



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

**“INFLUENCIA DE HORARIOS RESTRINGIDOS DE  
ALIMENTO EN UN MODELO ANIMAL DE TRABAJO  
NOCTURNO”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA EL M en C.

**ROBERTO CARLOS SALGADO DELGADO**

**TUTORA. DRA. CAROLINA ESCOBAR BRIONES.**





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.

**ESTA TESIS FUE REALIZADA EN EL LABORATORIO DE RITMOS BIOLÓGICOS Y METABOLISMO DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNAM, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. CAROLINA ESCOBAR BRIONES Y FINANCIADA POR CONACYT M-43950, DGAPA IN-203907 y Serviere Monde, France AGRADESCO LA BECA OTORGADA PARA LA REALIZACIÓN DE ESTE PROYECTO.**

## *A mi familia*

*A mi padre:* gracias por tu cariño, tus consejos, tus enseñanzas, tu apoyo, pero sobre todo, gracias por haber existido para ser mi padre. Te quiero mucho.

*A mi madre:* por toda esa fuerza y valentía que siempre te ha caracterizado, por ser quien todos los días sin importar que suceda a tu alrededor sacas adelante a la familia, porque sin tu apoyo nunca hubiera podido llegar hasta donde estoy; gracias mamá. Te quiero mucho.

*A mis queridos hermanos:* Fol, Marco y Nancy, por todas esas risas, regaños, peleas y por ser parte importante en mi vida. Los quiero mucho.

*A mi querido abuelito;* porque me contagia su fortaleza que me ayudo a seguir adelante

*A Nadia:* Porque llegaste en el momento mas deseado de mi vida.

A todos los que de una u otra forma contribuyeron para la elaboración de esta tesis

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi maestra; la Dra. Carolina Escobar Briones, por brindarme la oportunidad de iniciar en este maravilloso mundo de las neurociencias, por su amistad, su confianza y todo su apoyo siempre entusiasta e incondicional en la realización de este trabajo, además por todos los consejos académicos y personales que me ayudaron a crecer como persona.

Al Dr Ruud M. Buijs; por todos los comentarios y criticas que siempre aportaron grandes ideas, pero sobre todo por su valiosa amistad. Muchas gracias.

Al Dr. Manuel Ángeles Castellanos; por sus comentarios y apoyo para la realización de este trabajo, pero sobre todo por su amistad y por lo tragos que nos dieron grandes ideas. Gracias camarada.

A mi comité tutorial por todo el tiempo dedicado a esta tesis y sus valiosos comentarios y sugerencias que enriquecieron este trabajo.

Dr. Leon Cintra McGlone  
Dr. Jose Ramon Eguibar Cuenca

A mi jurado de examen de grado; por su tiempo para revisar este trabajo y por sus excelentes comentarios y sugerencias que me ayudaron a mejorar esta tesis.

Dra. María Sitges Berrondo  
Dra. Beatriz Fuentes Pardo  
Dra. Margarita Martínez Gómez  
Dr. Mauricio Díaz Muñoz  
Dra. Carolina Escobar Briones.

A mis compañeros de laboratorio; Maricarmen, Katia, Juanga, Susanita y Araceli, por hacer mas divertido todo el tiempo durante las horas de trabajo, por escuchar mis quejas y alentarme en los momentos mas dificiles. A todos muchas gracias.

A la UNAM, por permitirme ser parte de ella y a la Facultad de Medicina por todos los recursos que puso a ami alcance en esta etapa de mi desarrollo.

Esta tesis se realizó gracias al apoyo de los proyectos CONACYT M-43950 y 82462 PAPIIT-UNAM IN-203907 y Serviere Monde, France. Además del apoyo de las becas del programa de doctorado en ciencias biomédicas CONACYT y fundación TELMEX.

**“Quien no haya experimentado la irresistible atracción  
de la ciencia, no podrá comprender su tiranía.”  
Mary Shelley.**

## INDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>4</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>7</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>9</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUCCION</b>	<b>12</b>
<b>LOS RITMOS BIOLÓGICOS: UN POCO DE HISTORIA</b>	<b>12</b>
<b>¿QUÉ ES UN RITMO BIOLÓGICO?</b>	<b>14</b>
<b>¿CÓMO SE ESTUDIAN LOS RITMOS?</b>	<b>16</b>
<b>RITMOS CIRCADIANOS</b>	<b>17</b>
<b>EL NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO: RELOJ CIRCADIANO MAESTRO</b>	<b>19</b>
<b>ORGANIZACIÓN MOLECULAR DEL RELOJ CIRCADIANO</b>	<b>21</b>
<b>LA SINCRONIZACIÓN</b>	<b>23</b>
<b>SINCRONIZACIÓN FÓTICA Y NO FÓTICA.</b>	<b>25</b>
<b>ORDEN TEMPORAL INTERNO</b>	<b>28</b>
<b>LA IMPORTANCIA DE ESTAR SINCRONIZADO</b>	<b>30</b>
<b>PROBLEMAS DE SALUD ASOCIADOS A LA DESINCRONIZACIÓN.</b>	
<b>DESINCRONIZACIÓN POR VIAJES AÉREOS</b>	
<b>TRANSMERIDIONALES (JET LAG).</b>	<b>30</b>
<b>LA DESINCRONIZACIÓN EN TRABAJADORES</b>	
<b>EN TURNOS Y NOCTURNOS.</b>	<b>32</b>
<b>DESARROLLO DE MODELOS ANIMALES PARA ESTUDIAR LA</b>	
<b>FISIOLOGÍA DE LA DESINCRONIZACIÓN.</b>	
<b>35</b>	
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>36</b>
<b>OBJETIVOS GENERALES</b>	<b>37</b>
<b>HIPÓTESIS GENERALES</b>	<b>37</b>
<b>ETAPA 1</b>	
<b>CARACTERIZACIÓN DEL MODELO DE TRABAJO NOCTURNO</b>	<b>38</b>
• <b>OBJETIVOS</b>	<b>38</b>
• <b>HIPÓTESIS</b>	<b>38</b>
• <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>38</b>
• <b>RESULTADOS</b>	<b>45</b>
• <b>DISCUSIÓN</b>	<b>52</b>

<b>ETAPA 2.</b>	
<b>ANÁLISIS INMUNOCITOQUÍMICO DE NÚCLEOS HIPOTALÁMICOS IMPLICADOS EN EL METABOLISMO Y LA VIGILIA, EN ANIMALES SOMETIDOS A TRABAJO DURANTE SU FASE DE DESCANSO.</b>	<b>56</b>
• <b>OBJETIVOS</b>	<b>56</b>
• <b>HIPÓTESIS</b>	<b>56</b>
• <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>56</b>
• <b>RESULTADOS</b>	<b>59</b>
• <b>DISCUSIÓN</b>	<b>65</b>
<b>ETAPA 3.</b>	
<b>EL ALIMENTO EN LA ETAPA DE DESCANSO, COMO POSIBLE CAUSA DE LA DESINCRONIZACIÓN INTERNA.</b>	<b>69</b>
• <b>OBJETIVOS</b>	<b>69</b>
• <b>HIPÓTESIS</b>	<b>69</b>
• <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>69</b>
• <b>RESULTADOS</b>	<b>72</b>
• <b>DISCUSIÓN</b>	<b>85</b>
<b>DISCUSIÓN GENERAL</b>	<b>90</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>93</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>104</b>

## RESUMEN

Todos los organismos presentan fluctuaciones diarias conductuales y fisiológicas asociadas a la alternancia luz-oscuridad y reguladas por un sistema circadiano multi-oscilatorio. El núcleo supraquiasmático (NSQ) es el oscilador principal dentro de este sistema, cuya función es dar un orden temporal y mantener acoplados a los osciladores periféricos. Estas oscilaciones circadianas son controladas por "genes de reloj" tales como el gen Período (Per). En individuos que laboran en horarios nocturnos, rotatorios se observan alteraciones en los ritmos circadianos, generadas por un desacoplamiento de osciladores con el NSQ, conocido como desincronización interna, que predispone al organismo a una serie de enfermedades.

En este trabajo se caracterizaron en un modelo de horarios nocturnos de trabajo en ratas, los mecanismos involucrados en la desincronización interna. Para ello, las ratas se colocaron en un sistema de registro conductual por 15 días como línea base, posteriormente se colocaron en ruedas de actividad forzada, obligándolas a mantenerse despiertas y moverse (trabajar) en su fase de reposo durante 8 horas diarias de lunes a viernes por 4 semanas. Después de cada sesión de trabajo forzado se regresaron a sus cajas habitación en el sistema de registro. Los resultados del análisis conductual de actividad locomotora, consumo de alimento y agua muestran que las ratas sometidas a horarios nocturnos de trabajo tienen un decremento de la actividad nocturna al comparar los días basales con los días de trabajo forzado. Además las ratas muestran una actividad arrítmica durante los fines de semana. El registro del consumo de alimento, mostró cambios en sus hábitos alimenticios; alimentándose ahora en el día (mientras trabajan). Por otro lado los resultados muestran una pérdida del ritmo de glucosa plasmática y los triacilglicéridos se mostraron en antifase con respecto a las ratas control con el pico asociado a las horas de alimentación durante el trabajo. En contraste los niveles de corticosterona no se modificaron. Con respecto a los genes reloj, el ritmo de expresión de Per1 y Per 2 en el NSQ no se modificó.

Para determinar el origen de la desincronización observada en los ritmos metabólicos y conductuales, analizamos si algunos de los núcleos hipotálamicos implicados en el metabolismo, como el núcleo dorsomedial hipotalámico (DMH), paraventricular del hipotálamo (PVN), El núcleo arqueado (ARQ), paraventricular del tálamo (PVT) y en mantener la vigilia como el núcleo hipotalámico lateral (HL) y área perifornical (PeF) están alterados por la actividad forzada durante la fase de descanso, promoviendo la desincronización interna desde un nivel central. Para esto, caracterizamos los ritmos diurnos de la inmunoreactividad de c-Fos como marcador de actividad neuronal y de la proteína PER1 como marcador de ritmicidad. Observando un cambio de fase en la actividad y en el ritmo de la mayoría de los núcleos hipotalámicos estudiados, asociados ahora a la actividad durante la etapa de descanso.

