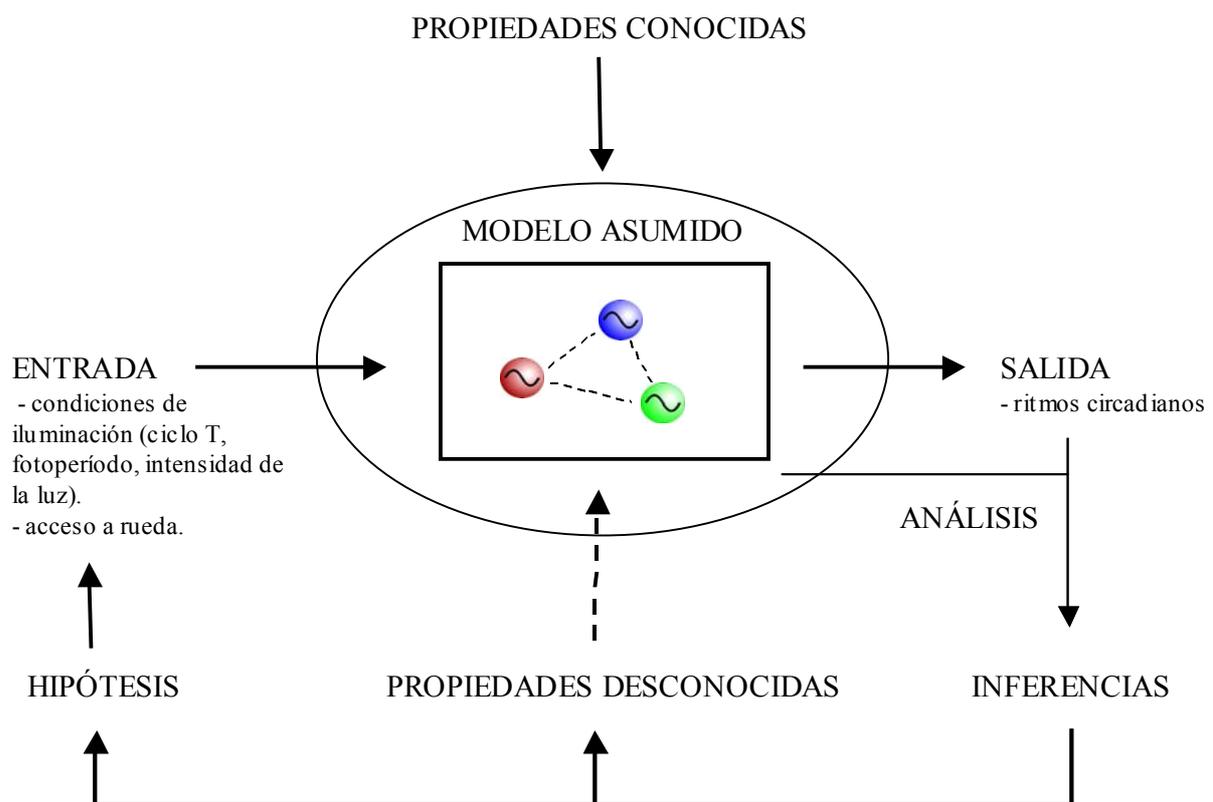


4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los trabajos desarrollados en esta tesis tuvieron como objetivo principal demostrar la plasticidad del sistema circadiano. Para ello se estudió su funcionalidad mediante condiciones ambientales críticas, utilizando como modelos la rata albina y el hámster Sirio. El método experimental siguió un *esquema de caja negra*, en el cual se manipulan las condiciones ambientales de entrada al sistema y se estudian sus variables de salida. Este esquema asume un enfoque emergentista ya que las inferencias sobre las propiedades del sistema circadiano, se obtienen a partir del estudio de sus propiedades emergentes (los ritmos comportamentales), sin intentar diseccionar sus partes. A partir de la evidencia empírica acumulada se asumen ciertas propiedades básicas del sistema, las cuales junto con la propia evidencia obtenida, sirven para formular las hipótesis de trabajo. La siguiente figura resume el esquema epistemológico utilizado.



Esquema epistemológico utilizado para el desarrollo del trabajo. Nótese que el análisis puede estar conducido por las propias características del modelo asumido.

La naturaleza funcional del sistema circadiano puede estudiarse mediante el análisis del fenómeno de encarrilamiento, una propiedad central del sistema circadiano. Este fenómeno consiste en la transducción e integración de las variaciones ambientales cíclicas para la regulación y el ajuste diario de los ritmos del organismo entre sí y con el ambiente. Clásicamente, se ha estudiado el encarrilamiento al ciclo luz/oscuridad (LO) asumiendo que sus efectos puedan ser tanto continuos como discretos, y que los mecanismos involucrados modificarían el período o la fase respectivamente de un oscilador único o reloj central, el cual presenta propiedades funcionales estables (τ , CRF). En el caso de utilizar la CRF para predecir las características del encarrilamiento (por ejemplo, sus límites), y asumir que la respuesta es mediada por un sistema discreto, éste es definido como un oscilador central de “sólo-fase” (Roenneberg y col., 2002).

Sin embargo, en el laboratorio el encarrilamiento a ciclos LO se presenta con más complejidad, sobre todo si se lo estudia en condiciones críticas de iluminación, cerca de los límites “naturales” de la capacidad del sistema para encarrilar. En estas condiciones, más allá de presentar encarrilamiento o libre curso como únicas respuestas extremas, el sistema presenta fenómenos intermedios, como por ejemplo la aparición de coordinación relativa o de ritmos simultáneos mostrando encarrilamiento y curso libre (Aschoff, 1981). Es más, otros sistemas fisiológicos que codifican la información ambiental por mecanismos extra-reloj o de enmascaramiento, pueden participar en la regulación temporal del ritmo manifiesto e incluso interactuar con el circadiano (Redlin and Mrosovsky, 1999). En particular el ritmo de actividad motora (AM) de la rata bajo ciclos T22 y T23 presenta un patrón de disociación en dos componentes. En este fenómeno, el encarrilamiento ocurre aparentemente sobre una parte del sistema al mostrarse un componente más dependiente de la luz (CDL), mientras que otra mantiene una oscilación más en curso libre e independiente del ciclo LO (CCL). Sin embargo, este encarrilamiento parcial podría ser sólo aparente, estando el sistema en curso libre y siendo el CDL producido entera o parcialmente por el enmascaramiento directo de la luz. Además, asumiendo que éste encarrilamiento parcial exista, resulta obvia la dificultad para interpretar este patrón desde un punto de vista de la teoría clásica y de un oscilador de “sólo-fase”.

