** muestra actogramas representativos del ritmo circadiano de la actividad locomotriz de los ratones NoTg (izquierda) y 3xTg-AD (derecha) a los 3, 8 y 13 meses, en diferentes etapas del protocolo de jet lag (6 h de Avance y Retraso) y DD. Los ratones permanecieron al menos 14 días en la misma condición, esto para observar la transición completa. En todos los casos, hubo una respuesta de avance al cambio de LD y al final, un ritmo circadiano libre en DD. La diferencia más clara en los ratones 3xTg-AD fue el acortamiento del periodo a los 3 y 13 meses. Se evaluó el τ circadiano de funcionamiento libre en las tres edades, y se encontraron diferencias significativas entre los grupos a los 3 meses (ANOVA de dos vías. NoTg: 23.90 ± 0.06 h frente a 3xTg-AD: 23.14 ± 0.10 h; $F(1, 52) = 11.27$, $P = 0.0015$) y 13 meses (ANOVA de 2 vías. NoTg: 24.07 ± 0.21 h frente a 3xTg-AD: 23.35 ± 0.41 h; $F(1, 52) = 1.27$, $P = 0.0015$). En la amplitud del período no se encontraron diferencias significativas entre los grupos, pero sí entre el grupo 3xTg-AD (ANOVA de una vía. $F(2, 27) = 3.6640$, $p = 0.0391$). En cambio, a los 8 meses (panel inferior) el acortamiento persistió, pero la diferencia no fue estadísticamente significativa.

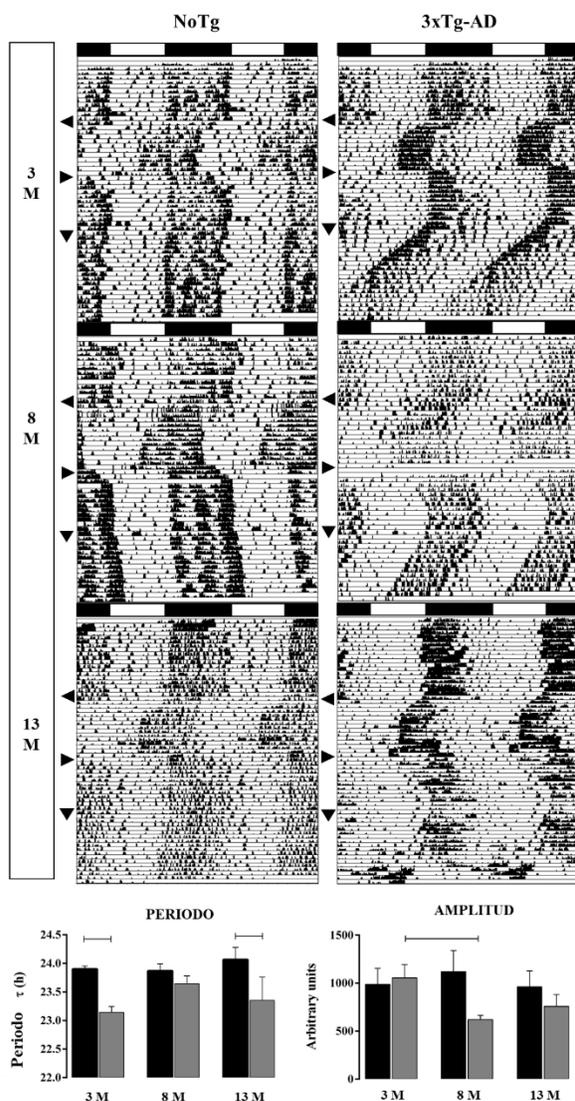


Figura 16. Actogramas por percentiles de los ratones NoTg y 3xTg-AD a los 3, 8 y 13 meses. En cada actograma, una punta de flecha indica el avance (a la izquierda), el retraso (a la derecha) y el inicio de la DD (hacia abajo). El panel inferior muestra la media (\pm SE) de los periodos libres de DD (izquierda) y amplitud (derecha). Ratones NoTg en negro y ratones 3xTg-AD en barras grises (ANOVA de dos vías con prueba post hoc de Tukey, $p < 0,05$, $n = 7-13$).

Análisis de los perfiles de actividad tras el adelanto y retraso del fotoperiodo

El análisis en los perfiles de actividad locomotriz (cinco días consecutivos sin diferencia en los valores de inicio) de ciclos de LD se muestran en la **Figura 17**. A los 3 y 8 meses, en la condición inicial, los ratones 3xTg-AD mostraron menos actividad que los NoTg principalmente durante la noche, pero a los 13 meses esta diferencia se pierde (panel izquierdo). Tras el avance de LD (panel central), la actividad de los ratones 3xTg-AD se multiplicó casi por dos inmediatamente después de apagar las luces y disminuyó gradualmente durante la noche en los 3 Meses. A los 3 y 8 meses después del retraso de LD (panel derecho), la actividad entre los grupos fue similar en las horas de oscuridad y disminuyó gradualmente en

los 3xTg-AD después de encender las luces; a los 13 meses. A los 13 meses, los ratones 3xTg-AD mostraron una gran variabilidad en la actividad media nocturna, con una tendencia a ser más activos y menos activos durante la luz que los ratones NoTg. Los principales cambios en los perfiles de actividad son, por un lado, el aumento de la actividad de los 3xTg-AD tras el adelanto del horario a los 3 y 13 meses y la actividad de los ratones de 13 meses aumentó significativamente en INI, ADV y DEL, pero en el protocolo ADV este aumento se observa también en la segunda mitad de la luz.

Las comparaciones de la media en la actividad total, diurna o nocturna durante los últimos 5 días en cada condición se muestran en la Tabla 1. En el protocolo INI, los ratones NoTg no presentan cambios en todas las edades y en la actividad total, diurna y nocturna. Sin embargo, en la actividad total media, los ratones 3xTg-AD, de 8 Meses a 13 Meses, tuvieron un aumento significativo del 123%; en la actividad nocturna los ratones 3xTg-AD de 13 Meses tuvieron un aumento del 153%.

En el protocolo ADV, los ratones NoTg no tienen cambios en todas las edades y en la actividad total, diurna y nocturna. Los ratones 3xTg-AD tienen la actividad total aumentó 171% a 8 de 13 Meses. La actividad diurna aumentó un 140% a los 13 Meses en comparación con los 3 Meses, y un 170 % entre los 8 Meses y los 13 Meses. La actividad nocturna aumentó un 171% de 8 Meses a 13 Meses.

En el protocolo DEL, ni los ratones NoTg, ni los 3xTg presentan cambios en todas las edades y en la actividad total, diurna y nocturna a lo largo del tiempo.

Las diferencias entre los ratones NoTg y 3xTg-AD fueron en el protocolo INI a los 3 Meses donde hubo una disminución del 42% en la actividad total. En el protocolo ADV en la actividad total a los 13 Meses hubo un aumento del 92% 3xTg-AD. En la actividad diurna a los 13 Meses hubo un aumento del 137% en los ratones transgénicos. En el protocolo DEL, la actividad total de los ratones 3xTg-AD disminuyó un 35% con respecto a su control.

Las acrofases fueron diferentes en el protocolo ADV en las tres edades.

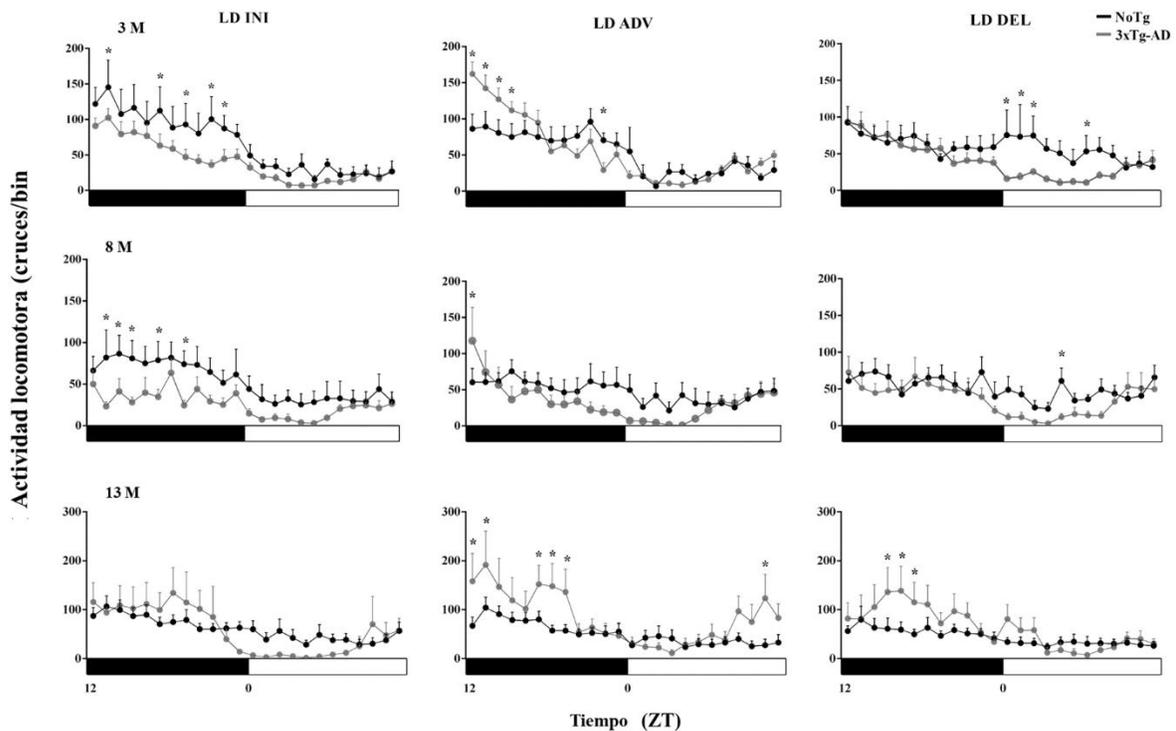


Figura 17. Perfiles de actividad media en estado estacionario por hora (\pm SE) de los ratones NoTg (líneas negras, $n = 26$) y los ratones 3xTg-AD (líneas grises, $n = 28$). Inicial (arriba), 6h de avance (medio) y 6h de retraso (abajo). El asterisco indica las diferencias (ANOVA de dos vías con la prueba post hoc de Tukey, $p < 0,05$) entre grupos a lo largo del ciclo de LD.

Para analizar la resincronización, una nueva evaluación sobre la progresión del inicio y el desplazamiento de la actividad se muestran en **Figura Suplementaria 1**. No se observaron diferencias significativas en los días necesarios para reentrenar a los avances de la LD, cuando se utilizó el inicio como referencia. El número de días para reentrenar a los avances LD se definió como los necesarios para desplazar el inicio de la actividad al siguiente valor estable (\pm SEM) calculado (figura 4; y figura suplementaria 1 A). Los transitorios para reentrenar los retrasos de LD no se consideraron debido al efecto de enmascaramiento sobre el inicio de la actividad, y la variabilidad en el desplazamiento de la actividad.