Para demostrar el efecto del nuevo horario de alimentación sobre la modificación de los ritmos metabólicos y conductuales formamos grupos de trabajadores con restricción al acceso de comida; uno ad libitum (T-AL), otro sólo de día (T-CD) y sólo de noche (T-CN). Para descartar la influencia de la actividad apareada al alimento se registraron otros tres grupos sin trabajar, uno que come ad libitum (C-AL), otro que come sólo de día (C-CD) y otro en su fase de oscuridad (C-CN). De los grupos forzados a trabajar, las ratas T-AL y T-CD mostraron un decremento de actividad nocturna y una actividad arrítmica durante los fines de semana, similar al reportado previamente para el

trabajador nocturno, además el ritmo de temperatura y algunas variables metabólicas mostraron cambios de fase hacia la fase de luz, mientras se alimentan. Por el contrario, las ratas T-CN no presentaron alteraciones en sus ritmos metabólicos ni conductuales y mostraron patrones rítmicos similares a las ratas control. En los grupos que no trabajaron y que se manipuló la hora de comida C-AL, y C-CN no se observaron alteraciones metabólicas y conductuales, sin embargo las ratas C-CD no mostraron alteraciones conductuales pero sí una antifase en el ritmo de TAG, similar a las T-CD y T-AL. Lo que apoya nuestra hipótesis de que el alimento durante el trabajo nocturno puede ser la causa de la desincronización interna y que la regulación de los horarios de alimentación puede ser una buena estrategia para normalizar la desincronización causada por el trabajo nocturno.

## ABSTRACT

All the organism present behavioural and physiological daily rhythms associates to the alternation light-darkness and regular by a multi-oscillatory circadian system. The suprachiasmatic nucleus (SCN) is the main oscillator inside this system, whose function is to give a temporary order and to maintain adapted to the peripheral oscillators. These circadian oscillations are controlled for “clock genes” such as gene Period (Per). In people that work in nocturnal o rotating schedules, are observed alterations in the circadian rhythms, generated by a uncoupling of oscillators with the SCN, known like internal desynchronization, that predispose to the organism to a series of illnesses.

In this work were characterized in a model of night work in rats, the mechanisms involved in the internal desynchronization. For it, the rats were required to be active in a rotating wheel for 8 h daily during their sleeping phase. After 8 h in the drums rats were returned to their home cages and remained undisturbed until next day. This procedure was carried out for 4–5 weeks from Monday to Friday. The results of the locomotor activity, food and water ingestion showed that the rats submitted to night work have a decrement of nocturnal activity in comparison with the control and your base line. Besides the rats show arrhythmicity during the weekends.

On the other hand, the forced activity during the sleeping phase (W-SP) alters not only activity, but also the temporal pattern of food intake. In consequence W-SP rats showed a loss of glucose rhythmicity and a reversed rhythm of triacylglycerols, associated peak to the hours of diet during the work. In contrast the rhythm of corticosterone was not modified. But exhibited showed increase of plasma corticosterone associated with the start of the working session. With regard to the clock genes, the rhythm of expression of Per1 and Per 2 in the SCN was not modified.

To determine the origin of the internal desynchronization observed in the metabolic and behavioural rhythms, we analyze in hypothalamic nuclei implied in the metabolism, like the dorsomedial nucleus (DMH), paraventricular nucleus (PVN), arcuate nucleus (ARQ), paraventricular nucleus of thalamus (PVT) and in maintain the wakefulness as the lateral hypothalamic nucleus (HL) and perifornical area (PeF) they are altered by the forced activity during the rest phase, promoting the internal desynchronization a central level. For this, we characterize the diurnal rhythms of the immunoreactivity of c-Fos as scoreboard of activity neuronal and of the PER1 protein like scoreboard of rhythmicity. A change of phase was observed in the c-Fos expression and the rhythm of PER 1 in the majority of the hypothalamic nuclei, associates now to the activity during the rest phase.

To show the effect of the new schedule of diet in the modification of the behavioural and metabolic rhythms, we form groups of workers with restriction to food; one ad libitum (T-AL), another food only during the day (T-CD) and only at night (T-CN). To rule out the influence of the activity coupled to the food other three groups were registered without work, one with food ad libitum (C-AL), another with food only during the day (C-CD) and another in the night (C-CN). Of the groups forced to work, the T-AL and T-CD showed a diminution of nocturnal activity and arrhythmicity during the weekends, similar to reporting previously for the nocturnal worker, besides the rhythm of temperature and some metabolic variables showed phase changes toward the light phase, while they are fed. On the contrary, the rats T-CN did not present alterations in their behavioural and metabolic rhythms and they showed similar

rhythmic to the control rats. In the groups that did not work and the hour of food was manipulated C-AL, and C-CN not metabolic and behavioural alterations were observed, nevertheless the rats C-CD did not show behavioural alterations but yes an antiphase in the TAG rhythm, similar to the T-CD and T-AL. What supports our hypothesis that the food during the nocturnal work may be is the cause of the internal desynchronization and the regulation of the food schedules may be a good strategy to normalize the desynchronization caused by the nightwork.

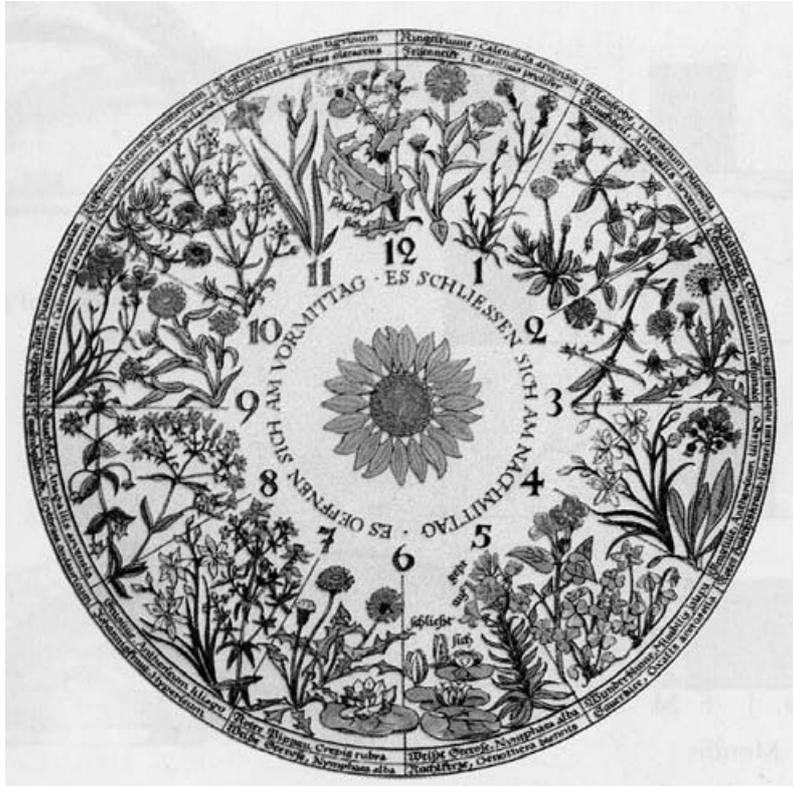
## INTRODUCCIÓN

### LOS RITMOS BIOLÓGICOS: UN POCO DE HISTORIA

Los médicos y filósofos de la Grecia antigua ya observaban cambios regulares en las funciones del organismo, fenómeno que ahora conocemos como “ritmos biológicos”. Hipócrates aconsejaba a los interesados en la medicina “investigar las estaciones del año y lo que ocurre en ellas”. Como consejo práctico, sugería “administrar las purgas de arriba hacia abajo en el verano y de abajo hacia arriba en el invierno”. Unos cuantos siglos más tarde, la expedición de Alejandro Magno llevó consigo numerosas plantas y animales exóticos y Andróstenes, uno de los cronistas de la expedición, relató que las hojas y pétalos de la planta del tamarindo se movían a lo largo del día, como “saludando al sol”. Es curioso que la historia de las observaciones de los ritmos biológicos se inició en plantas. El naturalista Karl Linné fue el creador del sistema de taxonomía de plantas publicado en 1735, y realizó una de las primeras aplicaciones prácticas de los ritmos biológicos, basándose en la regularidad de la apertura y cierre de los pétalos de diversas flores y en 1745 creó un mapa de flores para un reloj de jardín. Cada especie de flor seleccionada se abría o cerraba a una hora determinada, desde las seis de la mañana hasta las seis de la tarde, de manera que al comprobar qué especie floral tenía los pétalos abiertos o cerrados se podía saber la hora (Fig.1). (Golombeck D, 2007).

El primer experimento cronobiológico conocido fue en 1729 por el astrónomo francés Jacques d’Ortous DeMairan, el notó que una planta sensitiva de su jardín (*Mimosa pudica*) abría sus hojas durante el día y las cerraba durante la noche. Encerró la planta en un armario oscuro y para su sorpresa la planta continuó abriendo y cerrando sus hojas con el mismo ciclo que mostraba en su exterior. (Fig.2). Por primera vez se demostró que los ritmos circadianos eran capaces de mantenerse aun en ausencia de señales temporales del ambiente. (Gruart A. 2001)

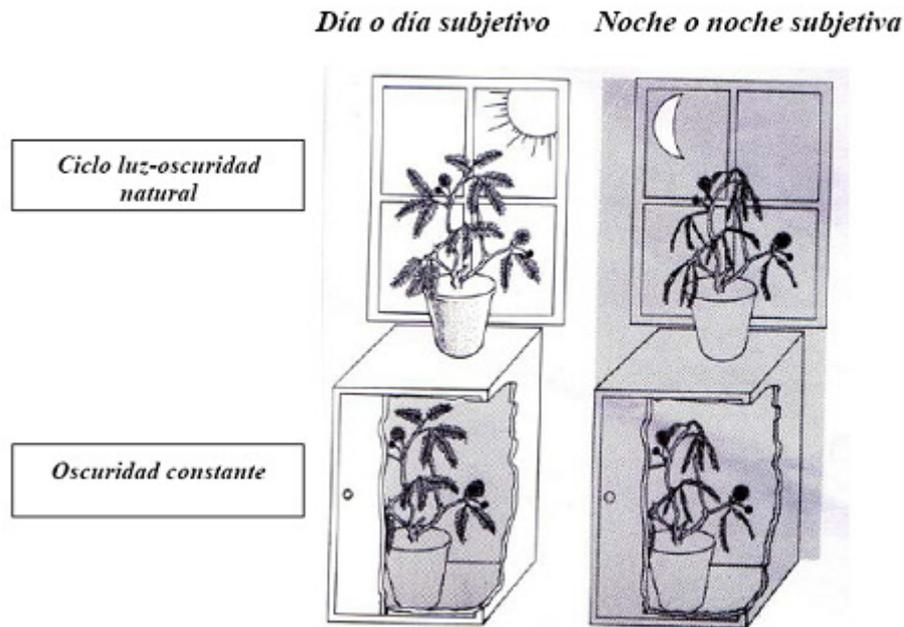
Poco a poco hemos entendido que los cambios cíclicos del ambiente influyen sobre nuestra fisiología. Las observaciones de los ritmos biológicos se han extendido de las plantas a los animales y al ser humano, de tal manera que en el conocimiento de la medicina tradicional se incorporó la aplicación de algunas hierbas por la noche y no en el día, en luna llena pero no otras noches (Gruart A 2002 y Golombeck D. 2001 ).



**Figura.1. El reloj floral de Linneo.** Con este reloj se puede saber la hora (entre las 6 AM y las 6 PM) de acuerdo a qué flores están abiertas o cerradas en el campo.