Con el objeto de mejorar la comprensión de este fenómeno, y sabiendo que el fotoperíodo es capaz de modular el encarrilamiento, se estudió el ritmo de AM de ratas expuestas a ciclos T22 y T23 que presentaron distintos fotoperíodos (desde un 23% hasta un 77% del ciclo), concluyendo con una etapa en oscuridad constante (OO). La observación principal de este experimento, fue que el fotoperíodo ejerció un efecto gradual sobre la disociación, mayormente en T23. En primer lugar, puede verse en los actogramas que la manifestación del CCL se hace más evidente en T22, y con el acortamiento del fotoperíodo. El período del CDL se detectó significativamente en todos los individuos. La presencia de dos períodos significativos en el periodograma ocurrió mayormente en T22, y de manera independiente al fotoperíodo en este ciclo T. En T23 la disociación del ritmo se produjo en una proporción creciente de individuos al acortarse el fotoperíodo. En aquellos individuos que mostraron dos picos significativos, el período del CCL fue mayor en T22, y se incrementó con el aumento del fotoperíodo. Asumiendo que el efecto de la luz es continuo y directo sobre el sistema circadiano, se estudió el balance entre ambos componentes mediante la varianza que éstos explican en la serie temporal, como una medida del grado de importancia de cada componente. Esta variable mostró también cambios dependientes de la cantidad de luz por ciclo T, sugiriendo que el sistema presenta un mayor encarrilamiento en T23, y en fotoperíodos largos. Además, la proporción de actividad por hora en luz o en oscuridad fue estudiada, para estimar en qué grado la presencia de actividad en la escotofase se debía, o a enmascaramiento, o a ajustes específicos del reloj sobre el ritmo. Si bien esta variable no mostró una tendencia clara en relación al fotoperíodo en T22, se observó que varió en T23, con una mayor cantidad de AM en el ciclo T con 50% de luz, y que fue mayor en T23 independientemente del fotoperíodo.

Al analizar el ritmo en OO se evidencian los post-efectos de la imposición previa de ciclos T sobre el sistema. Se encontró que el fotoperíodo no afectó al τ y que el post-efecto fue mayor en T23, y en los individuos de este grupo que mostraron sólo un pico significativo en el periodograma. Luego, se estudió la relación entre la fase del ritmo en OO y la fase de cada componente del ritmo disociado en LO para revelar la existencia del control de sus fases por el ciclo externo. El control del CDL fue más evidente en T23, produciéndose en casi todos los fotoperíodos (excepto el de 50%), si bien en T22 se produjo en los dos fotoperíodos más largos. Además, la fase del ritmo en curso libre apareció más cercana a la del CCL en

T22, y en T23 bajo los dos fotoperíodos más cortos. Entonces, desde el punto de vista teórico, los criterios para demostrar la existencia de encarrilamiento se cumplen mayormente en T23, y en T22 con fotoperíodos largos, ya que además de existir el control del período por el ciclo LO, también la relación de fase entre el CDL y el ritmo en curso libre fue estrecha, y la relación de fase entre el ciclo LO y el CDL fue estable (aún en presencia del CCL). Por otro lado, en T22 el ritmo de AM se encuentra mayormente en curso libre. Además, se observaron mayores postefectos sobre el τ en T23. Esto debe considerarse junto al mayor grado de encarrilamiento (la proporción en las varianzas de los componentes) observado en T23, y en relación al incremento del fotoperíodo en ambos ciclos T.

Estas evidencias sugieren que los diferentes patrones observados en el ritmo manifiesto, son la expresión de distintas configuraciones funcionales de un proceso común que ocurre a nivel del sistema circadiano. Principalmente, cabe destacar la observación de distintos grados en la manifestación de la disociación, entre el mayor encarrilamiento del sistema en T23 con fotoperíodos largos, hacia el menor control del período y la fase del ritmo de AM con el consecuente curso libre, en T22 y fotoperíodos cortos. Si bien no puede descartarse totalmente la existencia de enmascaramiento en la manifestación del CDL, el patrón de AM observado en el límite inferior de encarrilamiento parece reflejar mayormente a un sistema funcionalmente disociado, o parcialmente encarrilado, por el ciclo LO. Otro hallazgo importante de este trabajo es la dependencia tanto del período como de la presencia del CCL, del incremento de la cantidad de luz. Estos cambios pueden ser explicados asumiendo los efectos continuos de la luz en el encarrilamiento, de acuerdo a las reglas de Aschoff al observar el ritmo en LL (Aschoff, 1981) o en ciclos de alta frecuencia (Aschoff, 1999). En este trabajo, fue posible también observar el alargamiento del período del CCL en ciclos T junto a la disminución en la manifestación del ritmo al incrementar el fotoperíodo, hecho que podría ser similar al aumento en la intensidad de la luz en LL.

En conclusión, la interpretación de los patrones de AM en el límite inferior de encarrilamiento, considerando o encarrilamiento o curso libre como fenómenos discretos resulta incompleta, ya que la respuesta del sistema puede ser gradual mostrando grados de encarrilamiento. En este sentido, para obtener una interpretación parsimoniosa de estos resultados: 1) presencia de dos componentes simultáneos, 2) balance en la expresión de los

dos componentes dependiendo de T y del fotoperíodo, 3) encarrilamiento gradual del sistema en relación a este balance, 4) mayores efectos sobre la fase y mayores post-efectos en el τ con el aumento de T y el decremento del fotoperíodo, es adecuado sostener que el reloj circadiano muestra flexibilidad, y que esta flexibilidad puede estar mediada por rearrreglos en la configuración funcional de un sistema multioscilario en los NSQ. Estos resultados pueden interpretarse globalmente mejor, asumiendo que por lo menos existen dos poblaciones de osciladores en los NSQ, cuyo acoplamiento está modulado por la intensidad de la luz de acuerdo al ciclo T y al fotoperíodo. Asumiendo que estas poblaciones tienen distintos períodos espontáneos, los osciladores que generan el CDL serían más encarrilables, mientras que los otros se mantienen acoplados entre sí generando el CCL. También puede considerarse que la mínima expresión del CDL es debida a enmascaramiento, y que a medida que el fotoperíodo aumenta más osciladores son reclutados aumentando su expresión. En T22, la mayoría de los osciladores del sistema se encuentran generando el CCL y unos pocos el CDL, siendo éste más consecuencia del enmascaramiento, mientras que lo contrario ocurrirá en T23. En ambos casos, la cantidad de luz produce una transición gradual entre un componente y el otro. Estos cambios sugieren que el sistema, dada su plasticidad, es capaz de adquirir distintas reorganizaciones funcionales durante su ajuste al ciclo de LO.