El efecto de enmascaramiento de la luz

El enmascaramiento negativo de la actividad locomotriz por la luz se resume en la **Figura 18**. Tras los avances (C), la luz en la segunda mitad de la noche subjetiva

redujo la actividad en un ~50% tanto en los ratones NoTg como en los 3xTg-AD a los 3 meses. Luego, a los 8 meses, los ratones 3xTg-AD no mostraron casi ningún efecto (~9.4%), y cuatro ratones mostraron un enmascaramiento positivo (más activos que la referencia; los valores negativos no están representados). A los 13 meses, el enmascaramiento negativo era de casi el 80% en ambos grupos. Después de los retrasos de LD, cuando la luz estaba presente en la primera mitad de la noche subjetiva, el enmascaramiento negativo a las 8 Mo era de casi el 50% en los ratones NoTg y de ~ 80% en los 3xTg-AD.

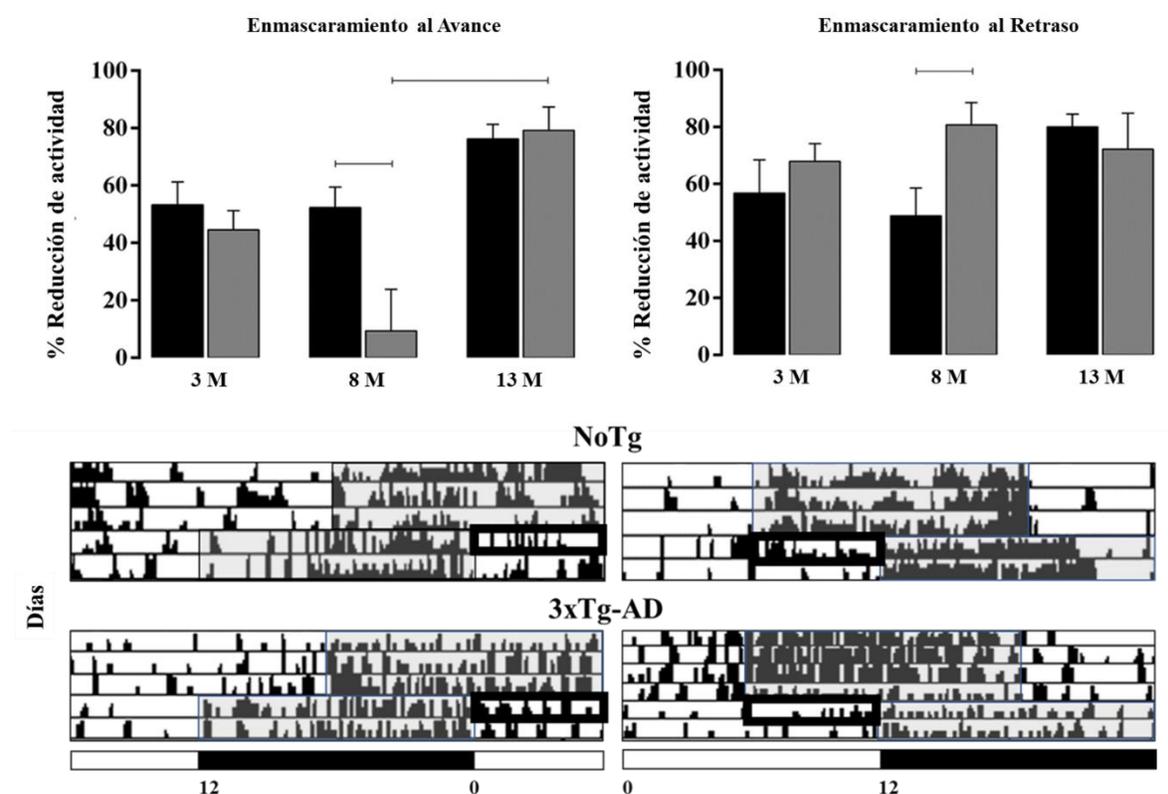


Figura 18. Análisis de la media (\pm SE) del efecto de enmascaramiento de la luz (% de reducción). Los ratones NoTg se representan en negro y los ratones 3xTg-AD en gris barras. Las diferencias significativas entre grupos se indican con paréntesis (ANOVA de dos vías por edad, prueba post hoc de Tukey, prueba $p < 0,05$, $n = 6-10$ por grupo). Abajo, fragmentos de actogramas representativos.

El ángulo de fase entre el inicio de la actividad y el apagado de las luces (**Figura 19**) en LD inicial, no mostró cambios significativos en los ratones NoTg según la edad. Sin embargo, en los ratones 3xTg-AD, mostró una mayor variabilidad (especificar si se trata de una variabilidad del ángulo de fase inter o intra),

particularmente a los 13 meses. El ratón 3xTg-AD muestran cambios a lo largo de las 3 edades, en el Avance de 3 meses (1.78 ± 0.24) tienen diferencias con 8 Meses (1.92 ± 0.49) y con 13 Meses (-0.22 ± 0.81) (ANOVA de 2 vías $F = (2, 189) = 8.92$, $P = 0.0002$). En el protocolo DEL fueron en 3 Meses (2.18 ± 0.57) con 8 Meses (-1.229 ± 0.56), y 3 Meses (2.18 ± 0.57) con 13 Meses (-1.65 ± 1.08) (ANOVA de 2 vías $F(2, 161) = 10.08$, $P < 0.0001$).

En el protocolo de 3 Meses, INI, se observó una diferencia significativa entre los grupos (ANOVA de 2 vías. NoTg: -0.16 ± 0.13 ; 3xTg-AD: 1.55 ± 0.61 . $F = (1, 198) = 18.76$; $p < 0.0001$), y en el protocolo DEL también se encontró la diferencia en (NoTg: 0.12 ± 0.44 ; 3xTg-AD: 2.18 ± 0.57 . $F = (1, 198) = 18.76$; $p < 0.0001$).

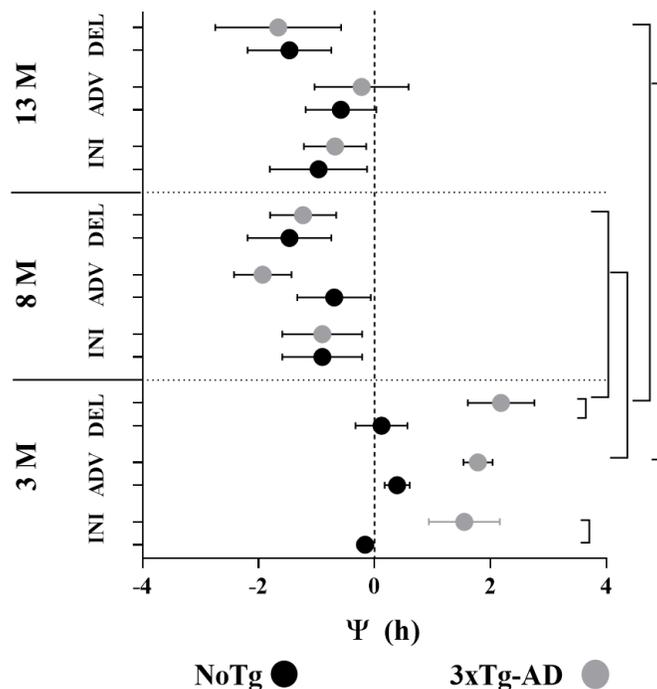


Figura 19. Media (\pm SE) del ángulo de fase (Ψ , min) entre el inicio de la actividad y el apagado de las luces. Ratones NoTg (negro, $n = 26$) y 3xTg-AD (gris, $n = 28$) ratones al inicio (INI), avance (ADV) y retraso (DEL) en condiciones LD. Las diferencias se indican con paréntesis (ANOVA de dos vías por edad, prueba post hoc de Tukey, $p < 0.05$).

2. ANÁLISIS DEL ELECTORRETINOGRAMA

Para investigar si la respuesta funcional de la retina se veía afectada en los diferentes estadios de la EA, comparamos el ERG-F de los ratones 3xTg-AD y NoTg

a los 3, 8 y 13 meses (que corresponden a un estadio temprano, intermedio y avanzado de la enfermedad). La **figura 20** muestra la latencia media y la amplitud (\pm SE) de la onda A tanto en NoTg (negro) como en 3xTg-AD (gris), en condiciones mesópicas. Se encontraron diferencias entre los grupos en la latencia de la onda A (arriba, panel izquierdo) diferencias a 3 Meses (ANOVA de 2 vías. NoTg: 19.02 ± 0.78 , n=22; 3xTg-AD: 23.11 ± 0.72 , n=9. $F = (1, 69) = 15.01$, $P = 0.0002$); y 8 Meses (ANOVA de 2 vías. NoTg: 18.92 ± 0.80 , n=14; 3xTg-AD: 23.50 ± 1.31 , n=7. $F = (1, 69) = 15.01$, $P = 0.0002$). La latencia de la onda B fue mayor en los ratones 3xTg-AD a los 3 meses (panel superior derecho) (ANOVA de 2 vías 46.79 ± 1.75 , n=22; 3xTg-AD: 54.72 ± 1.31 , n=11. $F = (1, 76) = 9.05$, $P=0.0035$). Además, en la amplitud de la onda A no se encontraron diferencias entre los grupos y las edades (centro, panel izquierdo). Sin embargo, la amplitud de la onda B disminuyó significativamente con la edad en los ratones NoTg de 3 Meses y 13 Meses (ANOVA de 2 vías. 3 meses: 428.30 ± 21.42 , n=19; 13 Meses: 278.12 ± 21.09 , n=11. $F = (2, 66) = 6.86$, $P=0.0020$), mientras que siguió siendo pequeño desde los 3 meses hasta los 13 meses en los ratones 3xTg-AD (panel central derecho). Hubo diferencias entre NoTg y 3xTg-AD a los 3 meses (ANOVA de dos vías. NoTg: 428.30 ± 21.42 , n=19; 3xTg-AD: 255.31 ± 30.45 , n=9. $F = (1, 66) = 25.85$. $P < 0.0001$). En la parte inferior se muestran trazos representativos del curso temporal medio de la respuesta del electroretinograma registrado en condiciones mesotópicas para todas las edades (n= 5-10). En condiciones fotópicas, la latencia de la onda A en los ratones 3xTg-AD aumentó a cada edad (**Figura 21**), aunque este aumento fue significativamente diferente sólo a los 8 Meses (superior, panel izquierdo) ANOVA de 2 vías. NoTg: 15.36 ± 2.08 , n=11; 3xTg-AD: 23.92 ± 0.69 , n=5), posiblemente debido a la disminución de la latencia de los ratones NoTg. No hubo diferencias significativas en las amplitudes de las ondas A y B, pero la onda B disminuyó en el 3xTg-AD a los 13 Meses con respecto al control (ANOVA de 2 vías NoTg: 193.79 ± 49.36 , n=15; 3xTg-AD: 82.02 ± 8.01 , n=15).