La cronobiología es la disciplina que estudia los ritmos biológicos y se ha desarrollado desde hace ya más de 2 siglos. En un principio se pensó que las variaciones cíclicas de los organismos dependían solamente de los cambios cíclicos del medio ambiente. Es decir, eran una simple respuesta y por lo tanto, se pensaba que los ritmos tenían únicamente un origen exógeno.

Sin embargo, desde el siglo XVIII De Marian, demostró que los cambios o variaciones rítmicas de algunas plantas y flores se mantenían aún en ambientes de oscuridad continua, es decir sin señales externas que indiquen el paso del tiempo (Fig.2). Con estas observaciones se propuso que los ritmos biológicos no dependen sólo de señales externas, sino que tienen un origen endógeno y que pueden responder a señales ambientales (Pittendrigh. 1981).



**Figura 2. El experimento de DeMairan, que demostró por primera vez la existencia de ritmos circadianos endógenos.** Al tener una planta de *Mimosa pudica* expuesta a un ciclo de luz y oscuridad, las hojas se mueven siguiendo al sol. Sin embargo al eliminar la influencia de la luz solar colocando la planta en oscuridad constante, las hojas continúan moviéndose. (Modificado de Moore Ede y col.. 1972).

A principios de 1900 se desarrolló el concepto de memoria temporal. Se pensaba que los organismos poseían un mecanismo para generar cierta organización temporal en sus procesos. Posteriormente, Aschoff (1965) con base en resultados de sus experimentos eliminaron la idea de una memoria temporal demostrando la capacidad endógena que los organismos tienen para medir el tiempo, y por lo tanto la necesidad de un sistema de medición temporal, “el reloj biológico”.

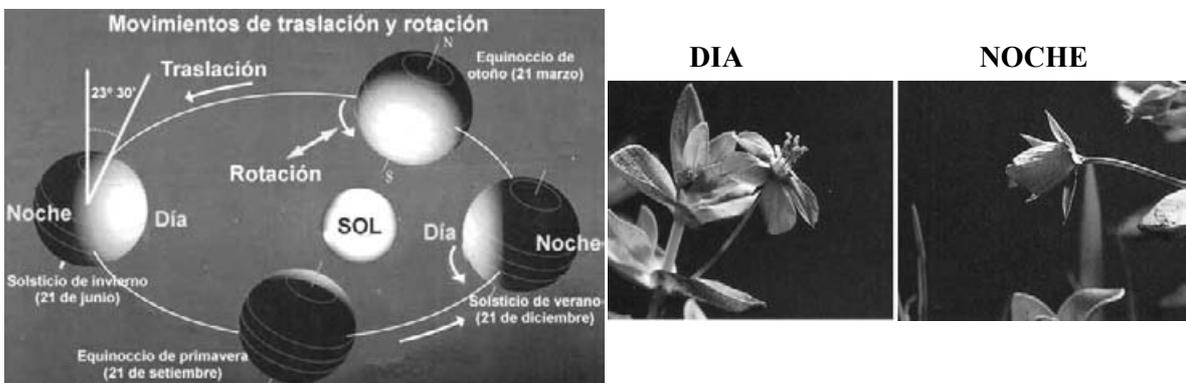
### ¿QUE ES UN RITMO BIOLÓGICO?

Existe una gran cantidad de estímulos en el medio ambiente que pueden afectar al organismo. Entre ellos, el ciclo luz-oscuridad (la alternancia día-noche), el cual está determinado por el movimiento de rotación de la Tierra (Fig.3) y genera oscilaciones diarias de temperatura, de presión atmosférica, y de humedad. En consecuencia la organización temporal es una característica fundamental adaptativa de los organismos

(Pittendrigh, 1993), que se manifiesta a través de cambios cíclicos en los eventos fisiológicos y conductuales

Jürgen Aschoff (1981) define un ritmo biológico como la recurrencia de un fenómeno biológico en intervalos regulares de tiempo. Los ritmos biológicos tienen un carácter hereditario, es decir, su expresión está genéticamente determinada (Gruart A. y col. 2002). Todos los animales, las plantas, y probablemente todos los organismos muestran variaciones rítmicas en su fisiología (tasa metabólica, producción de calor, floración, etc ) que suelen asociarse con los ciclos ambientales (Fig.3).

Los ritmos biológicos capacitan a los organismos para estimar el paso del tiempo, para anticiparse y prepararse a demandas que surgen de los cambios ambientales cíclicos relevantes para su supervivencia. De esta manera permiten mostrar niveles máximos de una variable fisiológica cuando las condiciones en el medio ambiente requieren una respuesta aumentada. En todos los taxa de los organismos eucariontes así como algunos procariontes y hongos se han documentado diferentes ritmos biológicos con períodos que van desde fracciones de segundo hasta años. Los organismos unicelulares también exhiben ritmos en la velocidad de fotosíntesis, metabolismo oxidativo, fototaxis, por mencionar algunos (Dunlap J. y col. 2004).



**Figura 3. En A. Representación esquemática del movimiento de rotación y traslación de la tierra;** evento que genera los cambios diarios del día/noche y las estaciones del año respectivamente. En B. Ejemplo de un cambio conformacional de una planta, relacionado con el estímulo fotico que recibe en el día. Este cambio le ayuda a la planta por ejemplo a aprovechar la luz solar del día o a protegerse del frío nocturno.

En 1981 se clasificó a los ritmos biológicos en tres grupos de acuerdo con la frecuencia de su oscilación. Los ritmos ultradianos, son ritmos de alta frecuencia y se presentan más de una vez en un día, los ritmos circadianos, que tienen una frecuencia cercana a las 24 horas y los ritmos infradianos que son de baja frecuencia, es decir se presentan

menos de una vez en 24 hrs (Gruart A. y col. 2002). Algunos ejemplos de ritmos clasificados con este criterio se ven en la Tabla 1.

Los ritmos biológicos más estudiados y más frecuentes en los organismos vivos son los ritmos circadianos, que se ajustan a las variaciones cíclicas del día y la noche.

**TABLA 1.** Periodo de los ritmos biológicos clasificados de acuerdo a su frecuencia.

<i>Tipo de ritmo</i>	<i>Período</i>	<i>Ejemplo</i>
Ultradiano	0.1 seg	Electroencefalograma
	1 seg	Ritmo cardíaco
	6 seg	Ritmo respiratorio
	60 min	Secreciones hormonales
	90 min	Alternancia de estados de sueño
Circadiano	24 h	Actividad- reposo Temperatura corporal
Infradiano	28 días	Ciclo menstrual
	365 días	Hibernación

#### ¿COMO SE ESTUDIAN LOS RITMOS?

Para evaluar los ritmos biológicos, se consideran una serie de variables como el periodo, la frecuencia, la amplitud, el mesor, la fase y la relación o ángulos de fase (Fig.4).

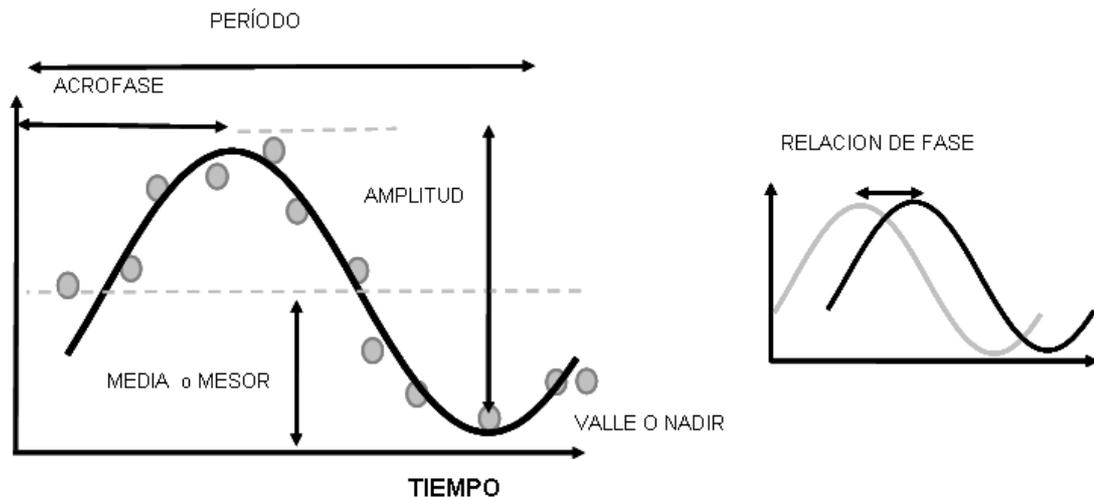
- **El periodo** de un ritmo biológico se refiere al tiempo necesario para que se repita un mismo fenómeno y es generado por el reloj biológico.
- **La frecuencia** es el número de ciclos con el mismo periodo que se repiten en una unidad de tiempo.
- **La amplitud** se define como la diferencia que existe entre el valor máximo y el valor mínimo de un parámetro fluctuante.

**El mesor** es el promedio de todos los valores observados de un ciclo en estudio, esto es importante en la normalización de los datos convirtiéndolos en porcentaje de variación en relación con el valor promedio.

- La **fase** se refiere al momento (hora, día o mes) en que ocurre un hecho característico dentro del ciclo, es un punto en el periodo del ritmo o el valor del

fenómeno en cada instante del ciclo. Al evento característico seleccionado para estimar la fase le llamamos *marcador de fase*.

- **La acrofase:** indica para un ritmo circadiano, el momento del día en el que la variable presenta su valor máximo.
- **Relación o ángulo de fase** se refiere a la comparación de dos ritmos distintos, biológicos o uno biológico y uno ambiental.
- 

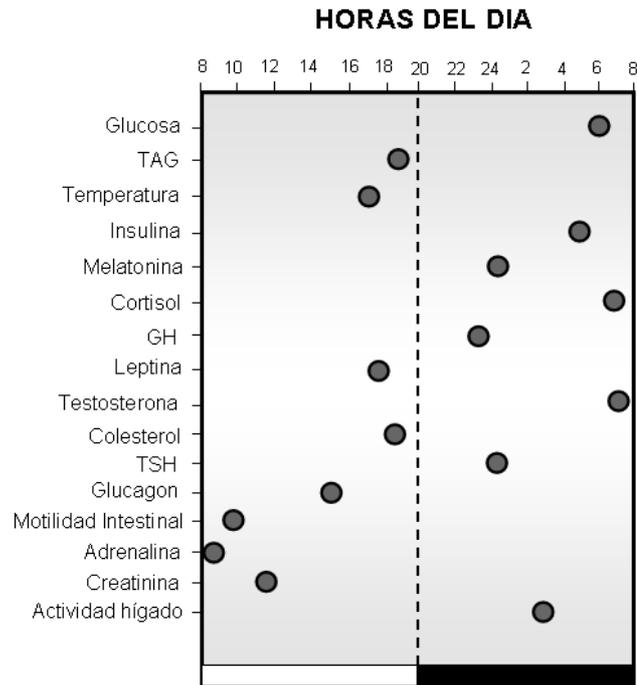


**Figura 4. Representación grafica de los parámetros característicos de un ritmo.** A la izquierda, se utiliza el ajuste de una serie temporal a una función sinusoidal (cosinor). A la derecha se representa la comparación de dos ritmos distintos por sus acrofasas.

