

Análisis de la Propiedad de Auto-similitud en la Actividad Motora de Ratas con Ciclos de Trabajo Alterados

R.C. Salgado¹, M.O. Méndez², J. S. Murguía², N. Saderi¹, S. Cárdenas¹, B.A. Agundis^{1*}

¹Facultad de Ciencias, UASLP, San Luis Potosí, S.L.P., México

²Laboratorio Nacional CI3M, Facultad de Ciencias, UASLP, San Luis Potosí, S.L.P., México

* briandalexia@hotmail.com

Resumen— La actividad motora se caracteriza por fluctuaciones con estructura auto-similar en un amplio rango de escalas de tiempo que abarcan desde minutos hasta horas. Los patrones de actividad se alteran en animales con ablación del marcapasos circadiano maestro (núcleo supraquiasmático, SCN) y en humanos con disfunción SCN como ocurre con el envejecimiento y la demencia. La sincronización normal entre los ciclos conductuales y los ritmos circadianos generados por SCN es necesaria para la regulación de la actividad motora auto-similar. Para entender mejor el proceso de la actividad motora, estudiamos las fluctuaciones de la actividad de ratas sanas en un protocolo de trabajo de luz-obscuridad y luz constante, así como luz-obscuridad y luz constante en un grupo al cual se le inoculó un tumor cancerígeno. Encontramos que los animales con cáncer presentan cambios de actividad, lo que sugiere alteraciones en los ciclos circadianos y conductuales.

Palabras clave—Auto-similar, Luz constante, Luz-obscuridad, SCN.

I. INTRODUCCIÓN

Los resultados de una amplia variedad de sistemas fisiológicos, como la frecuencia cardíaca y la actividad motora, exhiben patrones de fluctuación complejos caracterizados por estructuras fractales o de escala con propiedades que permanecen invariables en un amplio rango de escalas de tiempo. Estos patrones parecen ser un sello distintivo de la fisiología saludable, pero se ven significativamente alterados o abolidos en sistemas degradados y menos adaptables a las perturbaciones. Por ejemplo, los patrones fractales de la actividad motora se alteran en la enfermedad de Alzheimer (EA) [1] y el grado de alteraciones esta correlacionada con la gravedad de tal enfermedad. La regulación fractal de las fluctuaciones del ritmo cardíaco se ve perturbada en pacientes con enfermedades cardiovasculares [2] y puede ayudar a predecir las tasas de supervivencia de estos pacientes [3].

El sistema circadiano orquesta ritmos de aproximadamente 24h en el comportamiento, la fisiología y su sincronización con ciclos claros / oscuros (Ligh-Dark, LD). En los mamíferos, el marcapasos circadiano se encuentra en el núcleo supraquiasmático hipotalámico (SCN). Compuesto por aproximadamente 20 000 neuronas

acopladas en una red compleja y redundante, la SCN genera oscilaciones sostenidas en sincronía con los ciclos de LD ambientales, y transmite mensajes rítmicos a los procesos neuronales y fisiológicos. Más allá de un simple marcapasos funcionando a una escala de tiempo fija de aproximadamente 24 h, estudios recientes indican que la SCN también juega un papel crucial en las funciones fisiológicas en múltiples escalas de tiempo. Esta funcionalidad de la SCN se evidencia por los patrones de actividad fractal alterados en ratas lesionadas por SCN y en humanos ancianos con EA y / o demencia acompañados por disfunción SCN. Estos hallazgos sugieren que la orquestación circadiana intacta que involucra a la SCN puede ser esencial para la regulación normal de la actividad motora auto-similar [4].

Para evaluar la auto-similitud de la actividad motora, se realizó un análisis de fluctuaciones sin tendencias (DFA, por sus siglas en inglés) para la auto-similitud en las fluctuaciones de la actividad a diferentes escalas de tiempo [5]. En comparación con los análisis de correlación tradicionales, como el análisis espectral de potencia y el análisis de Hurst, el DFA puede cuantificar con precisión la auto-similitud en datos que pueden enmascarse por la no estacionariedad de los datos o tendencias subyacentes.