MESOPICAS

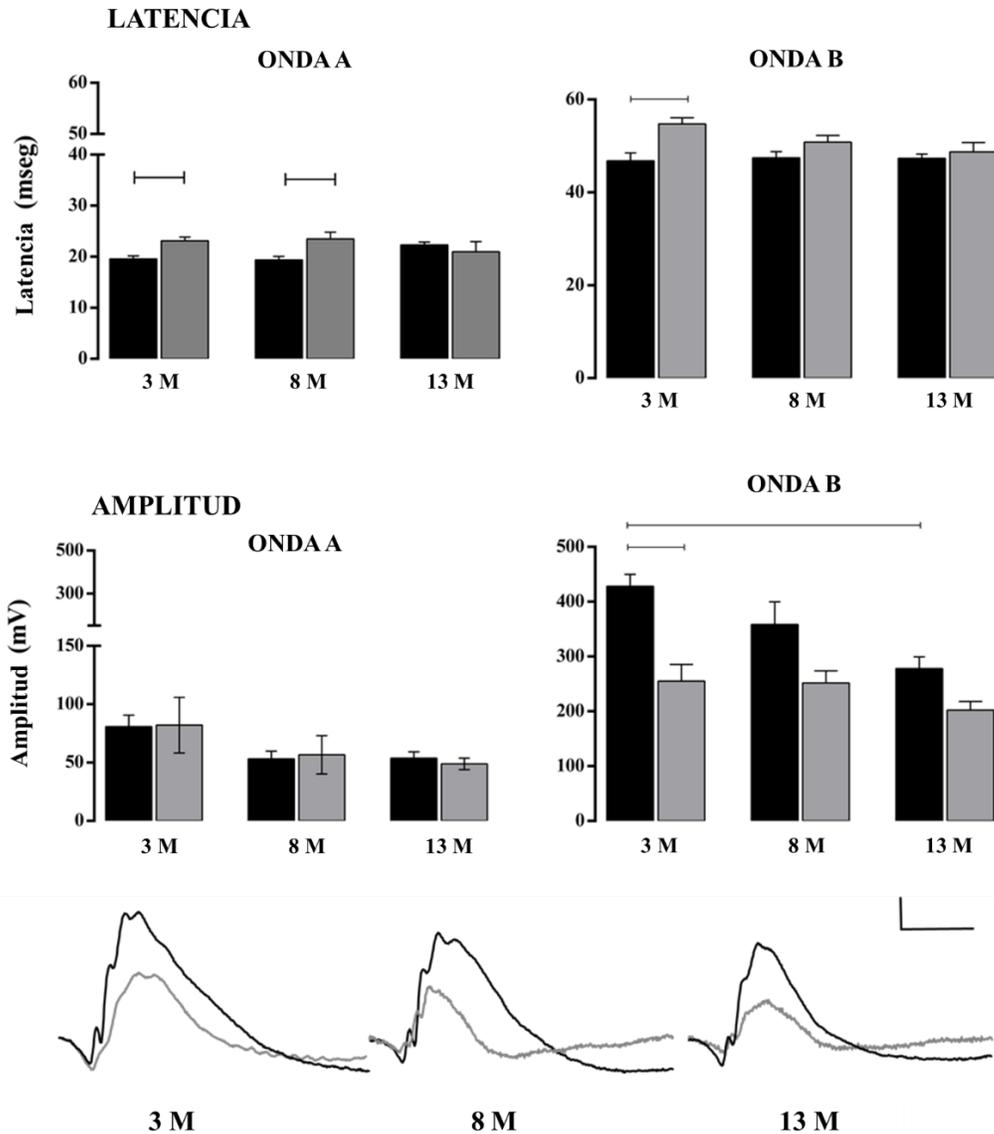


Figura 20. Análisis de latencia y amplitud en condiciones mesópicas. En el panel superior, la latencia de las ondas A y B. En el panel inferior la amplitud de las ondas A y B. Trazos representativos del ERG a los 3 Mo, 8 Mo y 13 Mo. Los animales NoTg están representados en negro y los 3xTg-AD en gris. ANOVA de dos vías por edad, prueba post hoc de Tukey, prueba $p < 0,05$, $n = +8$. Barra de calibración: 100 μ V/100 msec.

FOTOPICAS

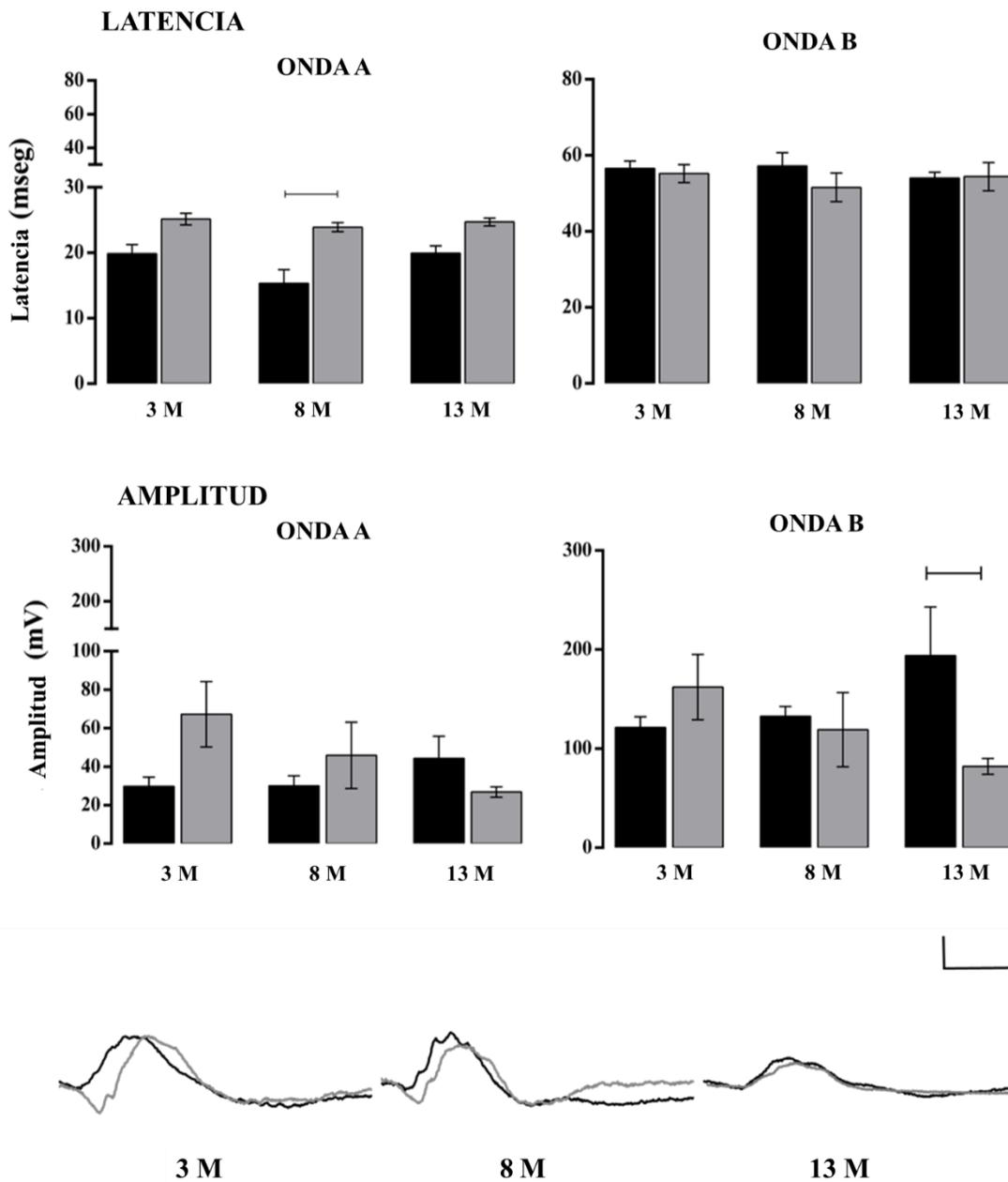


Figura 21. Análisis de latencia y amplitud en condiciones mesópicas. En el panel superior, la latencia de las ondas A y B. En el panel inferior la amplitud de las ondas A y B. Trazos representativos del ERG a los 3 Mo, 8 Mo y 13 Mo. Los animales NoTg están representados en negro y los 3xTg-AD en gris. ANOVA de dos vías por edad, prueba post hoc de Tukey, prueba $p < 0,05$, $n = +8$. Barra de calibración: 100 μ V/100 msec.

3. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO

En el análisis de los marcadores histopatológicos de la EA en el NSQ (**Figura 22** arriba), no se observaron placas amiloides a ninguna edad (arriba, derecha del panel superior), éstas se observaron sólo en la corteza (arriba, derecha). La inmunorreactividad de la proteína Tau fosforilada (abajo) suele observarse en el soma y en las prolongaciones dendríticas y axonales de las neuronas localizadas principalmente en el subículo, el hipocampo, la amígdala y la corteza. No identificamos la marca de esta manera, como se puede ver en la figura, se produjo parcialmente sólo en las fibras que pasan lateralmente por el tercer ventrículo en 8 y 13 Meses. En el análisis de la astrogliosis reactiva identificada por GFAP (**Figura 23**), se detectaron diferencias en el NSQ de los ratones 3xTg-AD 13 Meses, con respecto a las otras edades (ANOVA de 2 vías. 3 meses: 1.35 ± 0.006 , n=85; 13 meses: 1.32 ± 0.007 , n=47. $F = (2, 311) = 7.83$, $P = 0.0005$).

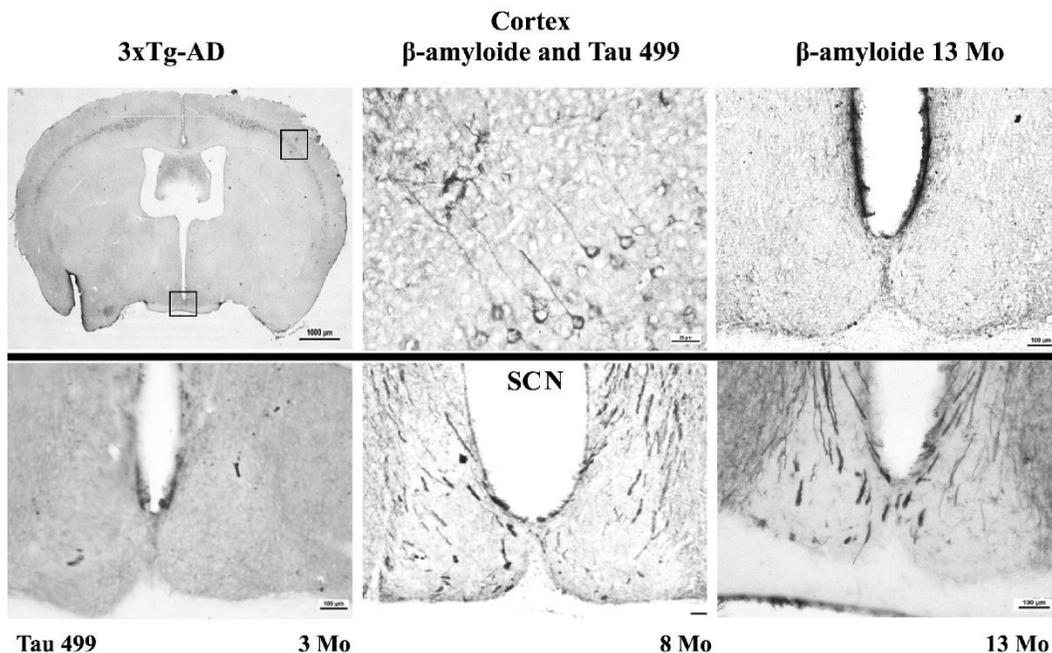


Figura 22. Corte coronal de cerebro de ratones 3xTg-AD (fila superior extremo izquierda), Inmunoreacción de b.amiloide y Tau 499 en cerebros de 3xTg-AD de 13 Meses de edad. Inmunoreacción de Tau 499 en cerebros de ratones 3xTg-AD de 3, 8, y 13 meses.