## RITMOS CIRCADIANOS

A pesar de que existen una serie de fluctuaciones ambientales con diferentes periodicidades, es evidente que los cambios geofísicos que suceden cada 24 hrs. asociados a la alternancia de día-noche tienen gran influencia sobre los procesos biológicos (Moore-Ede y col. 1982).

Los ritmos circadianos tanto conductuales como fisiológicos, aunque son influenciados por el ambiente, se manifiestan de manera endógena gracias a la existencia de sistemas internos de medición temporal o relojes biológicos. Estos tienen la característica fundamental de generar oscilaciones cercanas a 24 hrs. (circa=cercano; diano=día).



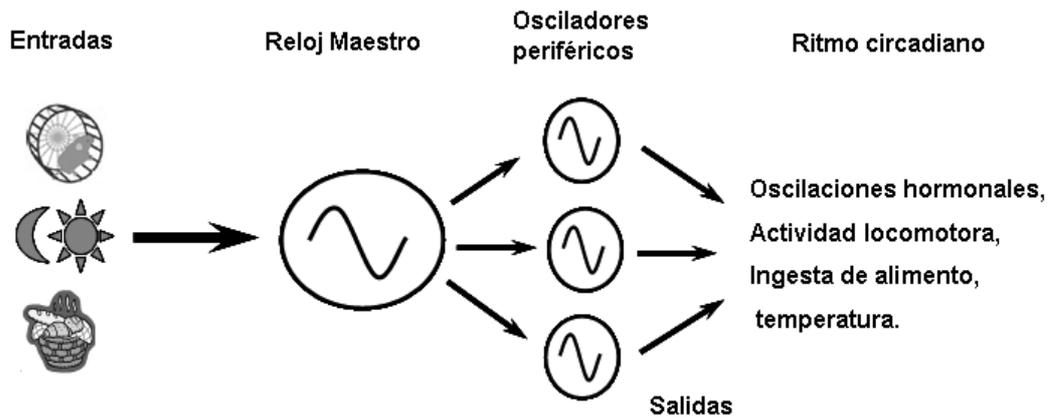
**Figura 5. Esquema representativo de diferentes variables metabólicas en humanos.**

Los círculos representan las acrofases de cada una de las variables. El recuadro blanco y negro representa al día y la noche respectivamente.

La expresión de tales ritmos continúa aún cuando los organismos estén temporalmente aislados de información periódica del medio, fenómeno conocido como oscilación espontánea, siendo una clara evidencia de un proceso autónomo de medición de tiempo circadiano. En seres humanos el ciclo sueño-vigilia es un ritmo circadiano, junto con el cual se ven acompañados una serie de cambios fisiológicos también con características circadianas, como por ejemplo oscilaciones de la temperatura corporal, la cual disminuye durante la noche junto con un incremento en la liberación de la hormona melatonina (Weitzman E. 1976). También se han descrito ritmos de la liberación de hormona luteinizante, de los niveles de cortisol plasmático, de leptina, de la hormona de crecimiento, de insulina y glucosa por mencionar algunos (Fig.5). (La Fleur y col 1999; Buijs y col 2001; Buijs y Kalsbeek, 2001; Van Cauter y cols. 1992, Kalsbeek y col 2001; Perreau-Lenz y cols 2004).

En los mamíferos, incluido el hombre, hasta la fecha se ha podido identificar que una serie de estructuras en el sistema nervioso central (SNC), así como órganos en la periferia tienen la capacidad de oscilar tanto a nivel central como periférico y que estos

osciladores periféricos se encuentran organizados de una manera jerárquica, en donde un reloj central mantiene el control de todos los demás osciladores circadianos con el fin de proveer un control rítmico de todas las funciones del organismo (Reppert y Weaver, 2002). El control rítmico de todos estos osciladores depende del reloj circadiano central: el núcleo supraquiasmático (Fig.6).



**Figura 6. Sistema circadiano en mamíferos.** Constituido por el reloj central, capaz de generar un tiempo circadiano autónomo en su actividad y recibir información ambiental de tiempo, promueve y mantiene la ritmicidad circadiana sobre una serie de osciladores periféricos para la expresión de los ritmos tanto conductuales como fisiológicos del organismo.

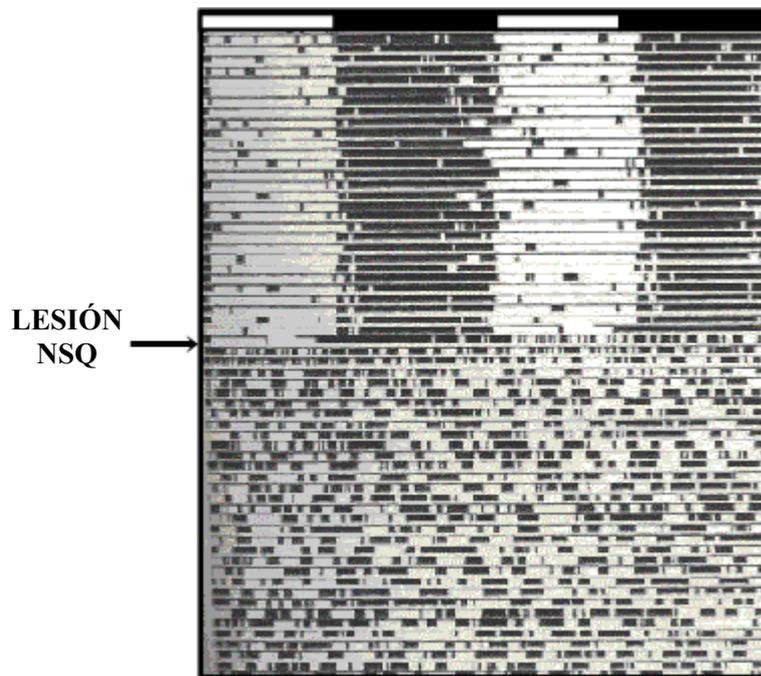
#### EL NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO: RELOJ CIRCADIANO MAESTRO.

Se considera reloj biológico al sistema que tiene la capacidad de generar una organización temporal rítmica en el organismo así como de imponer un periodo y una fase a los procesos internos. En la actualidad se conoce muy bien que el núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo, es el principal reloj biológico/circadiano en los mamíferos el cual genera y transmite su ritmicidad a otras zonas del cerebro y de ahí al resto del organismo.

El NSQ se encuentra en la parte anterior ventral del hipotálamo inmediatamente arriba del quiasma óptico. Este se compone de aproximadamente 15,000 neuronas de las cuales, la mayoría generan y mantienen oscilaciones circadianas autosostenidas en su actividad eléctrica ([Welsh D](#), y col.1995), en la captura de glucosa (Schwartz W. y col. 1987) y en la expresión de genes ([Yamaguchi S](#), y col. 2003), características que lo definen como reloj. Por lo tanto el NSQ es el responsable de la generación de la

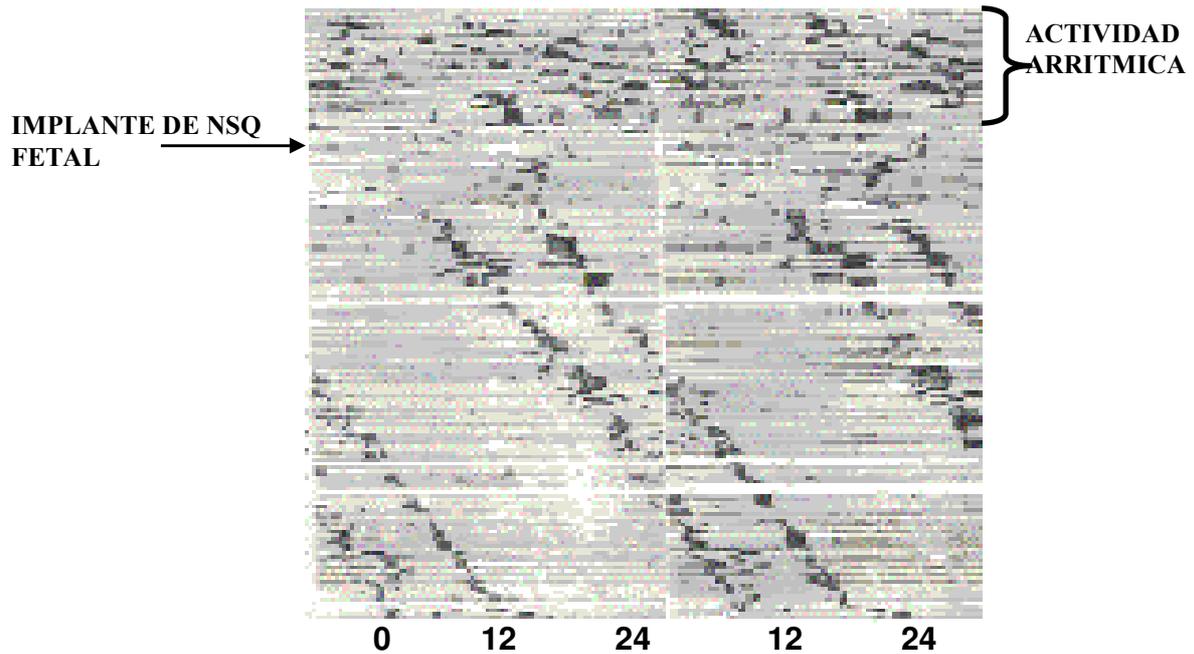
mayoría (si no es que de todos) de los ritmos bioquímicos, fisiológicos y conductuales en los mamíferos.

La función del NSQ como un reloj biológico se demostró cuando Moore y Eichler (1972) realizaron la destrucción de esta estructura y observaron que el ritmo de corticosterona se perdía. Simultáneamente Stephan y Zucker (1972) descubrieron que lesiones del NSQ eliminaban la ritmicidad circadiana de actividad locomotora y de ingestión de agua (Fig.7).



**Figura 7. Actograma de doble representación de actividad locomotora de un hámster.** En la mitad superior del actograma se muestra la organización temporal de la conducta con un periodo de 24 horas. La flecha indica el momento de la lesión del NSQ. Después de la lesión del NSQ, la organización conductual se vuelve totalmente arrítmica, distribuyendo su conducta de manera azarosa sin ninguna organización temporal. (Tomada de Moore, 1998).

Otra manipulación experimental que ha demostrado la capacidad del NSQ como reloj biológico circadiano, es que los animales con lesión del NSQ muestran una actividad locomotora arrítmica y cuando se realiza un transplante de tejido fetal hipotálamico con neuronas del NSQ, se observa una recuperación de su ritmo en la conducta locomotora (Fig.8) (Aguilar-Roblero y col. 1986).