El objetivo de trabajo es estudiar la propiedad de auto-similitud de la actividad motora en condiciones de luz constante para afectar los ciclos conductuales y con tumor cancerígeno que afecta la funcionalidad del SCN.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

A. ANIMALES Y PROTOCOLO

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con pesos iniciales entre 160 - 180 g, las ratas fueron alojadas de forma individual en cajas de acrílico transparente (27cm*37cm*15cm) y colocadas en racks aislados del ruido; con control de temperatura constante (23 ± 1 °C), aire circulante y libre acceso al agua y comida. Todos los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo al Comité de Bioética en Investigación y Docencia de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí con número de registro de aprobación CEID2014030 y a la Norma Mexicana para el Cuidado y Uso de Animales Experimentales (NOM-062-Z00-1999). Las ratas se dejaron 7 días en adaptación, al final de estos las ratas

que alcanzaban los pesos entre 180 y 200 g fueron asignadas de manera aleatoria a 4 protocolos diferentes LD (luz-obscuridad), LL(luz constante) y cada grupo con tumor LDT y LLT. Los animales asignados al fotoperiodo LD, el encendido de la luz fue a las 7:00 horas (ZT0) y a las 19:00 hrs (ZT12) para el momento en que se apaga la luz. Los animales asignados al fotoperiodo LL se mantuvieron en 24 horas luz. Los animales asignados a protocolos con tumor fueron inoculados por medio de la inyección de células C6.

B. ADQUISICIÓN DE DATOS

La actividad se monitoreó con láseres infrarrojos colocados en jaulas que fueron diseñadas para detectar continuamente los movimientos. Los datos se recolectaron con un sistema de procesamiento y adquisición de datos (SPAD9) y se almacenaron automáticamente cada 15 min para su posterior análisis. (Véase Fig. 1)

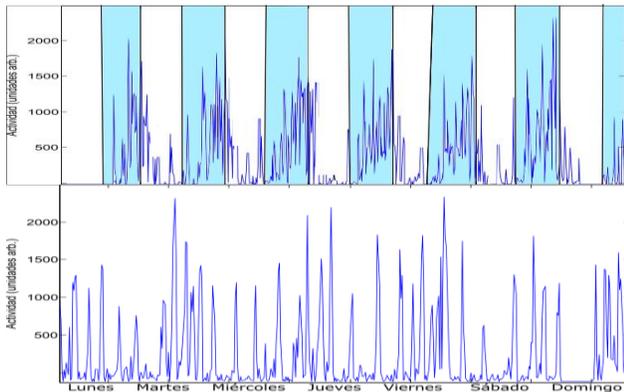


Fig. 1 Una semana de grabaciones de actividades representativas de un animal con un ciclo LD y un animal de con ciclo LL. El nivel de actividad se expresó en unidades arbitrarias (unidades arbitrarias). Las barras sombreadas indican la fase oscura de los ciclos de LD.

C. PATRONES DE ACTIVIDAD FRACTAL

El DFA cuantifica la energía promedio de fluctuación, $F(n)$, a diferentes escalas de tiempo n . Una forma de ley de potencia de $F(n)$ indica una regulación de escala múltiple en las fluctuaciones, produciendo $F(n) \sim n^a$. El parámetro a , llamado exponente de escala, cuantifica las propiedades de correlación y auto-similitud en una serie temporal de la siguiente manera: si $a = 0.5$, no hay correlación en las fluctuaciones o auto-similitud ('ruido blanco'); si $a > 0.5$, hay correlaciones positivas y auto-similitud, donde es más probable que los grandes valores de actividad vayan seguidos de grandes valores de actividad (y viceversa para valores de actividad pequeños). Particularmente, $a \approx 1$ se ha observado en muchos fenómenos fisiológicos en condiciones normales, sugiere el comportamiento más complejo en las fluctuaciones

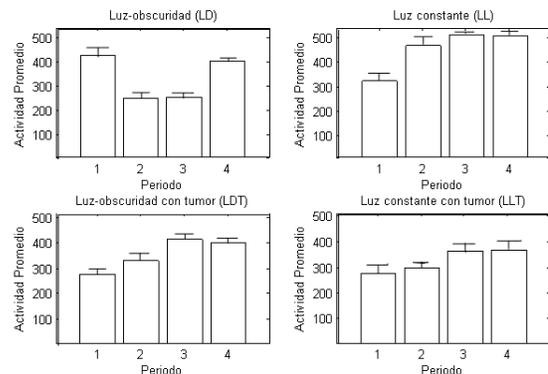
con un equilibrio fino entre aleatoriedad y regularidad excesiva [6]. Específicamente, se observó una disminución de la a (menos de 1) en las fluctuaciones de actividad a grandes escalas de tiempo en animales después de la lesión de la SCN (más de aproximadamente 4 h) [7] y en humanos con envejecimiento y en demencia (más de aproximadamente 2 h) [1]. Para minimizar el efecto de las tendencias, usamos el ajuste de polinomio de segundo orden en DFA. También seleccionamos el rango de escalas de tiempo para asegurar una estimación confiable del exponente de escalado, como evitar la región de cruce espúrea en escalas de tiempo pequeñas (es decir, la escala de tiempo más pequeña fue de 5 épocas) y analizar datos con un número suficiente de casillas (es decir, la amplitud derivada de DFA la función en cada escala de tiempo se basó en datos con al menos seis ventanas en esa escala de tiempo).

D. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) como prueba de hipótesis de que las medias de dos o más poblaciones son iguales. Los ANOVA evalúan la importancia de uno o más factores al comparar las medias de la variable de respuesta en los diferentes niveles de los factores. La hipótesis nula establece que todas las medias de la población (medias de los niveles de los factores) son iguales mientras que la hipótesis alternativa establece que al menos una es diferente. Se realizó ANOVA para evaluar las diferencias de auto-similitud entre los distintos grupos, así como las diferencias entre la actividad por periodos de las ratas.

III. RESULTADOS

Para ver el efecto de los protocolos establecidos sobre los niveles medios de actividad se pudo observar que en los animales que se sometieron al protocolo de luz constante sin importar si tienen tumor o no, se observa un aumento en la actividad a lo largo de 4 periodos conformados por 6 días (Fig. 2). Por el contrario, en los animales que están en su ciclo



durante 4 periodos de 6 días. En cada individuo, el nivel de actividad promedio se normalizó al nivel medio de los datos a lo largo del protocolo (4 periodos).

normal de luz-obscuridad se observan variaciones en la actividad a lo largo del estudio.

Con respecto a las propiedades de auto-similitud, las fluctuaciones de actividad de los animales mostraron valores de a mayores ($a = 0.8207$) en el horario de trabajo normal (ver Fig. 3). Por el contrario, el grupo que se mantuvo con luz constante mostró una disminución con $a=0.7353$. Sin embargo, en los grupos de ratas con tumores hubo una disminución aún mayor en el caso de luz constante $a=0.6442$ y nos pudimos percatar de que a pesar de tener un tumor, con el hecho de mantener el ciclo de luz-obscuridad se presentó un exponente mayor al de una rata con luz constante sin tumor con $a=0.7826$.

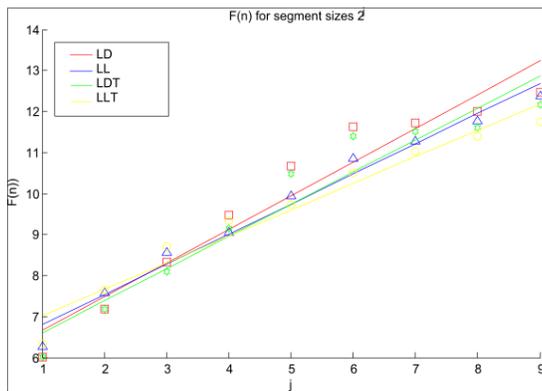


Fig. 3 Funciones de fluctuación $F(n)$ de los 4 grupos de ratas. LD es luz-obscuridad, LL es luz constante, LDT está por luz-obscuridad con tumor, y LLT es luz constante con tumor.

Asimismo, con el análisis ANOVA encontramos un aumento en el nivel de actividad promedio de los animales después de la primera semana ($p < 0.05$) con excepción del grupo LD el cual mostró una disminución en la actividad, así como valores de auto-similitud mayores de cada grupo ($p < 0.05$) debido a la distinta actividad que presentaron de acuerdo al protocolo al cual estuvieron sometidos (Fig. 4).

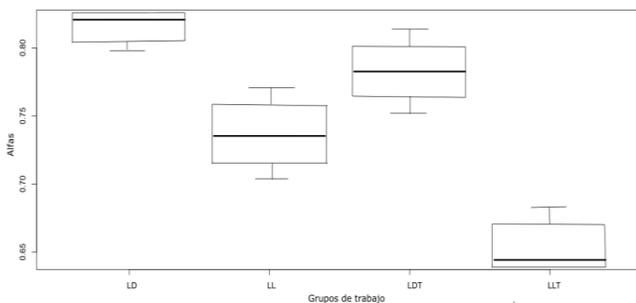


Fig. 4 Boxplot de la comparación estadística entre los exponentes de escala de los 4 grupos de trabajo.