Como se ha descrito, el estudio del encarrilamiento a ciclos T cerca de los límites teóricos del sistema, resulta muy útil para inferir propiedades funcionales específicas del mismo. Como corolario del anterior trabajo, siendo este fenómeno gradualmente dependiente del fotoperíodo, resulta probable que la determinación precisa del rango de encarrilamiento no dependa sólo de la relación entre τ y T y de la amplitud de la PRC. Además, el sistema circadiano está sujeto a cambios plásticos dependientes de su propia historia previa (Pittendrigh y Daan, 1976a; Hoffman, 1971; (Reebs y Doucet, 1997). Entonces, esta determinación podría estar sesgada por las distintas estrategias experimentales utilizadas, que varían en el tiempo de adaptación de los animales al ciclo T . Asumiendo que existe plasticidad en el sistema, es posible que este tiempo sea crítico y condicione el encarrilamiento. Además, el sistema circadiano puede utilizar información cíclica independiente de los efectos directos de la luz sobre el reloj. Estos factores no-fóticos son mayormente derivados de los propios procesos rítmicos sujetos al encarrilamiento por la luz, constituyendo un *feedback* sobre el sistema circadiano (Yannielli y Harrington, 2004). Uno de

los *zeitgebers* no-fóticos más investigados, es el de la propia actividad motora del animal, la cual puede modificar la fase (Mrosovsky y Salmon, 1989) y el período del ritmo (Mrosovsky, 1999), pero no se conoce claramente su rol en animales expuestos a ciclos LO. Para probar la dependencia del encarrilamiento del tiempo de adaptación al ciclo T, se estudió el ritmo de AM del hámster Sirio en ciclos LO, mediante disminuciones escalonadas desde T22, con tiempos prolongados de adaptación en cada T. Además, se comenzó estudiando el ritmo de AM en *zeitgebers* LO débiles como ciclos T22, y luego se permitió la actividad en rueda (AR) de los animales, la cual dado sus efectos sobre el período, podría actuar como un posible refuerzo en el encarrilamiento.

Inicialmente en T22, los hámsteres mostraron un patrón de coordinación relativa del ritmo de AM, detectándose un período intermedio entre T y τ . Este patrón cambió al permitir a los animales la AR, observándose a los pocos días que el ritmo mostraba un período similar al del ciclo T en los periodogramas. Además, las reducciones sucesivas de T hasta T19.6, en pasos de entre 24 y 64 ciclos, permitieron observar el mantenimiento del control del período del ritmo tanto de AR como de AM. Sin embargo, el período del ritmo de AM se mantuvo igual a T al bloquear la rueda impidiendo la AR en T19.6, y luego de una sucesiva disminución hasta T19. Por otro lado, si bien sólo períodos iguales a T se detectaron en los periodogramas en cada ciclo T, la fase del ritmo presentó una inestabilidad diaria creciente con la reducción de T. Cabe destacar que, a pesar de esta inestabilidad, los patrones rítmicos no se mostraron ni en coordinación relativa ni en curso libre definido, aunque en T20 y T19.6, se observa una cierta tendencia hacia éste último. Es más, la fase α del ritmo de AR y de AM se localizó mayormente durante la escotofase, mientras que no se observó actividad durante la fotofase.

Para demostrar la existencia de encarrilamiento, se estudió el control de la fase del ritmo en LO, encontrándose un agrupamiento significativo de la fase del ritmo en OO al proyectarla hacia el último día en LO. Además se verificó la existencia de postefectos al estudiar el τ del curso libre en OO, observando su alargamiento al evaluarlo en dos etapas sucesivas. Finalmente, al calcular la relación o ángulo de fases entre el ritmo y el ciclo T, ésta mostraba siempre un valor positivo que incrementó con la disminución de T, demostrando

que al presentar el *zeitgeber* una frecuencia más rápida su fase se adelanta a la del ritmo, y este adelanto se incrementa al disminuir T.

La estabilidad en la fase diaria del ritmo de AR fue cuantificada en cada ciclo T, mediante una media vectorial de las fases utilizando un test de Rayleigh. El módulo del vector resultante es proporcional, en algún grado, a esta inestabilidad. Esta variable reflejó con bastante precisión la inestabilidad de la fase diaria observada en los actogramas, ya que se observó un decremento en el módulo del vector en relación al decremento de T. Además se observó esta misma tendencia al calcular la varianza explicada por el ritmo de AR, y ambas variables se presentaron correlacionadas.

Ya que la AR apareció como un factor importante para producir el encarrilamiento, se estudió esta variable en cuanto a su media diaria y a su distribución durante la fase α , mediante la utilización del perfil medio del ciclo de AR calculado para cada T. La media fue calculada de este perfil medio, como la actividad total acumulada dividida por el número de bins de cada T. Esta variable presentó un decremento sostenido al disminuir el ciclo T. Para estudiar la distribución de AR en la fase α , se calculó el porcentaje de AR respecto al total en α en dos intervalos: uno comprendido desde su inicio hasta el momento del valor máximo del perfil (α_i), y otro desde el máximo hacia el final de (α_f). La distribución de AR durante la fase α presentó diferencias en relación al ciclo T: mientras que se observó un aumento del % de AR al acortar T en α_i , no se observaron cambios en α_f . Por otro lado, si bien el intervalo α_f disminuyó con el decremento de T, el intervalo α_i prácticamente no cambió. Como se observó además la reducción en la duración de α de manera proporcional a los cambios de T, estos resultados sugieren que el incremento de AR en la parte inicial de α se debe a una redistribución de la actividad.

Uno de los objetivos de este trabajo fue evaluar el posible rol de la AR espontánea en el encarrilamiento a ciclos LO. Resulta evidente que la AR contribuyó inicialmente al encarrilamiento durante T22, y que pudo haberlo hecho también durante las reducciones subsecuentes de T. Sin embargo, esto no pudo ser comprobado ya que al intentar revertir el efecto bloqueando la rueda, el encarrilamiento se mantuvo. Ya que la inducción de la AR

ocurre mayormente al presentarse la rueda como una novedad a los animales (Mrosovsky y Salmon, 1989), quizás podrían estar operando mecanismos de habituación ante la presencia continua de la rueda, disminuyendo sus efectos. Estos resultados sugieren que durante T22 algunos mecanismos de *feedback* contribuyeron a modificar el período del reloj, y que una vez se produjo el encarrilamiento durante los ciclos T siguientes, éste se mantuvo relativamente independiente de la AR. Considerando los cambios encontrados al estudiar la cantidad y distribución de la AR en la fase α , es posible que los mecanismos de *feedback* contribuyan a la fase de encarrilamiento obtenida mayoritariamente por efecto de la luz, y que esta participación dependa de niveles de actividad en ciertas fases circadianas. Estos resultados son coherentes con el hecho de que la AR desarrollada en horas iniciales de la noche subjetiva, produce el acortamiento del τ en curso libre en ratones (Edgar y col., 1991), mientras que si es realizada durante las primeras horas de la fase α , contribuye a modular el ángulo de fase con el ciclo LO (Mistlberger y Holmes, 2000). Además la existencia de una CRF a pulsos de AR sostiene que sus efectos son fase-dependientes (Mrosovsky y Salmon, 1989). De todas maneras, cabe destacar que no sólo estos efectos fueron parciales en el presente trabajo, sino que además existen datos contradictorios (Gorman y col., 2005) y no es claro aún el rol de la AR en el encarrilamiento.