**Figura 8. Actograma de doble representación de la actividad locomotora de un Hamster.** En la parte superior del actograma se observa la actividad arrítmica producto de una lesión del NSQ. La flecha indica el momento en que se implantó tejido fetal del hipotálamo anterior. Observándose la recuperación de la actividad locomotora en forma rítmica y con un periodo estable. (Tomada de Aguilar-Roblero y col., 1994)

#### ORGANIZACIÓN MOLECULAR DEL RELOJ CIRCADIANO.

Ya sabemos que el NSQ genera y transmite su ritmicidad a otras zonas del cerebro y de ahí al resto del organismo. Pero, ¿cómo puede cada célula del NSQ mantener oscilaciones de manera autónoma? La identificación de genes específicos dentro del núcleo de cada célula ha dado la respuesta.

La investigación se inició en la mosca de la fruta y condujo al descubrimiento del gen *periodo* (Per) lo cual ha sido muy fructífero y 30 años después nos ha colocado enfrente de los engranes moleculares del reloj, no sólo de las moscas, sino de todos los organismos vivos.

Las investigaciones han abarcado ya toda la escala filogenética; se han identificado genes circadianos en bacterias, algas, hongos, plantas y animales, incluyendo a nuestra especie (Dunlap J 1999). Para que un gen entre en esta categoría, su RNA mensajero y/o las proteínas que produce dicho RNA no deben expresarse de una manera homogénea a

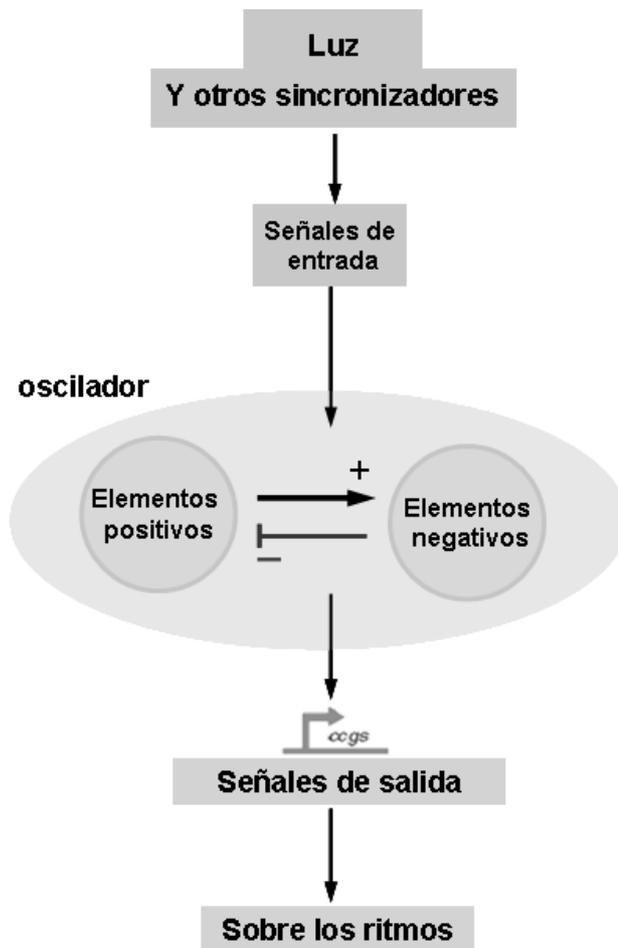
lo largo del tiempo, sino que durante ciertas horas deben presentar una máxima expresión y a otras horas no se deben detectar. Esto quiere decir que su producción sigue un ciclo de aproximadamente 24 horas alternando períodos de expresión con períodos de quiescencia.

Finalmente entre 1998-1999 con base en el conocimiento de los genes circadianos de la *Drosophila* se propuso un modelo general de funcionamiento de reloj biológico a nivel molecular.

Este modelo establece que el reloj consiste en un grupo de genes “A” que expresan su RNAm y proteínas, las cuáles sucesivamente estimulan la activación de otros genes, “B”, y otras proteínas las cuáles a su vez inhiben la expresión de los genes que les dieron origen, ósea los “A”. Podríamos decir que el modelo tiene dos elementos positivos “A” y dos negativos “B”. Los elementos positivos son los genes *Clock* y *Bmall* y los negativos son *periodo* y *Cryptochrome (cry)*. Las proteínas de estos dos últimos, denominadas respectivamente *PERIODO* y *CRYPTOCROME* entran al núcleo de la célula e inhiben la expresión de *Clock* y *Bmall*. Eventualmente las proteínas *PER* y *CRY* se degradan y dejan de ejercer su acción represora sobre los genes positivos, lo que posibilita que estos vuelvan a expresarse. Este proceso demora aproximadamente 24 horas, esto es, genera un ciclo circadiano (Fig.9). De manera general el modelo consiste de un asa de retroalimentación negativa de transcripción-traducción autorregulatoria. Por lo tanto se trata de un *feed-back* autorregulatorio negativo en donde la expresión de algo producirá su misma represión tiempo después.

Este modelo es el esquema general de funcionamiento en todas las especies que hasta ahora se han estudiado, de acuerdo a las especies cambian los nombres de los genes y de sus proteínas, pero el mecanismo de *feed-back* negativo se mantiene a través de la escala filogenética.

El estudio del reloj biológico a nivel molecular nos ayuda a profundizar más en su funcionamiento, además de trazarnos el circuito que es la base de la función biológica del ritmo. Se espera que el conocimiento de los genes reloj, nos sea útil para combatir los trastornos de sueño, depresión, obesidad, causados cuando el reloj no trabaja bien o se modifica por actividades de la vida moderna como el Jet lag o el trabajo nocturno.



**Figura 9. Circuitos del control de tiempo circadiano.** El reloj biológico consiste de circuitos de retroalimentación negativa que pueden ser sincronizados por señales ambientales a través de vías de entrada produciendo otros ritmos a través de vías de salida. La regulación circadiana de la expresión de genes controlados por reloj (GCR) a través de las señales de salida desempeñan un papel importante en la generación de los ritmos.

### LA SINCRONIZACIÓN

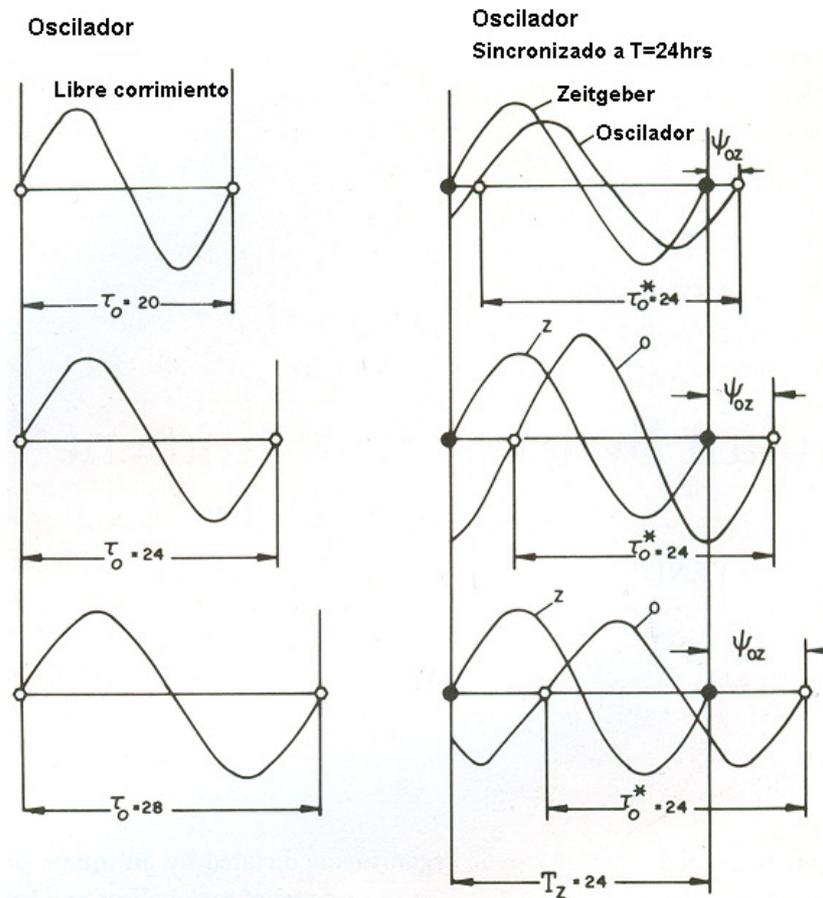
Para que un ritmo biológico tenga relevancia adaptativa debe presentarse en concordancia con los ciclos ambientales. No es suficiente que en el organismo existan oscilaciones, se requiere que estas oscilaciones modifiquen sus funciones o conducta de acuerdo a las fluctuaciones externas. Para ello se requiere la sincronización del reloj biológico con las señales externas.

Una oscilación circadiana puede ser sincronizada por una señal periódica externa, cíclica, predecible, ajustando el periodo y fase del ritmo endógeno, un ejemplo es la alternancia de luz/oscuridad generada por el movimiento de rotación de la Tierra.

El fenómeno de sincronización requiere que el sistema (el reloj o sus osciladores) adopte una relación de fase específica con el sincronizador, para lo que es necesaria la sensibilización de los osciladores endógenos a señales ambientales específicas y la habituación a otras. Para que el oscilador sea sensible, estas señales de tiempo deben de ser periódicas y predecibles para el organismo, lo cual provoca un ajuste del periodo del sistema circadiano al de la señal externa, llamada Zeitgeber (dador de tiempo) o sincronizador (Pittendrigh, 1981).

En ausencia de una señal de sincronización, que resulta de condiciones de oscuridad constante el ritmo de actividad locomotora de la rata oscila con un periodo poco mayor de 24 horas, que al imponer un ciclo externo de alternancia luz/oscuridad de 12/12 horas le impondrá un periodo de 24 horas sincronizando la fase de inicio de la actividad locomotora (Fig.10).

La sincronización se distingue de otros fenómenos como el aprendizaje porque los sincronizadores actúan en ausencia de otras señales externas que le indique al organismo la llegada del sincronizador, se sigue presentando la actividad cíclica endógena aún en ausencia del estímulo y presenta límites determinados de sincronización (Moore, Sulzman y Fuller, 1982; citado en Shettleworth, 1998). Esto significa que, un reloj que oscila con ritmos cercanos a 24 horas solamente puede sincronizarse a ciclos con un periodo parecido.



**Figura 10. Diagrama que muestra el fenómeno de la sincronización.** A la izquierda se muestran 3 oscilaciones con periodos distintos ( $T_o$ ), las cuales se exponen a un sincronizador con un periodo de 24 hrs. ( $T_z$ ), representado en la Fig.derecha. Al sincronizarse todas comienzan a oscilar con un periodo de 24 hrs. y cada uno con relación de fase ( $\psi_{oz}$ ) distinta hacia el sincronizador (modificada de Pittendrigh, 1981).