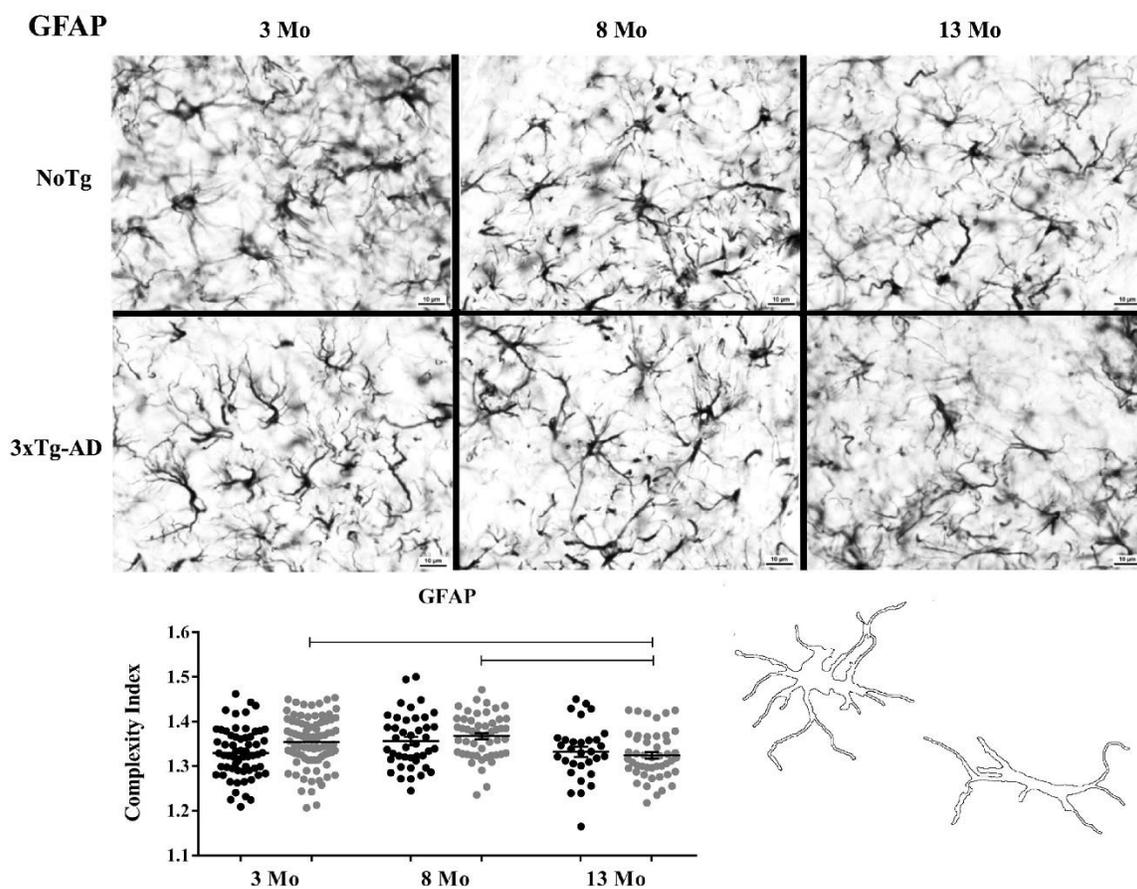


Figura 23. Inmunoreacción de GFAP en NSQ de ratones NoTg y 3xTg-AD de 3, 8 y 13 meses de edad. Gráfica del índice de complejidad de los astrocitos inmunomarcados.

El presente estudio es el primero en caracterizar los parámetros cronobiológicos en los ratones 3xTg-AD en condiciones de libre movimiento, bajo condiciones de jet lag sin utilizar un dispositivo de rueda. Esta diferencia es relevante, ya que la actividad de correr con ruedas promueve el metabolismo, la fisiología e influye en el período de libre movimiento, así como en los efectos diurnos (Harrington et al., 2007; Leise et al., 2013). El proceso neurodegenerativo que se muestra en los ratones 3xTg-AD es complejo, expresándose los marcadores histopatológicos de la EA (β -placas amiloides y proteína tau hiperfosforilada) en grado variable en diferentes zonas del cerebro (Oddo et al., 2003); además, no siempre se correlacionan directamente las anomalías funcionales y neuronales (Belfiore et al., 2019). En el caso del NSQ, cabe señalar en los ratones 3xTg-AD la presencia de hilos de proteína tau hiperfosforilada dentro de este núcleo a 8 y 13 Meses, pero la ausencia de placas amiloides β en todas las edades comprobadas.

Las alteraciones circadianas en los ratones 3xTg-AD

Los resultados indicaron que los ratones 3xTg-AD de 13 Meses aumentaron la actividad locomotriz total y la actividad en la fotofase después del avance de la LD. En la escotofase, la tendencia al aumento de la actividad se mantiene, pero no alcanza la significación estadística. Este resultado contrasta con los estudios que han registrado la actividad locomotriz utilizando la rueda (Sterniczuk et al., 2010; Do et al., 2018). Por lo tanto, el método de registro puede influir en las diferencias observadas. Los estudios en los que se utiliza la rueda reflejan la interacción entre los factores de comportamiento y motivación que pueden inducir comportamientos obsesivos y adictivos (Novak et al., 2012). Leise y otros, en el 2013 encontraron que el acceso a una rueda alivió algunos cambios relacionados con la edad en el sistema circadiano, como los cambios en el período, la capacidad de resincronización después del cambio en el ciclo de LD y la tasa de disparo en los explantes del NSQ. Probablemente las diferencias con el estudio de Sterniczuk et al. (2010) se deben al uso de la rueda y a su elección de montar un conjunto de ratones antes y después

del establecimiento de las marcas histopatológicas. Sin embargo, creemos que un entorno sin rueda permite a los investigadores observar la actividad motora espontánea sin la influencia motivadora de la rueda y reduce el efecto del ejercicio físico que retrasa el desarrollo de la EA al aumentar la plasticidad neuronal y vascular en las zonas afectadas por la EA (Duzel et al., 2016; Isla et al., 2016). Curiosamente, los ratones 3xTg-AD de 3 meses muestran un aumento de la actividad al comienzo de la escotofase, después del avance, pero no después de los retrasos. Este comportamiento no había sido observado antes en este modelo para la EA y podría implicar una regulación diferente del NSQ a otros centros del cerebro que regulan la actividad, incluyendo el hipotálamo dorsomedial (Reuss et al., 1995). Dentro del NSQ hay un gradiente en el que las neuronas de la región ventral muestran un cambio de fase más rápido que las de la región dorsal con un avance de 6 h (Davidson et al., 2008). La velocidad a la que los genes del reloj cambian a un nuevo horario difiere en los avances y los retrasos (Reddy et al., 2002). Los ratones 3xTg-AD también muestran poblaciones reducidas de células vasopresinérgicas y vipérgicas en el NSQ (Sterniczuck et al., 2010), lo que puede contribuir a una reentrada más rápida después del cambio en el ciclo LD. Se ha informado de que los ratones que carecen de receptores de vasopresina V1a-/-V1b-/- responden ligeramente al desfase horario (Yamaguchi & Okamura, 2018). Es necesario realizar más estudios en ratones 3xTg-AD para dilucidar mejor la relación entre la progresión de la EA y las respuestas circadianas atípicas al arrastre. Las áreas hipotalámicas que integran el comportamiento y el metabolismo se deterioran en la EA (Vercruysse et al., 2018). En estudios anteriores, la mayor actividad relacionada con la puesta de sol se ha relacionado con la adaptación celular que tiene lugar al comienzo de la fase de reposo (Volicer et al., 2001). En el presente estudio se observó que el aumento de la actividad se facilitaba durante el avance del fotoperíodo y aparecía al comienzo de la fase de actividad a los 3 meses. A los 13 Meses, la actividad aumentó tanto en la fotofase como en la escotofase. Un aumento significativo de la actividad al final de la noche subjetiva, correspondiente a un supuesto síndrome del ocaso debería haberse mostrado, pero no se observó en este trabajo.

Además, observamos que en ratones 3xTg-AD de 3 Meses, hay un acortamiento del periodo circadiano en DD, lo que apoya los informes de Sterniczuk et al. (2010) y Wu et al. (2018), que indican que es posible el acortamiento del periodo en organismos de menos de 6 meses de edad. Sin embargo, no detectamos la presencia de β -amiloide en el NSQ a ninguna de las edades estudiadas (datos no mostrados), mismas que muestran la presencia de placas de β -amiloide en varias zonas cerebrales (Oddo et al., 2003). El periodo más corto a edades tempranas sugiere un cambio en la maquinaria del reloj circadiano en los ratones 3xTg-AD que no está directamente asociado con la presencia de los marcadores histopatológicos tradicionales de la EA. Stopa et al. encontraron ovillos neurofibrilares en el NSQ de pacientes con demencia avanzada. En otros estudios se ha observado que la EA está asociada a cambios en la actividad de enzimas fosforilantes, como la caseína quinasa I (Flajolet et al., 2007; Adler et al., 2019), y que la modulación de la actividad de la caseína quinasa I δ/ϵ cambia el periodo de funcionamiento libre y adelanta o retrasa el arrastre a la LD (Sprouse et al., 2010). Por lo tanto, la fosforilación de los componentes moleculares del reloj circadiano está vinculada a la implementación de un período corto en libre corrimiento y al inicio avanzado de la actividad. Asimismo, la enzima GSK3 β se ha relacionado con el funcionamiento del reloj molecular y la EA; fosforila al menos 5 proteínas del reloj y regula el periodo de la proteína PER (Besing et al., 2017). Además, GSK3 β promueve los ovillos neurofibrilares que interrumpen el correcto ensamblaje del citoesqueleto neuronal y provocan la pérdida sináptica (Mercado-Gómez et al., 2008).

Los ciclos transitorios, el enmascaramiento y el ángulo de fase son indicadores de la capacidad del sistema circadiano para resincronizarse durante un protocolo de jet lag. Estos parámetros se alteran con la edad, ya que los individuos de mayor edad necesitan más ciclos transitorios para alcanzar una fase estable (Sellix et al., 2012; Musiek et al., 2018). No encontramos diferencias en los transitorios al avance de LD, ni siquiera en los ratones más jóvenes (Figura Suplementaria 1) con una fase más constante. La evaluación de las diferencias para resincronización durante los retrasos de fase está enmascarada cuando se utiliza el inicio (Figura 16), y una alta variabilidad en el conjunto de la actividad reduce la posibilidad de observar posibles

diferencias. Anteriormente se observó que no existían diferencias en el cambio de fotofase entre NoTg y 3xTg-AD (Sterniczuk et al., 2010). Otro efecto del corto periodo de funcionamiento libre es el adelanto de la acrofase y el inicio de la actividad en los ratones 3xTg-AD jóvenes.