Lo que sí resulta evidente, es que este paradigma permitió observar una disminución importante en el límite inferior de encarrilamiento reportado hasta ahora en el hámster, de 21.5 h en hembras (Carmichael y col., 1981) y similar en machos (Boulos y col., 2002). En estos experimentos, se expuso a los animales a cambios secuenciales relativamente rápidos de T, de 15 y 5 min/día respectivamente, hasta observar pérdida del encarrilamiento. Por otro lado, estudios con ratas mostraron que el tiempo de adaptación no es tan necesario en el límite superior, ya que éste aumenta más si se expone a los animales directamente desde T24 a T28 que si el ciclo T se cambia gradualmente (Madrid y col., 1998). Estos estudios sugieren que el encarrilamiento a ciclos T es afectado dependiendo de su historia previa y en relación al tiempo de adaptación a cada T. Esto determina una clara limitación metodológica para conocer el límite de encarrilamiento “real” del sistema, y en el mismo sentido en que resulta imposible determinar el τ o la CRF. En base a estas evidencias, el tiempo de adaptación resulta un aspecto muy importante del paradigma experimental para determinar el límite inferior de encarrilamiento a ciclos T en el hámster Sirio, y posiblemente esto ocurra también

para el superior. Esto sugiere que el rango de encarrilamiento es una propiedad dinámica del sistema circadiano, más que una estática determinada por el τ y la CRF. Posiblemente, el límite real de encarrilamiento esté determinado por la asíntota en la tasa de cambio de la velocidad angular del oscilador, $\Delta\omega/\Delta t$, cuando t tiende a infinito. De este modo, el rango de encarrilamiento estático es determinado por el cambio brusco desde T24 a T, mientras que el rango de encarrilamiento dinámico dependerá de $\Delta\omega/\Delta t$.

No sólo estos aspectos resultan importantes en el estudio del encarrilamiento. Una vez demostrado éste desde el punto de vista clásico, resulta claro al observar los actogramas de AR que el fenómeno aparenta ser más complejo. Al disminuir T, si bien el ritmo muestra una fase α localizada en la escotofase, y un período “promedio” similar a T, se observan además componentes en curso libre y una inestabilidad creciente en la fase diaria. Si bien resulta paradójico, esta tendencia al curso libre sugiere una influencia parcial del ciclo T sobre el ritmo, que sin embargo fue suficiente para controlar su fase al observarla en OO. Al no aparecer dos componentes definidos, este fenómeno no puede considerarse una “homología” de la disociación en el hámster. Sin embargo, también sugiere que el encarrilamiento del sistema no es total y que pueden existir efectos graduales de la luz sobre el sistema. La estabilidad en la fase diaria calculada con el módulo del vector de Rayleigh, resultó un buen estimador del grado de encarrilamiento del ritmo, ya que se correlacionó con la varianza explicada por el mismo la cual es muy sensible a la estabilidad de la fase. Nuevamente podemos considerar al encarrilamiento como un fenómeno gradual, que depende en este caso de la relación τ/T más que de la intensidad de la luz. El patrón temporal de AR, entonces, puede estar regulado por un sistema multioscilario cuyo grado de acoplamiento produce reorganizaciones funcionales en el sistema. En este sentido, la inestabilidad creciente en la fase diaria podría estar reflejando los cambios en la coherencia de fases interna del sistema, apareciendo más osciladores en curso libre al disminuir T. Además, este grado de encarrilamiento podría relacionarse con la robustez del ritmo, siendo ésta una medida cuantitativa del nivel de acoplamiento y de la coherencia funcional del sistema (Winfrey, 2002). Finalmente, este trabajo demuestra nuevamente la plasticidad del sistema circadiano, debido al hecho de que la sensibilidad y/o la capacidad de respuesta del mismo son afectadas por la historia previa ambiental o de encarrilamiento. De este modo, sus propiedades

funcionales serán mejor comprendidas si se lo considera más allá de un sistema de “sólo-fase”.

Se ha planteado que el sistema circadiano es multioscilar, y que tal vez en esta característica residan los cambios plásticos observados en los anteriores trabajos. Se sabe que los NSQ del hámster están formado por dos subpoblaciones de osciladores (de la Iglesia y col., 2000; Yan y col., 2005), caracterizados inicialmente como osciladores E y M por Pittendrigh y Daan (1976b) al estudiar el fenómeno de *splitting*. Además, la relación de fase determinada por el acoplamiento entre éstos, puede ser modificada por la historia previa de iluminación (Hoffman, 1971). De los trabajos de esta tesis descritos anteriormente, resulta claro que el tiempo de adaptación en ciclos T, resulta un factor determinante en el fenómeno de encarrilamiento en el hámster Sirio. Entonces, resulta evidente la siguiente pregunta: ¿cuál es la naturaleza de los efectos de la historia previa de encarrilamiento sobre el sistema circadiano? Para contestar estas preguntas, se estudió el ritmo de AM del hámster Sirio en una secuencia de ciclos T22 utilizando una secuencia de condiciones distintas de iluminación: 1) ciclos LO con luz roja tenue en la escotofase y de alto contraste: LO_{300/dim red}; 2) ciclos LO con luz tenue durante la escotofase (luz escotópica) y de contraste medio: LO_{300/0.1}; 2) ciclos LO con luz escotópica pero de bajo contraste: LO_{10/0.1}; y 3) OO. Las condiciones LO_{10/0.1} y OO fueron cada una previas a un mismo ciclo LO_{300/dim red} (LO₂ y LO₃). Además se realizaron simulaciones mediante un modelo matemático del sistema circadiano, que asume una estructura de múltiples osciladores cuyo acoplamiento es modulado por la intensidad de la luz. Estas simulaciones fueron utilizadas para predecir los resultados obtenidos con los hámsteres en los cambios LO_{300/dim red} - LO_{300/0.1}, y LO_{300/0.1} - LO_{10/0.1}, los cuales fueron realizados asumiendo que la luz disminuye el acoplamiento entre los osciladores.

La exposición inicial de los animales a LO_{300/dim red} generó distintos patrones de actividad sin mostrar encarrilamiento. 8 individuos se presentaron con un patrón de coordinación relativa homogéneo, mostrando una interacción regular del período con el ciclo T. Este grupo fue seleccionado para el resto del experimento, ya que para verificar las predicciones hechas con las simulaciones se necesitaba una respuesta lo más similar posible de los animales, y de hecho la respuesta general de los animales al resto del paradigma lo fue. La exposición siguiente a ciclos LO_{300/0.1} con luz escotópica promovió el encarrilamiento,

observándose el ajuste gradual del período del ritmo hacia T22. Este cambio se mostró de manera diferente entre los individuos, ya que en algunos se mostró con cierta rapidez, mientras que en otros se sostuvo la coordinación relativa por algunos ciclos más. En general, el inicio y el final de la fase α mostraron una respuesta diferente al ciclo LO_{300/0.1}, observándose un adelantamiento progresivo de ambas pero más rápido en el inicio (estos datos no se muestran en el capítulo correspondiente). Además, en varios individuos se presentaron fluctuaciones rápidas en el inicio de la actividad. Luego de estos cambios transitorios observados en la fase α , esta se estabilizó en general adquiriendo el ritmo una relación de fase estable con el ciclo T. Hacia el final de la etapa en LO_{300/0.1}, la fase α se alargó y el ritmo fue perdiendo amplitud, detectándose 5 de los 8 animales con períodos de 22 h significativos en el periodograma. Estos cambios pudieron observarse además en los perfiles medios del ritmo de AM en 22 h calculados cuando el período fue estable. Al inicio y en la parte media de la etapa en LO_{300/0.1} se presentó un patrón bimodal robusto, que estuvo confinado a la escotofase, mientras que la amplitud fue disminuyendo hacia el final, perdiéndose la bimodalidad y aumentando el largo de α .