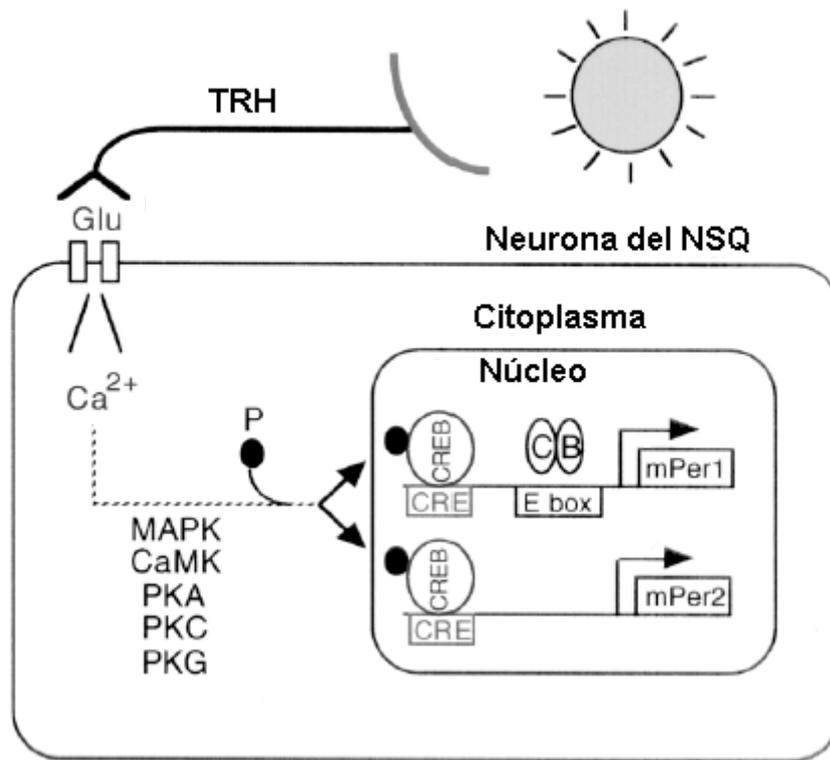
#### SINCRONIZACIÓN FÓTICA Y NO FÓTICA.

Otra de las características determinantes de los osciladores circadianos, a parte de la primordial que es presentar oscilaciones circadianas autosostenidas, es la de ser sincronizados por estímulos externos, lo cual permite al organismo estar en fase con las variaciones medioambientales a las cuales están expuestos. El NSQ se encuentra estratégicamente posicionado por arriba del quiasma óptico para recibir información

luminosa del exterior a través de vías tanto directas como indirectas de la retina. Por tal motivo, el principal sincronizador (o señal ambiental) para el NSQ es el ciclo luz-oscuridad (Aschoff 1965). La sincronización a la luz se lleva a cabo por un ajuste de la fase y periodo del reloj, y depende del momento del ciclo del día en el cual la luz es percibida por la retina.

La exposición a la luz durante la noche circadiana incrementa la tasa de disparo de las neuronas del NSQ, así como la expresión de genes reloj (Aschoff, 1981). A nivel conductual, la exposición a la luz genera un cambio de fase (un desplazamiento de una oscilación a lo largo del tiempo) en la actividad del animal, el cual puede ser un atraso (el animal inicia más tarde de lo esperado) o un adelanto (el animal inicia más temprano) dependiendo de si la luz se aplicó al inicio o al final de la noche circadiana respectivamente (Meijer, 2001;).

Directamente, el NSQ recibe información nerviosa proveniente de las células ganglionares de la retina a través del tracto retino-hipotalámico. La información luminosa estimula fotorreceptores de la retina los cuales liberan glutamato como principal neurotransmisor, éste a su vez activa receptores NMDA y no NMDA en el NSQ, lo cual lleva a una serie de eventos intracelulares (calcio/calmodulina, MAP cinasas) mediados por la liberación de calcio intracelular que llevan a la fosforilación de la proteína de adhesión a un elemento responsivo a AMP cíclico (cAMP), lo cual a su vez promueve la expresión nuclear de genes como *c-fos* y *per* a través de la adhesión a un elemento responsivo de cAMP localizado en los promotores de dichos genes (Repper y Weber, 2001, Cermakian y Sassone Corsi, 2002). (Fig.11)



**Figura 11.** La estimulación luminosa activa células ganglionares de la retina las cuales a su vez liberan glutamato en la terminal sináptica del tracto retino hipotálamico (TRH) estimulado receptores de dicho neurotransmisor (NMDA) en las neuronas del NSQ. Esto promueve un incremento en las concentraciones de calcio intracelular ( $Ca^{2+}$ ) y una activación de cascadas de ciertas moléculas (MAPK, CaMK, PKA, etc ) que posteriormente lleva a la expresión de genes reloj como Per. (Modificado de Repper y Weber y col. 2001).

No solamente estímulos luminosos pueden tener un efecto sobre la sincronización del NSQ. Una serie de estímulos de carácter no luminoso han sido descritos como poderosos sincronizadores, entre ellos, principalmente la inducción de actividad locomotora, la temperatura, la administración de algunos fármacos, la privación de sueño y el alimento en condiciones especiales, por mencionar algunos. (Hasting y col 1998; Hastings y col 1992; Mrososvsky, 1995, 1996; Antle y Mistlbrger, 2000; Mendoza y col 2004).

A los estímulos que son capaces de sincronizar la actividad del NSQ y por lo tanto también aquellas conductas o parámetros fisiológicos dependientes de este núcleo y que no son luminosos, se les llama no-fóticos. Estos estímulos que generalmente son sincronizadores secundarios o débiles, adquieren mayor intensidad en ausencia del ciclo luz-oscuridad, y son capaces de alterar el ritmo endógeno del organismo y la actividad del NSQ sólo en condiciones de oscuridad constante (Mrososvsky, 1995).

A nivel conductual, los estímulos no luminosos, generan principalmente grandes avances de fase cuando se aplican durante el día circadiano, un tiempo en el cual el reloj

no es sensible a la luz (Mrosovsky, 1995,1996). Por otro lado, a nivel molecular los estímulos no-fóticos producen una supresión de genes como del *per*, a la hora en la cual los niveles de dicho gene son máximos, que como consecuencia trae el avance de fase del reloj (Maywood y col. 1999; Horikawa y 2000; Maywood y Mrosovsky, 2001).

Los mecanismos neuroanatómicos que subyacen a la sincronización no luminosa, no son del todo claros, sin embargo, existe gran evidencia de que son mediados por las proyecciones que llegan directamente al NSQ, provenientes tanto de la hojuela intergeniculada lateral del talamo (HIL), a través del tracto geniculado-hipotalámico, utilizando como principal neurotransmisor el neuropeptido Y (NPY), como de los núcleos del rafe a través de una vía serotoninérgica y del PVT utilizando el glutamato como neurotransmisor (Meyer-Bernstein y Morin 1996; Mrosovsky 1996). Por ejemplo, las lesiones ya sea del HIL o de las vías serotoninérgicas hacia el NSQ bloquean los cambios de fase por estímulos no luminosos (Biello y col 1991; Wickland y Turek, 1994; Cutrera y col. 1994; Penev y col. 1995; Maywood y col. 1997).

#### **EL ORDEN TEMPORAL INTERNO**

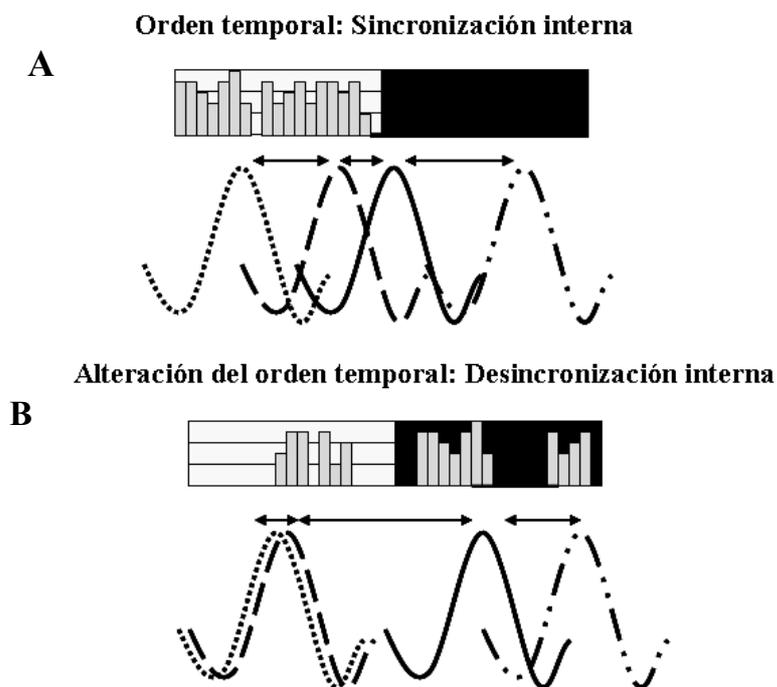
El NSQ al transmitir a todo el organismo su señal de tiempo, mantiene sincronizadas todas las funciones y la conducta para que oscilen con un orden de acuerdo a las fluctuaciones externas del día y la noche. Con ello se mantiene un “orden temporal interno” que permite el buen funcionamiento del cuerpo (Buijs y col. 2003). Desde un punto de vista cronobiológico, el estado de salud se define como la correcta relación de fases tanto entre los ritmos del propio organismo como entre éstos y el ciclo ambiental (Figs.12 y 13).

En condiciones normales de sincronización con un *zeitgeber* (sincronizador) fuerte como el ciclo luz/oscuridad de 24 hrs., cada ritmo circadiano del organismo asume una relación de fase estable con la señal de tiempo externa y las diversas variables fisiológicas mantienen una relación de fases estable entre sí, aún en ausencia de estas señales de tiempo, que se conoce como “oscilación libre o libre curso” (ausentes de *zeitgebers*; ejemplo la oscuridad constante). Esta sincronía interna entre variables se mantiene por el reloj biológico, el NSQ. Estudios en humanos indican que en ausencia de sincronizadores, los ritmos de sueño/vigilia, de temperatura corporal, y concentración plasmática de cortisol mantienen la misma periodicidad y relaciones de fases estables durante períodos prolongados (Minors y col. 1981 y Mistlberger y col.

2005). Al no depender de la presencia de un *zeitgeber*, este hecho sugiere la existencia de fuertes mecanismos de acople interno por parte del reloj hacia los demás tejidos osciladores.

El ser humano es esencialmente diurno, está preferentemente activo durante el día, tomando las horas de descanso durante la noche.