La conexión directa de la retina con el NSQ y la hojuela intergeniculada (IGL, por sus siglas en inglés), son 2 áreas implicadas en la regulación de la sincronización y el enmascaramiento (Gall et al., 2016). El enmascaramiento negativo es la supresión de la actividad locomotriz en presencia de luz. Observamos que el efecto de la luz sobre el enmascaramiento es diferente cuando se genera en la primera o en la segunda mitad de la noche, lo que indica que el enmascaramiento también ejerce una regulación circadiana y que diversos mecanismos neurales participan en dicha respuesta (Redlin et al., 2005). Las diferencias observadas en el presente trabajo sugieren que es necesario realizar más estudios para entender por qué el enmascaramiento es diferente en los ratones 3xTg-AD. Una primera aproximación mediante ERG indica una deficiencia en la amplitud de la onda B mesópica, pero no fotópica. La degeneración de la retina reduce el enmascaramiento negativo con luz brillante y puede facilitar el enmascaramiento positivo con luz tenue (Mrosovsky & Thompson, 2008).

En nuestros resultados, hubo un aumento inmediato de la actividad locomotriz en los ratones 3xTg-AD a los 8 meses en el avance de LD (Figura 4C), lo que indica un enmascaramiento positivo. Este hallazgo sugiere una reducción en la percepción de la luz; sin embargo, en la amplitud de la onda a, no se observaron diferencias significativas, lo que indica que no hay alteración en la fotorrecepción y que la entrada de luz que llega a la retina externa está siendo correctamente integrada. Sin embargo, aunque los fotorreceptores funcionaron correctamente, nuestros datos sugieren que algunos relevos de la retina interna podrían haber sufrido un cambio funcional. Se necesitan más estudios sobre las ipRGC, que desempeñan un papel predominante en este fenómeno de enmascaramiento (Lazzerini Osprei et al., 2017; Fernández et al., 2018). Los ratones 3xTg-AD mostraron un menor número de ciclos transitorios para alcanzar una fase estable tras el avance de LD, lo que es consistente con un corto periodo de funcionamiento libre del ritmo circadiano de la

actividad locomotriz. El inicio de la actividad en animales jóvenes también se ve afectado por el periodo intrínseco y la ZT (Floessner & Hut, 2017). Sin embargo, aunque el periodo de libre corrimiento sigue siendo corto con la edad, el ángulo de fase al apagar las luces se retrasa en los ratones más viejos (13 Meses), lo que indica que podrían darse otras condiciones de deterioro entre el marcapasos y la salida del reloj.

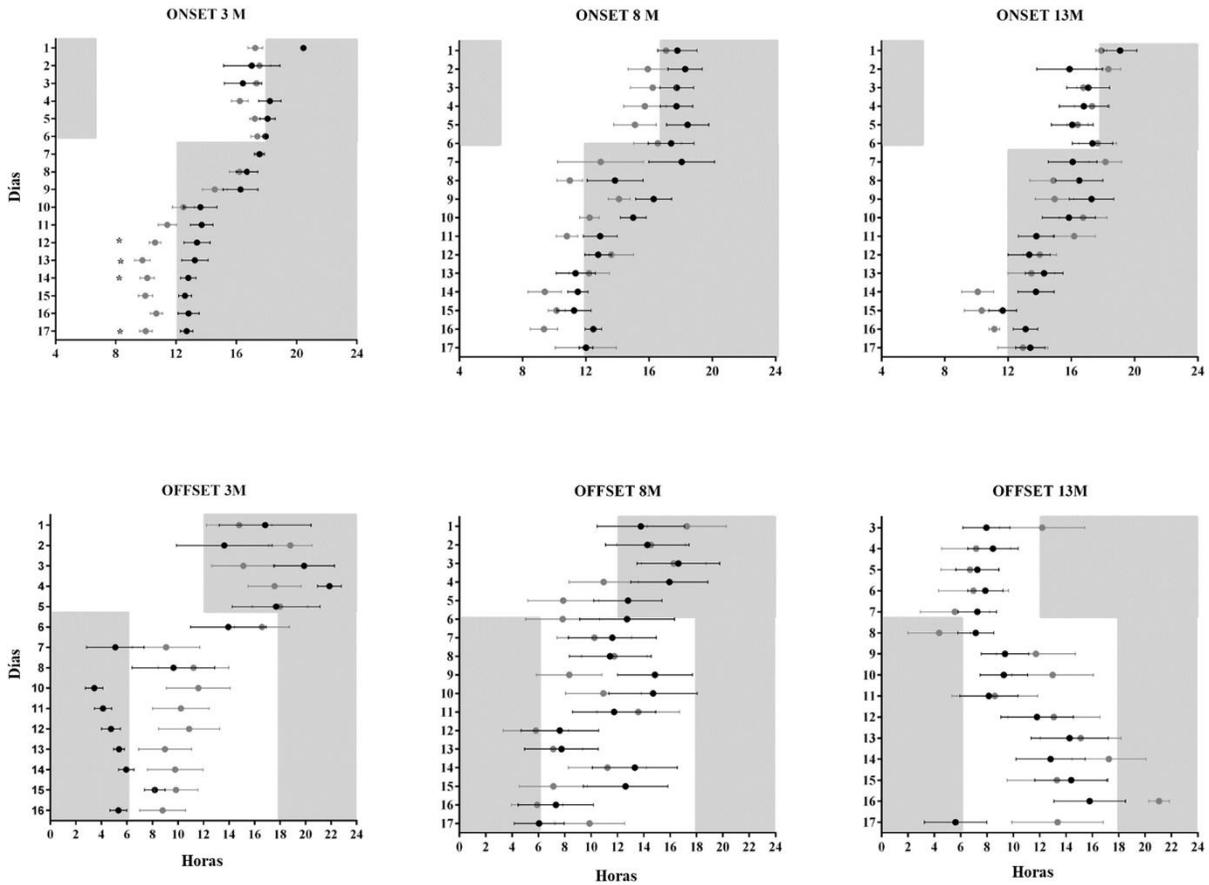
Electrorretinograma

El registro fERG en condiciones mesópicas (oscuridad) implica la respuesta de las células retinianas dentro de la capa externa, por lo que no es posible separar la respuesta de las ipRGC. En la capa externa de la retina tiene lugar la respuesta de los fotorreceptores (principalmente bastones, pero también conos) (onda A), las células bipolares y las células de Muller (onda B). En condiciones fotópicas (la respuesta la dan sólo los conos) (Iragui-Madoz, 2009). Sin embargo, este tipo de ERG es útil para identificar alteraciones en la funcionalidad del tejido neural extracerebral, lo que apoya la premisa de que la retina es una "ventana" para estudiar el cerebro. En este contexto, la ERG es una herramienta para observar eventos tempranos en un protocolo no invasivo. Demostramos que en los ratones 3xTg-AD, la disminución de la amplitud de la onda B en condiciones mesópicas se produce en etapas tempranas de la patología de la EA (3 Meses), mientras que en los ratones NoTg, la reducción se produce progresivamente con la edad. Estos resultados podrían estar relacionados con un estudio de Grimaldi et al., (2018) quienes encontraron depósitos de proteína amiloide y tau, degeneración de células ganglionares, astrogliosis y activación microglial en la retina de ratones 3xTg-AD a las 5-20 semanas de edad.

CONCLUSIONES

Basándonos en el análisis de la actividad locomotriz libre de 24 h, sin dispositivos de rodaje, demostramos que el ritmo circadiano de la actividad locomotriz en ratones 3xTg-AD jóvenes mostraba diferencias bajo un protocolo de jet lag y DD, a una edad previa a la detección de los marcadores histopatológicos clásicos de la EA. Además, los ratones 3xTg-AD mostraron una función retiniana reducida a partir de los 3 meses. El ajuste a LD no mostró déficits, indicando que el sistema circadiano tiene mecanismos de resiliencia que lo hacen resistente al proceso neurodegenerativo característico de estos ratones transgénicos. Nuestros resultados sugieren que este protocolo de jet lag (actigrafía) y el fERG, pueden añadirse a la extensa batería de pruebas disponibles para la detección temprana y no invasiva de la EA.

Una nota de precaución es pertinente: no se puede descartar que las diferencias cronobiológicas detectadas en este estudio entre los ratones NoTg y 3xTg-AD puedan deberse a la deriva genética o a otra alteración cromosómica, como consecuencia de las múltiples manipulaciones moleculares para construir los ratones transgénicos triples.



Supl. 1. Promedio (\pm SE) del inicio (paneles superiores) y del desplazamiento de la actividad locomotora (paneles inferiores). El inicio se muestra sólo para los avances en los horarios LD, mientras que el desplazamiento se muestra sólo para los retrasos, para excluir el efecto de enmascaramiento de la luz. Se comparan tres edades: 3, 8 y 13 meses, respectivamente. Los círculos grises corresponden a los datos de los ratones 3xTgAD, y los círculos negros a su grupo de control. Las diferencias significativas entre grupos se señalan con una estrella (ANOVA de 2 vías, $P=0.05$).

AVERAGE ACTIVITY (movements/10 min)				
	INITIAL	TOTAL	NoTg (n=7-10)	3xTg-AD (n=7-13)
3 Mo			65.40 ± 14.20 c	37.94 ± 6.10 c (p=0.01)
8 Mo			37.90 ± 6.22	25.70 ± 5.16 # (F=3.3, p=0.05)
13 Mo			39.90 ± 8.50	57.25 ± 13.60 #
	DAY			
3 Mo			28.61 ± 8.84	17.8 ± 3.40
8 Mo			19.20 ± 3.42	14.40 ± 2.23
13 Mo			20.90 ± 4.64	20.90 ± 8.30
	NIGHT			
3 Mo			102.20 ± 26.20	59.43 ± 13.61
8 Mo			56.60 ± 10.20	36.95 ± 8.24 & (F=3.5, p=0.04)
13 Mo			58.91 ± 15.14	93.62 ± 22.46 &
	ADVANCE	TOTAL	NoTg (n=7-10)	3xTg-AD (n=7-13)
3 Mo			52.20 ± 10.00	52.73 ± 5.16
8 Mo			29.13 ± 5.70 e (P=0.01)	30.48 ± 9.40 * (F=5.0, p=0.01)
13 Mo			43.05 ± 10.60 a (P= 0.035) e	82.70 ± 19.74 a *
	DAY			
3 Mo			26.80 ± 9.64	21.33 ± 2.14 † (F=5.2, p=0.01)
8 Mo			17.75 ± 4.17	19.00 ± 5.45 ‡ (F=5.2, p=0.01)
13 Mo			21.61 ± 9.40 b (P= 0.04)	51.30 ± 14.54 b † ‡
	NIGHT			
3 Mo			77.61 ± 13.50	84.12 ± 9.80
8 Mo			40.51 ± 7.82 f	42.00 ± 14.50 @ (F=4.2, p=0.02)
13 Mo			64.50 ± 13.43 f (P=0.02)	114.12 ± 28.32 @
	DELAY	TOTAL	NoTg (n=8-11)	3xTg-AD (n=7-13)
3 Mo			58.22 ± 10.54 d	37.7 ± 6.65 d (p=0.04)
8 Mo			47.07 ± 6.00	33.56 ± 8.94
13 Mo			43.55 ± 9.90	62.99 ± 18.10
	DAY			
3 Mo			49.65 ± 19.34	21.10 ± 3.73
8 Mo			37.66 ± 6.21	21.10 ± 7.13
13 Mo			26.25 ± 8.20	33.10 ± 13.43
	NIGHT			
3 Mo			66.80 ± 12.10	54.33 ± 12.10
8 Mo			56.50 ± 9.80	46.10 ± 11.80
13 Mo			60.90 ± 14.40	92.90 ± 30.43
	ACROPHASES (ZT)			
	INITIAL		NoTg (n=8-11)	3xTg-AD (n=7-13)
3 Mo			17.61 ± 0.23	16.24 ± 0.26
8 Mo			17.19 ± 0.49	16.12 ± 0.62
13 Mo			16.53 ± 0.53	16.70 ± 0.43
	ADVANCE			
3 Mo			17.80 ± 0.49 g	15.40 ± 0.20 g (P=0.003)
8 Mo			17.30 ± 0.46 h	15.38 ± 0.36 h (p=0.019)
13 Mo			17.02 ± 0.37 i	15.22 ± 0.64 i (p=0.028)
	DELAY			
3 Mo			16.60 ± 0.63	15.86 ± 0.32
8 Mo			16.25 ± 0.53	15.67 ± 0.35
13 Mo			14.40 ± 0.73	15.64 ± 0.82
	Letter	ANOVA 2-ways		
	Symbol	ANOVA one-way		

Tabla 1. Análisis estadístico de experimentos cronobiológicos en ratones 3xTg-AD bajo el protocolo de jet lag.