Cuando los animales fueron transferidos a LO_{10/0.1} disminuyendo la intensidad de la luz en la fotofase, este patrón inestable se acrecentó (4 de 8 con período significativo). Esto también fue evidente en el perfil de actividad, el cual mostró un ritmo muy débil, con una amplitud aproximada a la media diaria y una fase α prácticamente indiscernible. La re-exposición a ciclos de alto contraste LO_{300/dim red} (LO₂) no modificó los efectos disruptivos previos, manteniéndose un ritmo de baja amplitud y gran inestabilidad (5 de 8 con período significativo). Sin embargo, a pesar de este patrón inestable se verificó el control de fase del ritmo por el ciclo T al obtenerse un agrupamiento significativo de las fases una vez observado el ritmo en OO. A pesar de la exposición de los animales en OO durante casi un mes, el ritmo se presentó aún de manera inestable (5 de 8 con período significativo) y con un τ medio de 23.4 ± 0.1 h. Los postefectos no pudieron calcularse debido a la poca varianza explicada por el ritmo en OO, obtenida con el periodograma χ^2 al dividir los datos en los dos segmentos necesarios y suficientes para el cálculo. La exposición previa a OO tuvo un efecto muy marcado sobre el ritmo cuando se lo observó en el ciclo LO₃ de alto contraste impuesto por 3^a vez en el paradigma. El ritmo de 22 h presentó una sincronización estable con el ciclo T,

mostrando una amplitud incrementada en el perfil diario con un pico marcado en el inicio de α .

Estos cambios descritos en la estabilidad del ritmo en ciclos T22, fueron cuantificados mediante la determinación del porcentaje de varianza explicado por el ritmo de 22 h, además de presentarse el cálculo para el ritmo en coordinación relativa y en OO. El valor inicial en LO₁ fue elevado, luego disminuyó durante la etapa LO_{300/0.1} llegando a valores bajos hacia el final, que se mantuvieron en LO_{10/0.1}, LO₂ y OO. Un gran incremento en la varianza se observó al imponer nuevamente la condición LO₃ luego de OO. De este modo, ha sido posible observar la presencia de tres patrones diferentes en la misma condición LO (LO₁, LO₂ y LO₃), precedidas por condiciones diferentes: 1) la transferencia directa de animales *naive* a T22 (LO₁) produjo coordinación relativa; 2) un ritmo inestable y de muy baja amplitud fue observado en LO₂ antecedida por LO_{10/0.1}; 3) un ritmo estable y de gran amplitud en LO₃ luego de OO.

Las simulaciones fueron realizadas utilizando ciclos con transiciones abruptas en el acoplamiento del sistema, con una parte de alto (H_c) y otra de bajo acoplamiento (L_c) que fueron consideradas análogas a la escotofase y a la fotofase del ciclo LO. La relación L_c/H_c fue estudiada en un amplio rango de valores hasta encontrar el rango paramétrico adecuado en el cual se observan transiciones del patrón de salida del modelo, entre encarrilamiento estable, coordinación relativa y curso libre. Utilizando los valores de H_c y L_c de este rango se simularon los cambios esperados de acuerdo al modelo: 1) al disminuir el acoplamiento en H_c desde una proporción L_c/H_c determinada (análoga a LO₁) a otra más alta (LO_{300/0.1}), el patrón cambia desde coordinación relativa a encarrilamiento; 2) al pasar desde ésta proporción a otra más alta (LO_{10/0.1}) ocurre lo inverso. Las simulaciones fueron efectivas para predecir sólo el primer cambio desde LO₁ a LO_{300/0.1}, ya que se observó que el cambio desde coordinación relativa a encarrilamiento producido en el modelo se observaba también en los animales, mientras que el segundo cambio desde LO_{300/0.1} a LO_{10/0.1} produjo inestabilidad.

Este trabajo presenta algunas evidencias sobre los efectos de la historia previa en el sistema circadiano del hámster. Además, se observó que el encarrilamiento de la AM es modulado por la intensidad lumínica, y las simulaciones permiten hipotetizar que estas

modulaciones ocurren mediante cambios en el acoplamiento entre los osciladores componentes. Las simulaciones permitieron observar transiciones entre coordinación relativa y encarrilamiento producidas por diferencias en la proporción L_c/H_c , la cual define el grado de acoplamiento desde el punto de vista del modelo. Los animales mostraron además algunas características específicas similares a las observadas en el modelo, como las fluctuaciones en la fase previas al encarrilamiento estable luego del cambio $LO_1-LO_{300/0.1}$. Estas características se presentaron con diferencias interindividuales en los animales, y de acuerdo a las diferencias en L_c/H_c , lo que permite suponer que los individuos presentan distintos grados de acoplamiento entre sí. Por esta razón, se seleccionaron los animales con un patrón similar de coordinación relativa, suponiendo que representaban la región paramétrica crítica del modelo. De manera importante, las simulaciones permitieron predecir el cambio entre coordinación relativa y encarrilamiento en los hámsteres al variar las condiciones de iluminación. Si bien no es posible demostrar completamente la existencia de encarrilamiento con estos datos, las transiciones en la fase α durante la parte inicial de $LO_{300/0.1}$ sugieren con bastante certeza la existencia de cambios activos. Varios experimentos con hámsteres muestran que el *splitting* (Gorman y col., 2003), el re-encarrilamiento a fotoperíodos cortos (Gorman y Elliott, 2004), y el encarrilamiento a ciclos T incrementados progresivamente (Gorman y col., 2005), son potenciados utilizando luz escotópica, la cual alteraría la relación de fase entre los osciladores. Con los datos disponibles, el mecanismo específico involucrado en el encarrilamiento observado en el presente trabajo no puede revelarse, aunque los cambios en el acoplamiento del sistema serían importantes. Cabe destacar que de acuerdo a su espectro la luz escotópica utilizada es muy eficiente para el sistema de detección de irradiancias del sistema circadiano (Foster, 2005).

Una disquisición bastante importante en este trabajo, surge al considerar las características asumidas por el modelo para establecer la predicción del encarrilamiento desde coordinación relativa. Esta predicción se basó en asumir que el acoplamiento entre los osciladores debería disminuir proporcionalmente con la intensidad de la luz. Esto se basa en el hecho de que en la mayoría de los roedores nocturnos, la exposición a LL promueve la arritmicidad, y que este patrón podría interpretarse como la ocurrencia de una disminución del acoplamiento. Se ha sugerido en diversas especies de roedores que la luz actuaría de este modo en el sistema circadiano (Honma y Honma, 1999; Ohta y col., 2005). El sistema

circadiano del hámster presenta mayormente alargamiento del período, *splitting*, y de manera menos frecuente arritmicidad (Pittendrigh y Daan, 1976b). De hecho estos comportamientos aparecen de manera metaestable durante la exposición a LL, e incluso en estudios con simulaciones basándose en el sistema dual E – M se ha considerado que el acoplamiento disminuye con la exposición a OO prolongada (Oda y col., 2000). En este sentido, no existen modelos correctos para representar la realidad del sistema circadiano, más que aquellos que contribuyan con la comprensión de sus bases mecánicas, y que logren predecir resultados de nuevos experimentos (Beersma, 2005), como el caso del presente modelo.