Las señales temporales que sincronizan al reloj biológico del ser humano son muy variadas. Las más evidentes son claves periódicas (de 24 horas) del ambiente, de las cuales la principal es el ciclo de día/noche y la temperatura; sin embargo también influyen sobre el reloj como sincronizadores, señales artificiales como la organización de horarios de trabajo, el esparcimiento, y otros compromisos sociales; así como la propia actividad física y cognitiva del individuo. Los horarios de comidas también son propuestos como claves de tiempo para los osciladores cerebrales y periféricos debido a los cambios metabólicos producidas por la comida y necesarios para la síntesis de los neurotransmisores involucrados en la transmisión sináptica (Stephan, 2002; [Winget](#), y col; 1984). Por lo tanto, vivimos inmersos en una compleja estructura social que condiciona nuestra vida diaria.



**Figura 12. Representación esquemática de distintas variables metabólicas.** En A. Un organismo con actividad diurna bajo condiciones normales de sincronización con un ciclo de luz / oscuridad de 24 hrs. Cada ritmo circadiano del organismo mantiene una relación de fases estable con la señal de tiempo externa y las diversas variables fisiológicas mantienen una relación de fases estable entre sí. En B se observa el mismo organismo pero con una alteración del orden temporal, ahora obligándolo a estar activo en la noche, se observa una pérdida de relación de fases entre la señal de tiempo y con diversas variables fisiológicas. Cada oscilación representa una variable fisiológica.

## **LA IMPORTANCIA DE ESTAR SINCRONIZADO**

El desarrollo de tecnología en comunicación, en la industria de alimentos así como en la prestación de bienes y servicios ha creado una relativa independencia del ambiente “natural”, lo cual ha creado prioridad a estímulos artificiales que influyen sobre el reloj biológico. Un ejemplo de como la vida moderna provoca situaciones que producen alteraciones en la sincronización son los cambios bruscos en el ambiente (vuelos de larga duración, turnos de trabajo rotatorios, trabajo nocturno, etc.) que genera señales conflictivas y por lo mismo alteraciones sobre el reloj biológico y la expresión de los ritmos circadianos (Fig.13). Estas situaciones provocan dos fenómenos, la desincronización externa, que consiste en una pérdida de la relación entre los ritmos endógenos y los externos; y una desincronización interna, que consiste en una pérdida del orden temporal, por una pérdida de acoplamiento entre el NSQ y sus osciladores periféricos. Este desajuste del orden temporal interno afecta al organismo de manera transitoria y aún así deja secuelas crónicas en la salud de las personas.

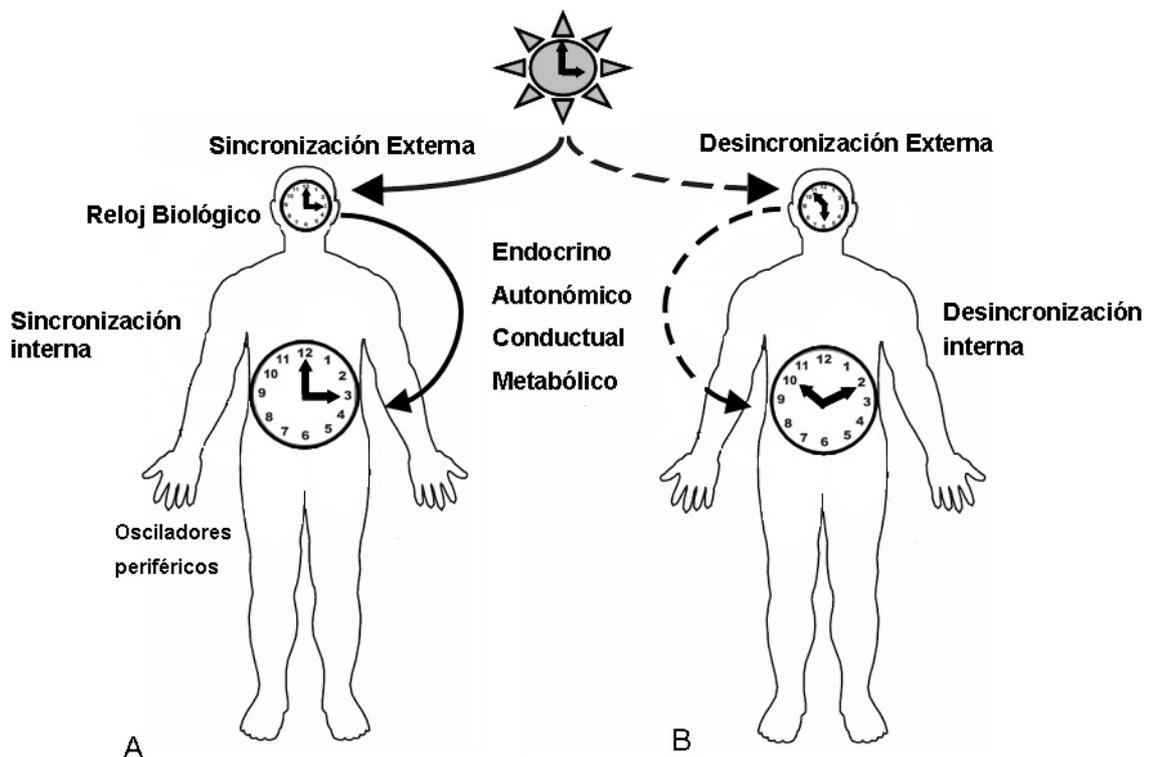
Algunas condiciones que provocan desincronización interna y externa son los viajes transmeridionales, los horarios de trabajo rotatorios, que ya se mencionaron y la vejez.

## **PROBLEMAS DE SALUD ASOCIADOS A LA DESINCRONIZACIÓN**

### **DESINCRONIZACIÓN POR VIAJES AÉREOS TRANSMERIDIONALES (Jet Lag)**

Los que habitamos este planeta sabemos que los tiempos y hábitos que desarrollamos están condicionados por nuestra localización geográfica. Aquellos que hayan volado cruzando meridianos debieron ajustar sus relojes pulsera para ser coherentes con el lugar de destino, adelantando o atrasando las agujas del reloj. Paralelamente, el reloj biológico experimenta la necesidad de realizar el mismo ajuste. Este ajuste frente a los cambios ambientales no es inmediato, y las distintas variables circadianas comprometidas en los procesos de oscilación del cuerpo exhibirán respuestas de fase diferentes: por ejemplo, los ritmos de frecuencia cardíaca, presión arterial, actividad locomotora, catecolaminas plasmáticas, entre otros, se sincronizarán más rápidamente que los ritmos de temperatura, melatonina, desechos urinarios y cortisol plasmático (Klein y col.;1991; Gander y col.; 1985 y [Yamaguchi](#) y col.2003).

La diferente capacidad de ajuste de cada órgano causa temporalmente una pérdida del orden temporal interno entre los osciladores periféricos, y gradualmente se restablecen las relaciones de fase de los ritmos entre sí, con el NSQ y con el nuevo horario (Graeber 1989, Moline y col. 1992). Por lo tanto el *jet-lag* resultante de viajes transmeridionales es definido como un conjunto de síntomas causados principalmente por una alteración del patrón de sueño, que ocurre cuando ciertos ritmos biológicos se encuentran fuera de fase entre sí y fuera de fase con el ciclo del día y la noche (Schwartz y col. 1987; Spiegel y col. 1996; Dawson y col. 1995, [Reddy](#) y col.1995).



**Figura 13. Representación esquemática de un individuo sincronizado con su ambiente (sano) (A) y otro desincronizado (enfermo) (B).** En A, la línea continua representa una correcta relación de fase del reloj biológico (NSQ) con el medio ambiente conocida como sincronización externa y la correcta relación de fase del reloj con sus osciladores periféricos conocida como sincronización interna. En B. La línea discontinua representa un individuo con desincronización externa, es decir no existe una relación de fases del NSQ con el medio ambiente. En la desincronización interna se plantea que existe una correcta relación entre el reloj y el medio externo, pero una alteración en la salida de señales rítmicas del reloj hacia el resto del organismo, que da como consecuencia un desacoplamiento del organismo con su propio reloj.

Las consecuencias de los vuelos transmeridianos son el mayor cansancio durante el día, menor grado de concentración y alerta, desorientación, “destemporalización”, así como irritabilidad y depresión ([Mrosovsky](#) y col. 1996, Deacon y col. 1996). Son frecuentes

también los desórdenes gastrointestinales derivados de la ingestión de alimentos en un horario inusual, tales como indigestión, diarrea, constipación, acidez estomacal y riesgo de úlceras gástricas y duodenales. Las consecuencias más graves se observan en personas que viajan constantemente y que el tiempo entre un viaje y otro no permite la resincronización interna. Estas personas se caracterizan por estados crónicos de cansancio, dificultad en la concentración y menor grado de alerta durante el día, así como amnesia temporal, debilidad general y ansiedad (Spiegel y col. 1996).

#### **LA DESINCRONIZACIÓN EN TRABAJADORES EN TURNOS Y NOCTURNOS.**

Desde hace varios siglos, ya existían jornadas de trabajo diurnas y nocturnas, especialmente en las actividades industriales extractivas y de los servicios de salud. En 1556, el médico Georg Bauer, describió en su libro “De Re Metallica”, las dificultades de salud por las que pasaban los mineros del tercer turno (o turno nocturno) (Akerstedt y col. 2004, Folkard y col. 1993). Escrito hace 443 años, este libro relata una situación que ocurre actualmente sólo que ahora en proporciones mayores (Chiesa, 1999).

El trabajo rotatorio o en turnos es una modalidad de organización laboral imprescindible para cualquier sociedad moderna. Se estima que en la actualidad un 20% de la población laboral realiza algún tipo de trabajo en turnos en variadas áreas, que comprenden tanto al sector de servicios como al industrial (Lavie, 2001). Las proyecciones indican que para la segunda década del siglo XXI aproximadamente un 40% de la población activa realizará alguna forma de trabajo en turnos. (Klerman y col. 1998).

El trabajo por turnos supone el trabajo fuera de las horas normales del día; es decir, fuera de las horas de 7 de la mañana a 6 de la tarde, el período durante del cual muchas personas trabajan regularmente 7 a 8 horas. Los trabajadores por turnos pueden trabajar por la tarde, a la mitad de la noche, trabajar horas extras o días muy largos (Mellor, 1996). También pueden trabajar algunas veces en horario normal. Muchos trabajadores por turnos tienen horarios rotatorios, lo que supone cambios de las horas de trabajo de la mañana a la tarde o del día a la noche. Estos cambios ocurren en días diferentes de una semana o en un mes. Los policías y los bomberos, por ejemplo, a menudo tienen calendarios de trabajo que rotan. Otros trabajadores pueden trabajar un turno "permanente" y trabajar solamente por la noche o por la tarde (Klerman, y col. 1998).