Arriba, la media (\pm SE) de la actividad locomotora total, diurna y nocturna (movimientos/célula) a los 3, 8 y 13 meses, entre los ratones no transgénicos (NoTg, n = tamaño de la muestra) y los ratones triplemente transgénicos para la enfermedad de Alzheimer (3xTg-AD). A continuación, se muestra la media (\pm SE) de las acrofases en el tiempo de Zeitgeber (ZT). Las diferencias estadísticas dentro de cada grupo (ANOVA de una vía) se indican entre los datos con los mismos símbolos. Diferencias entre los ratones NoTg y 3xTgAD (entre grupos; ANOVA de dos vías) se indican con la misma letra.

- Adler P, Mayne J, Walker K, Ning Z, Figeys D. (2019). Therapeutic Targeting of Casein Kinase 1 δ/ϵ in an Alzheimer's Disease Mouse Model. *J Proteome Res.* 2019 Sep 6;18(9):3383-3393. doi: 10.1021/acs.jproteome.9b00312.
- Aguilar-Roblero R, Mercado C, Guadarrama P, Chávez JL. En: Hernández ME, y Ortega A (Eds)., *Fisiología Celular y molecular, Principios y conceptos.* Universidad Veracruzana, 2004. Pp. 181-192.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. (2004). *Molecular Biology of the Cell*, New York: 3er ed. Edit Garland Publishing.
- Ali AH, Stahr A, Ingenwerth M, Theis M, Steinhäuser C and von Gall Ch. (2019). Connexin30 and Connexin43 show a time-of-day dependent expression in the mouse suprachiasmatic nucleus and modulate rhythmic locomotor activity in the context of chronodisruption. *Cell Communication and Signaling.* 17:61.
- Antle MC & Silver R. (2005). Orchestrating time: Arrangements of the brain circadian clock. *Trends in Neurosciences*, 28(3), 145–151. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2005.01.003>
- Ahmad MH, Fatima M, Mondal AC. Influence of microglia and astrocyte activation in the neuroinflammatory pathogenesis of Alzheimer's disease: Rational insights for the therapeutic approaches. *Journal of Clinical Neuroscience* 59 (2019) 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2018.10.034>.
- Arendt J. (2018) Approaches to the Pharmacological Management of Jet Lag. *Drugs* 78:1419–1431. <https://doi.org/10.1007/s40265-018-0973-8>.
- Arranz AM, De Strooper B. The role of astroglia in Alzheimer's disease: pathophysiology and clinical implications. *Lancet Neurol* 2019; 18: 406–14. <http://dx.doi.org/10.1016/>
- Baño-Otálora B, & Piggins HD. (2017). Contributions of the lateral habenula to circadian timekeeping. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 162(May), 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2017.06.007>

- Bedrosian TA, Nelson RJ. Sundowning syndrome in aging and dementia: Research in mouse models. *Experimental Neurology* 243 (2013) 67–73. doi:10.1016/j.expneurol.2012.05.005.
- Belfiore R, Rodin A, Ferreira E, Velazquez R, Branca C, Caccamo A, Oddo S. Temporal and regional progression of Alzheimer's disease-like pathology in 3xTg-AD mice. *Aging Cell*. 2019 Feb;18(1): e12873. doi: 10.1111/ace1.12873.
- Besing RC, Rogers CO, Paul JR, Hablitz LM, Johnson RL, McMahon LL, and Gamble KL (2017) GSK3 activity regulates rhythms in hippocampal clock gene expression and synaptic plasticity. *Hippocampus* 27:890–898.
- Brady J. *Biological Clocks*. Edward Arnold Publishers, London (1979).
- Brancaccio M, Patton AP, Chesham JE, Maywood ES, and Hastings MH (2017) Astrocytes Control Circadian Timekeeping in the Suprachiasmatic Nucleus via Glutamatergic Signaling. *Neuron* 93:1420-1435.e5.
- Bohm C, Chen F, Sevalle J, Qamar S, Dodd R, Li Y, Schmitt-Ulms, St George-Hyslop PH. (2015). Current and future implications of basic and translational research on amyloid-B peptide production and removal pathways. *Molecular and Cellular Neurosciencie*.
- Bojarski L, Herms J, Kuznicki J. Calcium dysregulation in Alzheimer's disease. *Neurochem Int*. Mar-Apr 2008;52(4-5):621-33. doi: 10.1016/j.neuint.2007.10.002.
- Buijs RM & Kalsbeek A. (2001). Hypothalamic integration of central and peripheral clock. *Nature*. Vol 2. 521-526.
- Caba M, Corona Morales AA, Fernández Ma. del S, García García F, (2008). Bases celulares y moleculares de los ritmos biológicos. Segunda edición. Universidad Veracruzana. ed. Mario Caba.
- Cameron MA, Barnard AR, Lucas RJ (2008). The electroretinogram as a method for studying circadian rhythms in the mammalian retina. *J. Genet.* 87, 459–466].
- Cardinali DP, Ritmos biológicos. *Fisiología Humana*. Tresguerres JAF. et al. (eds). pp. 1133-1147 McGraw-Hill. Interamericana. Madrid (1999).

- Carter FS, Herholz K, Rosa-Neto P, Pellerin L, Nordberg A, Zimmer ER. Astrocyte Biomarkers in Alzheimer's Disease. *Trends in Molecular Medicine*. February, 2019, Vol.25, No.2. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.11.006>
- Castillo JI, Oliver SG. Systems biology of Alzheimer's Disease. Springer protocols Methods in Molecular Biology. DOI 10.1007/978-1-4939-2627-5
- Cenini J, Hebisch M, Iefremova V, Flitsch LJ, Breitkreuz Y, Tanzi RE, Kim DY, Peitz M, Brüstle O. Dissecting Alzheimer's disease pathogenesis in human 2D and 3D models. *Molecular and Cellular Neuroscience* (2020),
- Cermakian N, & Sassone-Corsi P. (2002). Environmental stimulus perception and control of circadian clocks. *Current Opinion in Neurobiology*, 12(4), 359–365. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(02\)00347-1](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(02)00347-1)
- Challet E. (2010). Interactions between light, mealtime and calorie restriction to control daily timing in mammals. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 180(5), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s00360-010-0451-4>
- Chi-Castañeda D, & Ortega A. (2017). The Role of Mammalian Glial Cells in Circadian Rhythm Regulation. *Neural Plasticity*, 2017, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2017/8140737>
- Chou TC, Scammell TE, Gooley JJ, Gaus SE, Saper CB, Lu J. (2003) Critical role of dorsomedial hypothalamic nucleus in a wide range of behavioral circadian rhythms. *J Neurosci*. Nov 19;23(33):10691-702. doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-33-0691.2003.
- Cirrito JR, Yamada KA, Finn MB, Sloviter RS, Bales KR, May PC, Schoepp DD, Paul SM, Mennerick S, Holtzman DM. Synaptic Activity Regulates Interstitial Fluid Amyloid- β Levels In Vivo. *Neuron*, Vol. 48, 913–922, December 22, 2005 by Elsevier Inc. DOI 10.1016/j.neuron.2005.10.028.
- Clow A, Hucklebridge F, Stalder T, Evans P, Thorn L. (2010). The cortisol awakening response: More than a measure of HPA axis function. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 35 97–103.
- Coogan AN, Schutova B, Husung S, Furczyk K, Baune BT, Kropp P, Häßler, Thome J. The circadian System in Alzheimer's Disease: Disturbance,

- Mechanisms, and Opportunities. *Biol Psychiatry* 74:333-339, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.11.021>.
- Czeisler CA, Kronauer RE, Allan JS, Duffy JF, Jewett ME, Brown EN, Ronda JM. (1989). Bright light induction of strong (type 0) resetting of the human circadian pacemaker. *Science*. Jun 16;244(4910):1328-33. doi: 10.1126/science.2734611.
- Davidson AJ, Yamazaki S, Arble DM, Menaker M, and Block GD (2008) Resetting of central and peripheral circadian oscillators in aged rats. *Neurobiol Aging* 29:471–477.
- Díaz-Lezama N, Wu Z, Adán-Castro E, Arnold E, Vázquez-Membrillo M, Arredondo-Zamarripa D, Ledesma-Colunga MG, Moreno-Carranza B, Martínez de la Escalera G, Colosi P and Clapp C. (2016). Diabetes enhances the efficacy of AAV2 vectors in the retina: therapeutic effect of AAV2 encoding vasoinhibin and soluble VEGF receptor 1 *Laboratory Investigation*. 96, 283–295. doi:10.1038/labinvest.2015.135.
- Diekmann CO, Bose A. Reentrainment of the circadian pacemaker during jet lag: East-west asymmetry and the effects of north-south travel. *Journal of Theoretical Biology* 437 (2018) 261–285. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2017.10.002>
- Domínguez-Solís CA y Pérez-León JA. (2015). Mecanismo de fototraducción de la melanopsina en las células ganglionares retinianas intrínsecamente fotosensibles (ipRGC). *Gac Med Mex*. 2015;151:764-76.
- Duncan MJ, Smith JT, Franklin KM, Beckett TL, Murphy MP, St. Clair DK, Donohue KD, Striz M, O'Hara B. (2012). Effects of aging and genotype on circadian rhythms, sleep, and clock genes expression in APPxPS1 knock-in mice, a model for Alzheimer's disease. *Experimental Neurology* 236, 249-258.
- Dunys J, Valverde A, and Checler F, Are N- and C-terminally truncated Abeta species key pathological triggers in Alzheimer's disease? *J Biol Chem*, 2018 293(40): p. 15419–15428.
- Duzel E, Van Praag H, and Sendtner M (2016) Can physical exercise in old age improve memory and hippocampal function? *Brain* 139:662–673.