Por otro lado, la segunda de las predicciones falló y se observó un patrón inestable y de una amplitud muy reducida en $LO_{10/0.1}$. Si bien los datos disponibles no permiten establecer las bases de este cambio, al observar la progresión del sistema en $LO_{300/0.1}$ es posible sugerir que las vías de encarrilamiento puedan haberse saturado en estas condiciones (Nelson y Takahashi, 1999), produciéndose inestabilidad. De este modo, si bien la intensidad de la luz está por encima del umbral que determina la sensibilidad del sistema circadiano (Meijer y col., 1986) esta saturación podría haber conducido prácticamente a un escenario de LL para los animales. Existiendo un LO de bajo contraste, esta situación podría haber impedido también la detección visual del ambiente, información que puede interactuar con el sistema circadiano a nivel de fotorreceptores (Hattar y col., 2003). Además otros sistemas que utilizan información lumínica que median procesos de enmascaramiento, los cuales contribuyen a la expresión del ritmo manifiesto, también estarían impedidos (Mrosovsky, 1999). El ritmo durante $LO_{300/0.1}$ se presenta cambiando continuamente, y el contraste impuesto por el ciclo $LO_{10/0.1}$ no resulta suficiente para estabilizar el ritmo, el cual mantiene una dinámica parecida.

Si bien el modelo resulta útil para simular las propiedades básicas del sistema circadiano, como además del encarrilamiento, la dependencia de τ de la intensidad de la luz, y la CRF (Helfrich-Förster y Díez-Noguera, 1993; Díez-Noguera, 1994; Díez-Noguera y col., 2003), los cambios dinámicos (por ej., los postefectos en el τ) no pueden ser simulados. Esto es así porque en el modelo, el estado de un oscilador o tiende a su ciclo límite o es continuamente modificado por el estado de los otros dependiendo del acoplamiento, sin considerar posibles efectos mnésicos. Quizás es por esta razón que las simulaciones resultaron efectivas para predecir cambios en el corto término, como ocurre en el cambio inicial LO_1 -

LO_{300/0.1}. De este modo puede sugerirse la presencia de un posible componente mnésico en el sistema, ya que la respuesta del mismo es una interacción contextual entre su historia previa y las condiciones presentes. La influencia de las condiciones previas resultó clara al comparar el patrón de encarrilamiento obtenido en las tres condiciones idénticas LO_{300/dim red}, precedidas por una historia ambiental o de encarrilamiento diferente. Posiblemente, si las propiedades del sistema circadiano cambiaron de esta manera plástica, estos cambios sean debidos a rearrreglos en las interacciones de acoplamiento entre los osciladores, como podría ocurrido durante los postefectos en el τ . Se ha sugerido que estudiar la modulación de la red de interacciones de los NSQ por factores ambientales tanto tónicos como agudos, es clave para dilucidar la organización y el funcionamiento coherente del reloj (Yan y col., 2005).

Debido a que los cambios dependientes de la historia previa en el encarrilamiento sólo pueden observarse en un mismo individuo, y utilizando paradigmas largos, no es posible utilizar controles. Entonces, se agrega la posibilidad de que factores como la edad puedan también influir. Los cambios observados en el sistema circadiano en relación a la edad son bastante contradictorios. Por ejemplo, algunos trabajos muestran que el τ se acorta con el envejecimiento (Pittendrigh y Daan, 1974; Morin, 1988), pero existen evidencias que sostienen que éste no cambia (Davis y Viswanathan, 1998). Lo mismo ocurre con el encarrilamiento a ciclos T (Morin 1988 vs. Aton y col., 2004). En la mayoría de los organismos, el envejecimiento produce ritmos endocrinos y comportamentales más inestables y de menor amplitud (Turek y col., 1995), y en el hámster Sirio en particular se han reportado reducciones de la amplitud del ritmo de actividad en LO 14:10 (Labyak y col., 1998). Observando los cambios en la amplitud en el presente trabajo, los animales tuvieron 6 meses cuando mostraron una amplitud muy baja del ritmo, mientras que a los 8 meses esta aumentó y de manera muy importante. Además, los animales no presentaron cambios importantes en la edad al observarse los efectos descritos, de manera que en este paradigma puede considerarse a la edad como un factor de importancia menor. De todos modos, para descartar completamente los efectos de la edad, pueden utilizarse varios grupos en paralelo con los mismos ciclos LO en diferentes secuencias, para observar que los cambios son específicos de éstas.

Los NSQ son una estructura heterogénea y funcionalmente con múltiples salidas oscilatorias. Esto es bastante evidente al observar la pérdida de distintos ritmos circadianos de roedores en condiciones LL prolongadas (Eastman y Rechtschaffen, 1983; Depres-Brummer y col., 1995), y resulta muy probable que este estado de arritmicidad sea consecuencia del desacoplamiento entre estas salidas. Actualmente se sabe que el funcionamiento coherente de los NSQ en LL se pierde, y que este estado funcional a nivel del reloj se correlaciona con la arritmicidad comportamental (Ohta y col., 2005). Pero desde el punto de vista de la estructura de la serie-temporal, ¿qué es esencialmente la arritmicidad? Para contestar esta pregunta, se estudió la AM de ratas expuestas a LL, y de otras con lesiones en los NSQx que manifestaron arritmicidad en OO. Se comparó la estructura de frecuencias en el rango ultradiano, y el grado de correlación de las series temporales tanto en el dominio del tiempo como en el de la frecuencia, en la región de alta frecuencia.

13 de los 15 individuos expuestos a LL desarrollaron arritmicidad en la AM, con una latencia variable para este comportamiento, e incluso mostrando metaestabilidad. Por otro lado 12 de los 30 animales que fueron lesionados mostraron la pérdida permanente del ritmo de AM, aunque en algunos casos reaparecía temporal o permanentemente un componente circadiano minoritario, de fase α estrecha y muy baja amplitud, que se mostraba bastante oculto por el patrón de arritmicidad general (estos datos no se muestran en el correspondiente capítulo). Las series temporales de los individuos fueron estudiadas con el periodograma de χ^2 estimando un segmento de datos de 10 días que manifieste un espectro con contribuciones periódicas equivalentes en el rango circadiano. Los segmentos de 10 días que presentaron ausencia de ritmos dominantes fueron utilizados para el resto del análisis.