IV. DISCUSIÓN

El mecanismo de control de la regulación de la actividad auto-similar aún no es claro. Estudios previos mostraron que se requiere una SCN intacta para mantener dicha regulación de actividad. La lesión del SCN en los animales rompe los patrones de actividad auto-similar, lo que lleva a la eliminación de las correlaciones en escalas de tiempo mayores de más de 2 h [7]. En estudios en humanos, el envejecimiento y la demencia interrumpen las fluctuaciones de la actividad de una manera similar a la lesión SCN [1]. El grado de disrupción, como se caracteriza por la diferencia entre las correlaciones a escalas de tiempo pequeñas y grandes, es altamente correlacionado con las placas amiloides en el cerebro (un biomarcador de EA) y puede predecir mejor los cambios de dos importantes neurotransmisores circadianos (vasopresinergic y neuronas neurotensinergic) en el SCN que las medidas circadianas tradicionales (por ejemplo, amplitud circadiano y variabilidad diaria de las actividades motoras).

Por otra parte, se pudo observar que en el grupo de ratas con tumor que se mantuvieron en luz constante les creció notablemente a diferencia de las ratas que mantenían su ciclo de luz y oscuridad las cuales llegaron a presentar una reabsorción del tumor, esto debido a que se mantuvieron sus sistemas y ciclos corporales en normalidad y el tumor era externo, no por enfermedad propia del animal, por esto no afecto a las ratas más que en el tiempo de reabsorción.

Cabe mencionar que en nuestro modelo de trabajo se tomaron datos cada 15 minutos lo cual puede que afecte a la resolución de nuestros resultados, por lo que se busca en un futuro la obtención de datos cada minuto para comprobar si afecta o no los resultados obtenidos.

V. CONCLUSIÓN

Nuestros resultados mostraron que la luz constante alteró la regulación de la actividad en múltiples escalas de tiempo; de igual forma se muestran cambios en el comportamiento de las ratas que presentaban un tumor; sin embargo, en las ratas LDT se presentó una clara mejoría en el tumor a diferencia de las LLT solo por mantener su ciclo circadiano normal. Por lo tanto, la sincronización entre los ciclos de comportamiento y los ritmos circadianos impartidos por SCN es crucial para la función normal de la red de control de la actividad.

También cabe mencionar que se presentaron características de mayor auto-similitud en las ratas que mantenían un protocolo de luz-obscuridad viéndose notablemente disminuido en los casos de LL y aún más en LLT, ya que la luz constante altero notablemente a las ratas,

en las LLT se presentó una mayor lesión del SCN debido al daño por el tumor y la afección a los ciclos normales de comportamiento.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue parcialmente apoyado por el fondo FOSEC SEP – Investigación Básica A1-S-45611.

REFERENCIAS

- [1] Hu K, Van Someren EJ, Shea SA, Scheer FA. 2009 Reduction of scale invariance of activity fluctuations with aging and Alzheimer's disease: involvement of the circadian pacemaker. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 106, 2490–2494. (doi:10.1073/pnas.0806087106)
- [2] Peng CK, Havlin S, Hausdorff JM, Mietus JE, Stanley HE, Goldberger AL. 1995 Fractal mechanisms and heart rate dynamics. Long-range correlations and their breakdown with disease. *J. Electrocardiol.* 28, 59–65.
- [3] Huikuri HV, Makikallio TH, Peng CK, Goldberger AL, Hintze U, Moller M. 2000 Fractal correlation properties of R–R interval dynamics and mortality in patients with depressed left ventricular function after an acute myocardial infarction. *Circulation* 101, 47–53. (doi:10.1161/01.CIR.101.1.47)
- [4] Hu K, Meijer JH, Shea SA, vanderLeest HT, Pittman-Polletta B, Houben T, Oosterhout F, Scheer FAJL. 2012 Fractal patterns of neural activity exist within the suprachiasmatic nucleus and require extrinsic network interactions. *PLoS ONE* 7, e48927. (doi:10.1371/journal.pone.0048927)
- [5] Peng CK, Buldyrev SV, Havlin S, Simons M, Stanley HE, Goldberger AL. 1994 Mosaic organization of DNA nucleotides. *Phys. Rev. E. Stat. Phys. Plasmas Fluids Relat. Interdiscip. Topics* 49, 1685–1689. (doi:10.1103/PhysRevE.49.1685)
- [6] Pittman-Polletta BR, Scheer FA, Butler MP, Shea SA, Hu K. 2013 The role of the circadian system in fractal neurophysiological control. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 88, 873–894. (doi:10.1111/brv.12032)
- [7] Hu K, Scheer FA, Ivanov P, Buijs RM, Shea SA. 2007 The suprachiasmatic nucleus functions beyond circadian rhythm generation. *Neuroscience* 149, 508–517. (doi:10.1016/j.neuroscience.2007.03.058)