- Fernandez DC, Fogerson PM, Lazzerini Ospri L, Thomsen MB, Layne RM, Severin D, Zhan J, Singer JH, Kirkwood A, Zhao H, Berson DM, and Hattar S (2018) Light Affects Mood and Learning through Distinct Retina-Brain Pathways. *Cell* 175:71-84.e18.
- Flajolet M, He G, Heiman M, Lin A, Nairn AC, and Greengard P (2007) Regulation of Alzheimer's disease amyloid- β formation by casein kinase I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:4159–4164.
- Floessner T, and Hut RA (2017) Basic Principles Underlying Biological Oscillations and Their Entrainment, in *Biological Timekeeping: Clock, Rhythms and Behaviour* (V K ed) pp 47–58, The Netherlands.
- Frost S, Martins RN, Kanagasigam Y. Ocular biomarkers for early detection of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2010;22(1):1-16. doi: 10.3233/JAD-2010-100819.
- García Fernández JM. Los ritmos biológicos y sus fundamentos neurales. En: *Manual de Neurociencia*. Delgado-García JM, Ferrús A, Mora F. Rubia F. (eds.), pp. 778-799. Síntesis, Madrid, (1998).
- Gall AJ, Shuboni DD, Yan L, Nunez AA, and Smale L (2016) Suprachiasmatic Nucleus and Subparaventricular Zone Lesions Disrupt Circadian Rhythmicity but Not Light-Induced Masking Behavior in Nile Grass Rats. *J Biol Rhythms* 31:170–181.
- Golombek DA and Rosenstein RE. (2010). Physiology of Circadian Entrainment. *Physiol Rev* 90: 1063–1102, 2010; doi:10.1152/physrev.00009.2009.
- Gooley JJ. Light Resetting and Entrainment of Human Circadian Rhythms. V. Kumar (ed.), *Biological Timekeeping: Clocks, Rhythms and Behaviour*. DOI 10.1007/978-81-322-3688-7_14.
- Graham DM, Wong KY. Melanopsin-expressing, Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells (ipRGCs). 2008 Aug 1 [Updated 2016 Nov 2]. In: Kolb H, Fernandez E, Nelson R, editors. *Webvision: The Organization of the Retina*

- and Visual System [Internet]. Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center; 1995.
- Grimaldi A, Brighi C, Peruzzi G, Ragozzino D, Bonanni V, Limatola C, Ruocco G, and Di Angelantonio S. (2018) Inflammation, neurodegeneration and protein aggregation in the retina as ocular biomarkers for Alzheimer's disease in the 3xTg-AD mouse model. *Cell Death and Disease*. 9:685
- Goedert M, Spillantini MG. Ordered assembly of Tau protein and neurodegeneration. En: *Tau Biology*. Takashima A, Wolozin B, Buee L (Eds). *Advances in Experimental Medicine and Biology* Vol. 1184 pp 3-32. (2019) Springer. <https://doi.org/10.1007/978-981-32-9358-8>.
- Guimerà A, Girones X, Sánchez-Cruz FF. (2002). Actualización sobre la patología de la enfermedad de Alzheimer, *Rev Esp Patol*. 35, 21-48.
- Gupta VK, Chitranshia N, Veer B. Gupta VB, Golzana M, Dheera Y, Vander Wall R, Georgevskya D, King AE, Vickers JC, Chung R, Graham S. Amyloid accumulation and inner retinal degenerative changes in Alzheimer's disease transgenic mouse. *Neuroscience Letters* 623 (2016) 52–56.
- Hankins MW, Peirson SN, & Foster RG. (2008). *Melanopsin: an exciting photopigment*. 31(1). <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.11.002>
- Hempel H, Toschi N, Babiloni C, Baldacci F, Black KL, Bokde AL, Bun RS, Cacciola F, Cavedo E, Chiesa PA, Colliot O, Coman CM, Dubois B, Duggento A, Durrleman S, Ferretti MT, George N, Genthon R, Habert MO, Herholz K, Koronyo Y, Koronyo-Hamaoui M, Lamari F, Langevin T, Lehericy S, Lorenceau J, Neri C, Nisticò R, Nyasse-Messene F, Ritchie C, Rossi S, Santarnecchi E, Sporns O, Verdooner SR, Vergallo A, Villain N, Younesi E, Garaci F, Lista S for the Alzheimer Precision Medicine Initiative (APMI). Revolution of Alzheimer Precision Neurology: Passageway of Systems Biology and Neurophysiology. *J Alzheimers Dis*. 2018 ; 64(Suppl 1): S47–S105. doi:10.3233/JAD-179932.
- Harper DG, Volicer L, Stopa EG, McKee AC, Nitta M, Satlin A. Disturbance of Endogenous Circadian Rhythm in Aging and Alzheimer Disease. *Am J Geriatr Psychiatry* 13:5, May 2005.

- Harper DG, Stopa EG, Kuo-LeBlanc V, McKee AC, Kentaro A, Volicer L, Kowall N, Satlin A. (2008). Dorsomedial SCN neuronal subpopulations subserve different functions in human dementia. *Brain*. 131(6). 1609-1617.
- Harrington M, Molyneux P, Soscia S, Prabakar C, McKinley-Brewer J, Lall G. Behavioral and neurochemical sources of variability of circadian period and phase: studies of circadian rhythms of npy ^{-/-} mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292: R1306–R1314, 2007. doi:10.1152/ajpregu.00383.2006.
- Heyde I, Kiehn JT, & Oster H. (2018). Mutual influence of sleep and circadian clocks on physiology and cognition. *Free Radical Biology and Medicine*, 119(July 2017), 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.11.003>
- Hunt JL, Zaretsky DV, Sarkar S, Dimicco JA. (2010). Dorsomedial hypothalamus mediates autonomic, neuroendocrine, and locomotor responses evoked from the medial preoptic area. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. Jan;298(1):R130-40. doi: 10.1152/ajpregu.00574.2009.
- Iragui-Madoz (2009) Tests electrofisiológicos en el estudio de la patología visual. *Electrophysiological tests in the assessment of visual disorders. An Sist Sanit Navar An Sist Sanit Navar* 32:93–103.
- Isla AG, Vázquez-Cuevas FG, and Peña-Ortega F (2016) Exercise Prevents Amyloid- β -Induced Hippocampal Network Disruption by Inhibiting GSK3 β Activation. *J Alzheimer's Dis* 52:333–43.
- Jagust W. Imaging the evolution and pathophysiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci*. 2018 November; 19(11): 687–700. doi:10.1038/s41583-018-0067-3
- Jones JR, Simon T, Lones L and Herzog ED. (2018). SCN VIP neurons are essential for normal light-mediated resetting of the circadian system. *J. Neurosci* ; 10.1523/JNEUROSCI.1322-18.2018.
- Johnson GVW, Stoothoff WH. Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. *J Cell Sci* (2004) 117 (24): 5721–5729. <https://doi.org/10.1242/jcs.01558>.
- Kafka M, Maragos PJ. & Moore RY. Suprachiasmatic nucleus ablation abolishes circadian rhythms in rat brain neurotransmitter receptors. *Brain Res*. 327, 344-347 (1985).

- Kalsbeek A, Yi C-X, Cailotto C, la Fleur SE, Fliers E, Buijs RM. (2011) Mammalian clock output mechanisms. *Biochemical Society Essays Biochem.* 49, 137–151; doi:10.1042/BSE0480137.
- Kandel ER, Schwartz JH and Jessell TM. *Principles of Neural Science.* (2000). McGraw-Hill, 4ta. edition.
- Kandel ER, Jessell TM & Schwartz JH, *Motivación. Neurociencia y Conducta.* (eds.), pp. 653-670 Prentice Hall, Madrid (1997).
- Katsouri L, Birch AM, Renziehausen AWJ, Zach C, Aman Y, Steeds H, Bonsu A, Palmer EOC, Mirzaei N, Ries M, Sastre M. Ablation of reactive astrocytes exacerbates disease pathology in a model of Alzheimer's disease. *Glia.* 2020; 68:1017–1030. DOI: 10.1002/glia.23759.
- Koeppen & Stanton, 2008. *Berne & Physiology* (Elseiver) Korf HW, von Gall C. (2006). Mice, melatonin, and the circadian system. *Mol Cell Endocrinol.* Jun 27;252(1-2):57-68. doi: 10.1016/j.mce.2006.03.005.
- Kuhlman SJ, Mackey SR, DuffyJF. (2007). *Biological Thythms Workshop: Introduction to Chronobiology.* Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 72: 1-6. doi:10.1101/sqb.2007.72.059.
- Kuhlman SJ & McMahon DG (2004). Rhythmic regulation of membrane potential and potassium current persists in SCN neurons in the absence of environmental input. *Eur J Neurosci.* Aug;20(4):1113-7. doi: 10.1111/j.1460-9568.2004.03555.x.
- Kwon HS, Koh SH. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Translational Neurodegeneration* (2020) 9:42. <https://doi.org/10.1186/s40035-020-00221-2>.
- Lazzerini Ospri L, Prusky G, and Hattar S (2017) Mood, the Circadian System, and Melanopsin Retinal Ganglion Cells. *Annu Rev Neurosci* 40:539–556.
- Leise TL, Indic P, Paul MJ, Schwartz WJ. Wavelet Meets Actogram *J Biol Rhythms.* 2013 February; 28(1): 62–68. doi:10.1177/0748730412468693.
- Liu S, Ong YT, Hilald, S, Loke YM, Wong TY. Chen CLH, Cheung CY, Zhou J. The Association Between Retinal Neuronal Layer and Brain Structure is Disrupted

- in Patients with Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 54 (2016) 585–595. DOI 10.3233/JAD-160067.
- Lucas RJ, Hattar S, Takao M, Berson DM, Foster RG, Yau KW. (2003). Diminished pupillary light reflex at high irradiances in melanopsin-knockout mice. *Science*.;299(5604):245–7.
- Lucas RJ. (2013). Mammalian Inner Retinal Photoreception. *Current Biology* 23, R125–R133, February 4, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2012.12.029>.
- Mattson MP, Pedersen WA. Effects of amyloid precursor protein derivatives and oxidative stress on basal forebrain cholinergic systems in Alzheimer's disease. *Int J Dev Neurosci*. Nov-Dec 1998;16(7-8):737-53. doi: 10.1016/s0736-5748(98)00082-3.
- McMahon DG, Iuvone PM, Tosini G. (2014). Circadian Organization of the Mammalian Retina: From Gene Regulation to Physiology and Diseases. *Prog Retin Eye Res*. 2014 March ; 0: 58–76. doi:10.1016/j.preteyeres.2013.12.001.
- Meijer JH. & Rietveld WJ. Neurophysiology of the suprachiasmatic circadian pacemaker in rodents. *Physiol. Rev.* 69, 671-707 (1989).
- Mercado-López CY, Díaz-Muñoz M. (2011). Tic-Tac biológico: ¿cómo medimos el tiempo? *Revista Ciencia UAQ*, 12(3), 1–13. Retrieved from <http://www.revista.unam.mx/vol.12/num3/art25/index.html>
- Miranda-Anaya M, Luna-Moreno D, Carmona-Castro A, Díaz-Muñoz M. Differences in Photic Entrainment of Circadian Locomotor Activity Between Lean and Obese Volcano Mice (*Neotomodon alstoni*). *J Circadian Rhythms*. 2017 Jan 27;15:1. doi: 10.5334/jcr.145.
- Moore RY. & Eichler VB. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res*. 42, 201-206 (1972).
- Morse D, & Sassone-Corsi P. (2002). Time after time: Inputs to and outputs from the mammalian circadian oscillators. *Trends in Neurosciences*, 25(12), 632–637. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(02\)02274-9](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(02)02274-9)
- Morrison H, Young K, Qureshi M, Rowe RK, Lifshitz J. Quantitative microglia analyses reveal diverse morphologic responses in the rat cortex after diffuse