La descomposición espectral de las series temporales (desde 24 h hasta ~ 1 h) mediante un análisis de Fourier seriado mostró importantes diferencias entre ambos grupos. Observando el promedio de los espectros de potencia individuales en una matriz gráfica, se observa claramente una banda ultradiana dominante en el grupo LL, mientras que el espectro fue plano y sin frecuencias dominantes en el grupo NSQx. La banda ultradiana relevante y comparativamente diferente entre ambos grupos comprendió desde el período de 12 h hasta aproximadamente el de 3 h. Por otro lado se realizó un análisis de Fourier utilizando todos los armónicos posibles (PSD). La relación se obtuvo como el logaritmo de la potencia vs. el

logaritmo de la frecuencia (gráfico log-log). Este análisis revela que la relación entre potencia y frecuencia existente en la serie también es diferente. El grupo LL muestra un quiebro en la tendencia, con una mayor pendiente entre los armónicos de 3 h y de 1 h, mientras que en el grupo NSQx la tendencia se mantiene decreciente. Estas diferencias se verificaron al estudiar la pendiente de la relación potencia–frecuencia en los rangos comprendidos desde el armónico de 3 h, de 2 h y de 1 h hasta la frecuencia de Nyquist ($N/2=2$ min). La pendiente del grupo LL fue mayor al ser estimada desde los armónicos de 3 h y de 2 h, mientras que fue similar en la región desde el de 1 h hasta 2 min. Además se estudió la función de autocorrelación de la serie temporal utilizando pasos de 1 min., obteniendo el coeficiente de correlación en función del número de pasos y estudiando la pendiente en la zona de alto muestreo, entre el 1° paso y el 8°. La pendiente fue mucho más inclinada en el grupo NSQx.

Este estudio fue realizado para caracterizar el estado de arritmicidad en la AM de la rata. Este estado puede generarse mediante exposición prolongada a LL, mediante la lesión de los NSQ, o mediante un procedimiento que consiste en dar un pulso de luz en el momento que corresponde al punto de la singularidad de fase del sistema (Winfree, 1971). Si bien esta idea es conceptualmente muy refinada, actualmente se acepta que el estado de arritmicidad se debe mayormente a un sistema desacoplado. Aún así, cabe preguntarse cuáles son las características dinámicas de este estado, y en este sentido caben dos posibilidades: 1) que sea mayormente un proceso estocástico, 2) que presente una estructura temporal con frecuencias dominantes y algún grado de correlación, en otras palabras, que el proceso tenga pasado y futuro. Estos datos sugieren que el estado de arritmicidad no es tal en los animales LL, ya que posee ritmos ultradianos emergentes de la pérdida en la coherencia de fase entre los osciladores componentes. Por otro lado, en los animales con NSQx no aparece ninguna frecuencia dominante y este estado puede definirse verdaderamente como de arritmicidad, revelando que cualquier organización rítmica a nivel de la AM se debe a los NSQ.

El estudio de la estructura de temporal de la serie estimada tanto en el dominio de las frecuencias como en el del tiempo, también revela la posible existencia de mecanismos de regulación invariantes en el tiempo operando en el sistema desincronizado. Al estudiar medidas fractales en la región de alta frecuencia en las series temporales se obtuvieron distintos grados de correlación entre los grupos. En el grupo LL, ambas medidas revelaron un

cierto grado de correlación que fue mayor al de los animales NSQx, cuyo estado de arritmicidad fue mayormente ruido no correlacionado. En los LL, estos resultados sugieren una regulación más compleja más allá de la región ultradiana en donde un conjunto de fluctuaciones aperiódicas se muestran organizadas temporalmente, mostrando complejidad estructural. En este sentido, la autocorrelación de las series temporales fue mucho mayor en este grupo, revelando que la historia inmediata de la serie es importante para los estados futuros subsiguientes. De este modo, si el estado de arritmicidad en LL depende sólo de la actividad de los NSQ, entonces posibles mecanismos de regulación estarían actuando para compensar las interacciones, más lábiles en LL, entre los osciladores. Otra posibilidad es que esta estructura se deba a los propios mecanismos de ajustes de fase entre los osciladores. Por otro lado, en el caso de los animales lesionados, la existencia de un proceso con más aleatoriedad podría deberse al resultado de numerosas influencias débiles desde distintas regiones del sistema nervioso central. La pérdida de correlación temporal en los NSQx y su presencia en los LL sugiere que además de imponer una fase en la distribución diaria de AM, los NSQ impondrían estructura temporal más fina en la regulación de los patrones motores, incluso más allá de los propios procesos rítmicos.

Los NSQ pueden presentar distintas reorganizaciones funcionales, como se ha descrito anteriormente en los distintos estudios realizados. El enfoque de caja negra asume que estas reorganizaciones podrían reflejarse en el patrón de AM. De hecho, en general se observa que el patrón rítmico de los roedores presenta niveles de complejidad muy diversos en su estructura temporal. Para los estudios cronobiológicos, que intentan caracterizar las propiedades del reloj circadiano, estas complejidades no son consideradas en general. De hecho los métodos convencionales de detección de AM, como los dispositivos de haces infrarojos (IR) o la rueda no permiten su estudio y asumen que la AM es una variable estocástica (sobre todo el IR), de la cual sólo interesan sus características rítmicas. La AM general incluye diversos patrones comportamentales cuya caracterización rítmica puede mejorar la comprensión de la salida comportamental del reloj. El método desarrollado, basado en una plataforma de fuerza, permitió hacer registros prolongados de roedores en aislamiento, obteniendo datos comportamentales de elevada resolución temporal y espacial. Pudieron obtenerse distintas variables relacionadas con el movimiento, en sesiones de entre 3 y 5 días

de registro de animales normales en condiciones LO, OO, y de animales normales en LL y NSQx en OO.

Tanto en LO como en OO se detectaron ritmos en casi todas las distintas variables comportamentales analizadas, de las cuales en esta descripción sólo se detallarán las más relevantes. Las variables que no mostraron ritmos fueron aquellas que midieron tendencias de lateralización en el movimiento. Las variables relacionadas con la distancia total recorrida, como la distancia lateral y el área mostraron patrones rítmico semejantes, si bien sus valores medios variaron, en relación al método de cálculo. Además, el ritmo en la distancia total presentó componentes ultradianos muy definidos, mientras que éstos estuvieron prácticamente ausentes al considerar los movimientos lentos de los animales. Estas diferencias fueron detectadas mediante análisis de Fourier. Las mismas diferencias entre estos ritmos comportamentales fueron observadas en los animales en OO. Por otro lado se detectó el área seleccionada por los animales para descansar, mediante la observación del tiempo de permanencia en las distintas áreas de la arena experimental. Esta variable apareció como un ritmo claro y en antifase con el ritmo de distancia total o aquellos relacionados con el desplazamiento. Además pudieron discriminarse con cierta precisión las áreas preferidas para realizar desplazamientos. Esta descripción resulta adecuada también para los animales que estuvieron en OO.