- brain injury. *Nature Scientific Reports*. 7: 13211. DOI:10.1038/s41598-017-13581-z.
- Mrosofsky N, and Thompson S (2008) Negative and positive masking responses to light in retinal degenerate slow (rds/rds) mice during aging. *Vision Res* 48:1270–1273.
- Musiek ES. Circadian clock disruption in neurodegenerative diseases: cause and effect? *Frontiers in Pharmacology. Pharmaceutical Medicine and Outcomes Research*. (2015). Volume 6. Article 29:2 doi: 10.3389/fphar.2015.00029
- Musiek ES, Xiong DD, Holtzman DM. Sleep, circadian rhythms, and the pathogenesis of Alzheimer Disease. *Experimental & Molecular Medicine* (2016) 47, e148; doi:10.1038/emm.2014.121.
- Musiek ES, Bhimasani M, Zangrilli MA, Morris JC, Holtzman DM, and Ju YES (2018) Circadian rest-activity pattern changes in aging and preclinical Alzheimer disease. *JAMA Neurol* 75:582–590.
- Naseria NN, Wang H, Guoc J, Sharma M, Luoa W. The complexity of tau in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2019 July 13; 705: 183–194. doi:10.1016/j.neulet.2019.04.022.
- Novak C, Burghardt P, and JA. L (2012) The use of a running wheel to measure activity in roden. *Neurosci Biobehav Rev* 36:1001–1004.
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, ... LaFerla FM. (2003). Triple-transgenic model of Alzheimer's Disease with plaques and tangles: Intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neuron*, 39(3), 409–421. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00434-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00434-3)
- Ono D, Honma K, Honma S. (2020). GABAergic mechanisms in the suprachiasmatic nucleus that influence circadian rhythm. *Journal of Neurochemistry*. 2021;157:31–41.
- Ontiveros-Torres MÁ, Labra-Barrios ML, Díaz-Cintra S, Aguilar-Vázquez AR, Moreno-Campuzano S, Flores-Rodríguez P, Luna-Herrera C, Mena R, Perry G, Florán-Garduño B, Luna-Muñoz J, and Luna-Arias JP (2016) Fibrillar Amyloid- β Accumulation Triggers an Inflammatory Mechanism Leading to Hyperphosphorylation of the Carboxyl-Terminal End of Tau Polypeptide in the

- Hippocampal Formation of the 3xTg-AD Transgenic Mouse. *J Alzheimer's Dis* 52:243–269
- Panda S, Antoch MP, Miller BH, Su AI, Schook AB, Straume M, Schultz PG, SA Kay, Takahashi JS, Hogenesch B. (2002). Coordinated Transcription of Key Pathways in the Mouse by the Circadian Clock. *Cell*, Vol. 109, 307–320, May 3.
- Patton AP, & Hastings MH. (2018). The suprachiasmatic nucleus. *Current Biology*, 28(15), R816–R822. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.06.052>
- Pfeffer M, Korf HW, and Charlotte von Gall. Chronotype and stability of spontaneous locomotor activity rhythm in BMAL1-deficient mice. *Chronobiology International*, 2015; 32(1): 81–91. DOI: 10.3109/07420528.2014.956218.
- Reddy AB, Field MD, Maywood ES, and Hastings MH (2002) Differential resynchronisation of circadian clock gene expression within the suprachiasmatic nuclei of mice subjected to experimental jet lag. *J Neurosci* 22:7326–7330.
- Redlin U, Hattar S, and Mrosovsky N (2005) The circadian Clock mutant mouse: Impaired masking response to light. *J Comp Physiol A Neuroethol Sensory, Neural, Behav Physiol* 191:51–59.
- Reuss S, Olcese J. (1995). Neuropeptide Y: Distribution of Immunoreactivity and Quantitative Analysis in Diencephalic Structures and Cerebral Cortex of Dwarf Hamsters under Different Photoperiods. *Neuroendocrinology*. Apr;61(4):337-47. doi: 10.1159/000126856.
- Rogawski MA, Wenk GL. The neuropharmacological basis for the use of memantine in the treatment of Alzheimer's disease. *CNS Drug Rev*. Fall 2003;9(3):275-308. doi: 10.1111/j.1527-3458.2003.tb00254.x.
- Ruan GX, Zhang DQ, Zhou T, Yamazaki S, McMahon DG. (2006). Circadian organization of the mammalian retina. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jun 20;103(25):9703-8. doi: 10.1073/pnas.0601940103.
- Saptadip S. (2020). Physiological and pharmacological perspectives of melatonin. *Archives of Physiology and Biochemistry*. DOI: 10.1080/13813455.2020.1770799

- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. VOL.9 NO.7. JULY 2012. Nature Methods. doi:10.1038/nmeth.2019.
- Sellix MT, Evans JA, Leise TL, Castanon-Cervantes O, Hill DD, DeLisser P, Block GD, Menaker M, and Davidson AJ (2012) Aging differentially affects the re-entrainment response of central and peripheral circadian oscillators. *J Neurosci* 32:16193–16202.
- Sengoku R. (2020). Aging and Alzheimer's disease pathology. *Neuropathology* 2020; 40, 22–29. doi:10.1111/neup.12626
- Shin J, Kepe V, Small GW, Phelps ME, Barrio JR. (2002). *Science*. Dec 13;298(5601):2213-6. doi: 10.1126/science.1076848
- Smeraski, CA, Sollars PJ, Ogilvie MD, Enquist LW & Pickard GE (2004) Suprachiasmatic nucleus input to autonomic circuits identified by retrograde transsynaptic transport of pseudorabies virus from the eye. *J. Comp. Neurol.*, 471, 298–313
- Sokolove PG, and Bushell WN (1978) The chi square periodogram: Its utility for analysis of circadian rhythms. *J Theor Biol* 72:131–160.
- Sprouse J, Reynolds L, Kleiman R, Tate B, Swanson TA, and Pickard GE (2010) Chronic treatment with a selective inhibitor of casein kinase I δ/ϵ yields cumulative phase delays in circadian rhythms. *Psychopharmacology (Berl)* 210:569–576.
- Sterniczuk R, Dyck RH, LaFerla F, Antle MC. (2010). Characterization of the 3xTg-AD mouse of Alzheimer's disease: Part 1. Circadian changes. *Brain Research* 139-148. A
- Stopa EG, Volicer L, Kuo LeBlanc V, Harper D, Lathi D, Tate B, Satlin A. (1999). Pathologic evaluation of the human Suprachiasmatic Nucleus in severe dementia. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. Vol. 58 (1) 29-39.

- Szegedi S, Dal-Bianco P, Stögmann E, Traub-Weidinger T, Rainer M, Masching A, Schmidl D, Werkmeister RM, Chua J, Schmetterer L, Garhöfer G. (2020). Anatomical and functional changes in the retina in patients with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Acta Ophthalmol.* Nov;98(7): e914-e921. doi: 10.1111/aos.14419.
- Tan JZA, Gleeson PA. The role of membrane trafficking in the processing of amyloid precursor protein and production of amyloid peptides in Alzheimer's disease. (2019). *BBA - Biomembranes* 1861:697–712. doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.11.013
- Tatarnikova OG, Orlov MA, Bobkova NV. Beta-Amyloid and Tau-Protein: Structure, Interaction, and Prion-Like Properties. *Biochemistry (Moscow)*, 2015, Vol. 80, No. 13, pp. 1800-1819. DOI: 10.1134/S000629791513012X.
- Thorpy MJ. Classification of sleep disorders. *Neurotherapeutics*. 2012;9(4):687-701. 2012;9(4):687–701. <https://doi.org/10.1007/s13311-012-0145-6>
- Tso CF, Simon T, Greenlaw AC, Puri T, Mieda M, Herzog ED. Astrocytes Regulate Daily Rhythms in the Suprachiasmatic Nucleus and Behavior. *Current Biology* 27, 1055–1061. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2017.02.037>.
- van der Kant R, Goldstein LSB and Ossenkoppeler R. Amyloid- β -independent regulators of tau pathology in Alzheimer disease. (2020). *Nature Reviews Neuroscience*. doi.org/10.1038/s41583-019-0240-3.
- Vega A. (1993). Análisis estadístico en cronobiología. *Psiquis*, Vol. 2.
- Vercruysse P, Vieau D, Blum D, Petersén Å, and Dupuis L (2018) Hypothalamic alterations in neurodegenerative diseases and their relation to abnormal energy metabolism. *Front Mol Neurosci* 11:1–16.
- Videnovic A, Lazar AS, Barker RA, Overeem S. 'The clocks that time us'—circadian rhythms in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurol*. 2014 December; 10(12): 683–693. doi:10.1038/hrneurol.2014.206.
- Vingtdoux V, Sergeant N, Buée L. Potential contribution of exosomes to the prion-like propagation of lesions in Alzheimer's disease. *Front Physiol*. 2012 Jul 5;3:229. doi: 10.3389/fphys.2012.00229. eCollection 2012.

- Volicer L, Harper DG, Manning BC, Goldstein R, and Satlin A (2001) Sundowning and circadian rhythms in Alzheimer's disease. *Am J Psychiatry* 158:704–711.
- Walker LC. A β Plaques. *Free Neuropathol*. 2020. doi:10.17879/ freeneuropathology -2020-3025.
- Walker WH, Walton JC, Courtney DeVries A, Nelson RJ. Circadian rhythm disruption and mental health. *Translational Psychiatry* (2020) 10:28
<https://doi.org/10.1038/s41398-020-0694-0>
- Wu M, Zhou F, Cao X, Yang J, Bai Y, Yan X, Cao J, and Qi J (2018) Abnormal circadian locomotor rhythms and Per gene expression in six-month-old triple transgenic mice model of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 676:13–18.
- Yamaguchi Y, and Okamura H (2018) Vasopressin Signal Inhibition in Aged Mice Decreases Mortality under Chronic Jet Lag. *iScience* 5:118–122.
- Young K, Morrison H. Quantifying Microglia Morphology from Photomicrographs of Immunohistochemistry Prepared Tissue Using ImageJ. *J Vis Exp*. 2018 Jun 5;(136):57648. doi: 10.3791/57648.
- Zepeda Velázquez CA, Lira Rocha S. (2007). Obtención de derivados 1-Nsustituidos de Melatonina. *Rev del Centro de inv. Universidad La Salle*. Vol.7, 28: 49-68.
- Zulfiqar S, Garg P, Nieweg K. (2019). Contribution of astrocytes to metabolic dysfunction in the Alzheimer's disease brain. *Biol Chem*. Aug 27;400(9):1113-1127. doi: 10.1515/hsz-2019-0140.
<https://dle.rae.es>