Los animales arrítmicos mostraron patrones de AM general bastante parecidos a los observados para el desplazamiento. Esto pudo observarse si bien el registro de AM no fue simultáneo al de la plataforma debido a no disponer de un actímetro IR adecuado. El estado de arritmicidad tanto para los animales LL como para los NSQx fue evidenciado en la mayoría de las variables comportamentales del análisis. Sin embargo, se detectaron ritmos circadianos claros en algunos individuos arrítmicos. Los ritmos se presentaron en un animal NSQx, al observar el tiempo de permanencia en una región de la arena experimental. También se detectó un ritmo de permanencia en un individuo sometido a LL, y en otro de este grupo se observó un ritmo en el número de movimientos lentos.

Este trabajo describe la aplicación de una herramienta basada en una plataforma de fuerza, para estudiar diversos ritmos comportamentales de roedores con libertad de

movimientos. Se pudieron obtener diversos patrones comportamentales, proporcionando una descripción más amplia de la AM. Las series temporales de estos patrones mostraron ritmos bien definidos en ambientes favorables como LO y OO. Por un lado, el patrón de distancia total se correlacionó con el patrón de AM registrado con actímetro IR mediante cuentas acumuladas. Sin embargo, las características dinámicas del movimiento fueron rítmicamente diferentes, observándose patrones ultradianos para la distancia total pero no para los movimientos lentos. Además esto ocurrió de manera independiente al ambiente de iluminación, sugiriendo que ésta es una característica específica de la salida motora del reloj. El comportamiento de selección del área de reposo resultó claramente detectado mediante el análisis del tiempo de permanencia en las distintas áreas. Sin embargo, a pesar de su obviedad, este patrón podría ser útil para determinar con mayor precisión la transición entre actividad y reposo, ya que el dispositivo de IR sólo detectaría mayor o menor AM.

Aunque este trabajo se ha planteado desde el punto de vista metodológico, es de gran interés comentar algunos aspectos funcionales encontrados en los registros realizados. El estudio de los animales arrítmicos con este método, demuestra la existencia de ciertos ritmos comportamentales que se observaron en individuos aislados del estudio. Por un lado, se observaron ritmos en el tiempo de permanencia en un área definida de la arena, tanto en un animal NSQx como en otro LL. La presencia de este ritmo es bastante intrigante, ya que es difícil conciliar el hecho de que un animal presente una AM disgregada durante el día estando arrítmico, pero aún así muestre un ritmo en el tiempo de permanencia en un área. Existen algunas evidencias sosteniendo que los animales con NSQx mantienen ritmos relacionados al sueño (Baker y col., 2005). Ya que el actímetro de IR supone detección de desplazamiento, cuando lo que en realidad está midiendo es movimiento, podría pensarse que este ritmo se relaciona con el patrón de sueño. Sin embargo, como el desplazamiento total se presenta también arrítmico de manera similar a la AM, esto debe descartarse. En el caso del ritmo detectado en los movimientos lentos para el animal en LL, podría sugerirse la existencia de un ritmo oculto en el patrón de arritmicidad de AM, que tal vez esté relacionado con procesos dependientes del sueño. Otra de las posibles aplicaciones de este método en estudios cronobiológicos, sería su empleo para caracterizar la actividad anticipatoria a determinados *zeitgebers*, como el acceso restringido al alimento. Además se sabe que en los enfermos de Alzheimer existen alteraciones comportamentales con ritmos circadianos claros, como mayor

agitación o exacerbación de los movimientos durante la tarde (Volicer y col., 2001). Existen modelos animales de Alzheimer usados para caracterizar esta sintomatología no-cognitiva, y se han provisto descripciones comportamentales estudiando la distribución de la AM durante el día con actímetros IR convencionales (Vloeberghs y col., 2004). En este caso resulta evidente que estas descripciones serían más adecuadas mediante el uso de la plataforma de fuerza.

Resulta claro que la metodología anteriormente comentada supone un nuevo método, o mejor dicho, una nueva aplicación de un método parcialmente desarrollado en otros campos de investigación conductual. En el caso de los estudios a largo plazo característicos de la cronobiología experimental, permite obtener información hasta ahora totalmente inédita, con un gran potencial de cara al estudio de los ritmos circadianos. Esto queda claro al detectarse la presencia de fenómenos rítmicos en animales en los que los métodos convencionales no son capaces de identificarlos.

Los trabajos desarrollados en esta tesis han permitido distintas aproximaciones para contribuir al conocimiento del sistema circadiano de los roedores. En la mayoría de los trabajos, y sobre todo en los Capítulos 1, 3 y 4, asumir un sistema multioscilario acoplado como hipótesis central, resulta útil para explicar los fenómenos observados. Estos trabajos junto al presentado en el Capítulo 2, son ejemplos claros de las posibles reorganizaciones que puede asumir el sistema en condiciones ambientales críticas, como durante ciclos T alejados del τ o en condiciones aperiódicas de LL. Los patrones de AM observados, reflejan en general la plasticidad del sistema circadiano, entendida como su capacidad para mostrar distintas configuraciones funcionales a partir de una misma estructura multioscilaria. Evidentemente, la base de estos fenómenos reside en el estudio de las interacciones entre los osciladores, y la continuación de estos trabajos requerirá el desarrollo de técnicas para ello.

Para finalizar, cabe poner en discusión el posible valor adaptativo de esta plasticidad, si bien las extrapolaciones desde el laboratorio no son adecuadas y esta pregunta debería hacerse desde el punto de vista ecofisiológico de las especies y en el contexto evolutivo poblacional. Por un lado, es posible considerar que las propiedades observadas fueron estudiadas en condiciones de reducida complejidad ambiental en el laboratorio. Los grados de

libertad observados en el encarrilamiento, como su gradualidad, sus márgenes variables, o sus respuestas contextuales dependientes de su historia, podrían ser resultado de la ausencia de un entorno temporal complejo como el existente en el medio natural. Poco puede decirse desde el punto de vista ecológico considerando la respuesta a la luz, ya que los ciclos T mayormente utilizados en estos experimentos presentaron condiciones muy alejadas de las variaciones lumínicas naturales para un roedor nocturno. Por otro lado, esta plasticidad podría relacionarse con la propia complejidad del sistema, sin implicar necesariamente posibles significados adaptativo. Está claro que las hipótesis que condujeron los experimentos no fueron dirigidas desde las características ecológicas de estas especies, y apuntaron más a indagar aspectos puramente sistémicos y fisiológicos. Considerando esto, las propiedades más complejas de un sistema pueden resultar evidentes al observarlo cerca de los límites de su funcionamiento normal. Esto es conceptualmente análogo a los estudios de Ilya Prigogine utilizando reacciones químicas cuyos parámetros están alejados del equilibrio, y alcanzado un cierto umbral la trayectoria desde el equilibrio se bifurca y se hace caótica (prácticamente impredecible). Tal vez estos hallazgos sugieran que el tiempo cíclico es una cualidad compleja para los organismos en el nivel temporal biológico de la organización natural, y que este tiempo ha condicionado la multiplicidad morfológica y funcional de la vida, generándose configuraciones de tiempo-entropía que evolucionan de forma particular y específica. Nuestros ritmos evolucionan hacia el único estado de equilibrio posible en un organismo, en palabras de Julio Cortázar “...allá en el fondo del reloj está la muerte, pero no tenga miedo...”.