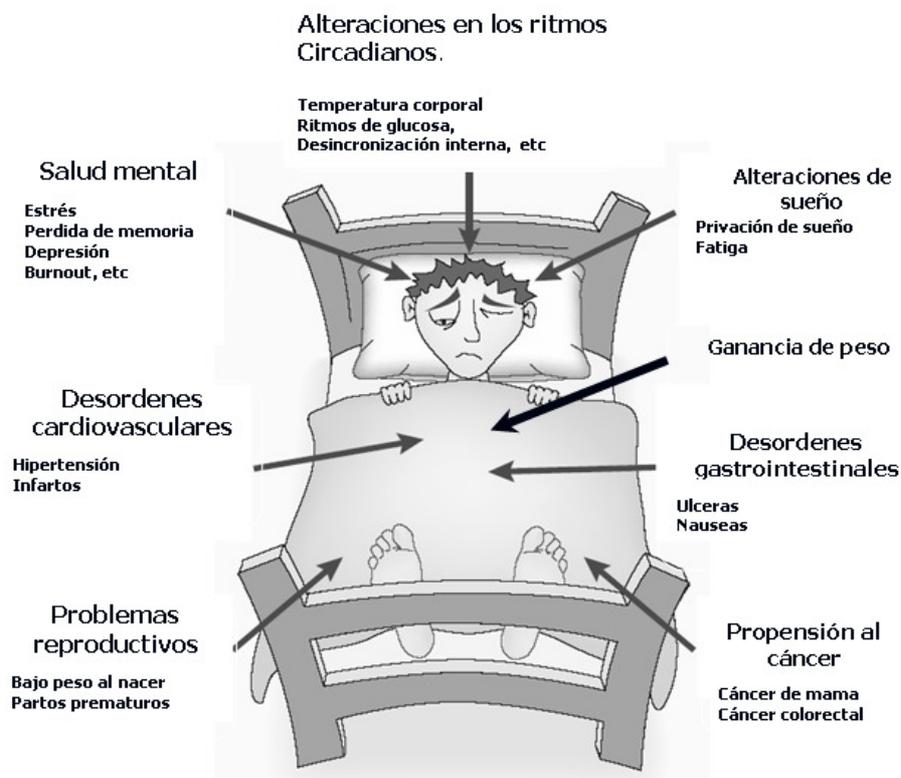
Desde el punto de vista cronobiológico, y cualquiera que sea el esquema de trabajo en turnos que se adopte, se produce siempre una reducción de las horas de sueño y una alteración de los ritmos circadianos. Esto lleva a una situación de estrés crónico en el trabajador de turnos rotatorios, el que reconoce 3 orígenes: (a) la alteración de los ritmos circadianos; (b) la fatiga y la alteración del sueño; (c) las alteraciones de la vida de relación doméstica y social.

Con relación a los ritmos circadianos, el turno de trabajo requiere, en general, que un individuo esté alerta en un momento inadecuado de su ciclo sueño-vigilia que puede resultar en un estado en el cual los ritmos circadianos del individuo pierdan su sincronía (Spitzer, y col. 1997; [Nagano](#), y col. 2003). Esta desincronización se debe a que el proceso de ajuste del sistema circadiano al cambio repentino de horario en el nuevo turno es lento y requiere una semana aproximadamente (un día por cada hora de diferencia entre turnos) por lo que el trabajador está en general desincronizado durante el turno nocturno. La presencia de sincronizadores externos (el día y la noche) en antagonismo con el requerimiento impuesto por los turnos (una sociedad diurna para individuos que quieren conciliar el sueño durante el día), afecta negativamente a la adaptación.

Un 60-70% de los trabajadores en turnos se queja de alteraciones del sueño y de fatiga aumentada durante el turno nocturno. Es común, que el trabajador lo atribuya a la falta de sueño. Una consecuencia extrema de la privación de sueño es la llamada "parálisis nocturna", episodios de 1-2 minutos de duración, en los cuales los individuos están conscientes de lo que ocurre a su alrededor pero son incapaces de actuar. La somnolencia y fatiga explican tanto incidentes menores como accidentes de trabajo graves (de clara predominancia nocturna), así como tragedias industriales del tipo de Chernobyl o el derrame petrolero del Exxon Valdez.

El sueño en un trabajador en turnos puede estar alterado tanto por factores endógenos como exógenos. Los factores endógenos provienen del sistema circadiano, preparado para el despertar en el momento que el trabajador de turno nocturno pretende tener su descanso. (Haus, y col. 2006, Van Cauter, y col. 2007). Es común, que el trabajador atribuya su falta de descanso al ruido del tráfico, los gritos de los niños, etc., sin percibir que, en realidad, es su sistema circadiano que indica dormir de noche, el responsable del sueño inadecuado durante el día. Esto conduce a una inadecuación social y doméstica, al impedir al trabajador cumplir adecuadamente con sus obligaciones familiares y

sociales. En este sentido, los conflictos sociales y familiares, por ejemplo la incidencia de divorcios, es significativamente mayor en personas que realizan trabajo en turnos. Con relación a las secuelas en la salud producidas por el trabajo en turnos, existe un aumento significativo en el número de consultas médicas y bajas por enfermedad en este grupo de trabajadores (Fig.14). Las quejas más comunes son el cansancio, la fatiga, irritabilidad, aumento del consumo de medicamentos, alteraciones menstruales, etc. Otras alteraciones específicas más comunes son la ganancia de peso, (Healy, y col. 1995;). las alteraciones gastrointestinales, (Hastings M. y col. 2003) comprendiendo a las gastritis en todas sus variantes y a la úlcera gastroduodenal y en segundo término, las alteraciones cardiovasculares (Boggild y col. 1999) y cáncer de mama en mujeres (Knutson y col. 2007; Ribeiro y col. 1998; Davis 2001, Spiegel y col. 2002). (Fig.14). En distintos estudios, a partir de los 5 años de exposición al trabajo en turnos, estas alteraciones aparecen con mayor incidencia que en la población general. La demanda social creciente del trabajo en turnos, hace necesario tomar decisiones sobre las características y tipos de turnos a realizar, pero hasta el momento sigue siendo un grave problema laboral.



**Figura 14.** Las secuelas en la salud producidas por el trabajo en turnos son variadas. Esta Fig.resume las alteraciones en la salud más comunes. (Modificado. Russell G. Nature Reviews, vol 6 may 2005).

## **DESARROLLO DE MODELOS ANIMALES PARA ESTUDIAR LA FISIOLOGÍA DEL TRABAJADOR NOCTURNO**

Las distintas investigaciones en humanos a lo largo de los años, han constatado que el trabajo en turnos es un factor psicosocial desfavorable para el bienestar del trabajador. Estas observaciones no han permitido entender qué alteraciones existen en el mecanismo del reloj, que propicien la pérdida de acoplamiento entre el medio ambiente y el reloj o de éste con los osciladores periféricos, lo cual desencadena la desincronización interna que puede llevar a una enfermedad.

Por tal motivo varios grupos han tratado de crear modelos animales que permitan estudiar y entender mejor los mecanismos que llevan al desacoplamiento de los ritmos causadas por el trabajo nocturno y para probar estrategias que disminuyan o eviten sus efectos.

Barger L. y col. 2006, desarrolló un modelo de trabajadores en turno y de viajeros transmeridionales (Jet lag), basándose en estudios previos donde probó si el ejercicio facilita la adaptación circadiana. Para esto propuso un modelo donde por 5 días las ratas estuvieron bajo un ciclo L/O 12: 12 y posteriormente invirtió este ciclo, ahora O/L 12:12 simbolizando un cambio repentino en el trabajo o un viaje transmeridional. En este nuevo periodo de luz, al organismo se le obligaba por 7 días a realizar ejercicio en una rueda de actividad 3 veces al día por una hora. Demostró que el ejercicio puede atrasar significativamente la fase del reloj maestro y esto puede ayudar a facilitar la adaptación circadiana en aquellas modalidades que requieran un atraso de fase en su ciclo sueño-vigilia.

[Tsai LL](#), y col 2005, 2007 siguieron otra estrategia con el objetivo de generar una desincronización interna crónica. Su método consistió en alternar un ciclo invertido O/D 12:12 por 3 días (Martes-jueves) con 3 días en un ciclo L/O 12:12 (Viernes-Domingo), seguido de un día en oscuridad constante (lunes). Esto se realizó por 13 semanas para generar una desincronización interna. Sus resultados mostraron un incremento en la ganancia de peso y en la ingesta de alimento ([Tsai LL](#), y col., 2007). De forma similar [Bartol-Munier](#) y col. (2006) siguieron un diseño crónico con cambios de fase similares y observaron cambios en el alimento ingerido, pero sin ganancia de peso y reportaron reducción en la actividad, sugiriendo esto como parte de una desincronización circadiana crónica.

Existen muchos trabajos más que han abordado el trabajo nocturno, (Ribeiro, y col. 1998; Reid y Dawson 2001) en todos ellos se utilizan estrategias de cambios del ciclo luz oscuridad Esta estrategia, que representa principalmente una condición de jet-lag ha llevado a resultados poco consistentes y muchas veces contradictorios, dependiendo de la forma en que se realizan los cambios del ciclo luz-oscuridad.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Los modelos animales para estudiar los efectos del trabajo nocturno utilizados hasta el momento utilizan estrategias de cambios del ciclo luz oscuridad y no reflejan las condiciones reales del trabajador nocturno. Pocos trabajos han abordado el mantener activos a los animales para simular la situación real del trabajador nocturno.

Este proyecto tuvo como objetivo desarrollar un modelo de trabajo nocturno en ratas semejante a las condiciones del trabajador nocturno, para ello se utilizaron ruedas de actividad forzada en las cuales las ratas trabajaron. Se forzaron a estar activas 8 horas diarias de lunes a viernes. Con este modelo se pretendió determinar los mecanismos que subyacen a la desincronización temporal metabólica y conductual y con la actividad del NSQ, para establecer su relación de fase con el ciclo de luz/oscuridad y del NSQ con sus efectores.

Con este modelo se pretendió observar un fenómeno de desincronización interna similar al que se observa en los trabajadores nocturnos para estudiar los mecanismos que desencadenan dicha desincronización.

Finalmente con este modelo se probaron estrategias para prevenir la desincronización interna, en especial se manipularon los horarios de alimentación como una estrategia para reacoplar los ritmos conductuales y metabólicos y aminorar o evitar disfunciones metabólicas en el trabajador nocturno.

## **OBJETIVOS GENERALES**

- Crear un modelo de trabajo nocturno utilizando una rueda de actividad forzada para mantener activos a los animales durante su etapa de descanso; sin alterar su ciclo L/O.
- Caracterizar el fenómeno de desincronización interna en ratas bajo el paradigma de trabajo nocturno por medio de la comparación de la relación de fase entre:
  - sus ritmos circadianos, metabólicos y conductuales.
  - el ritmo del NSQ y el ciclo L/O
  - El ritmo del NSQ con sus efectores
- Determinar el o los factores que propician la desincronización interna entre el NSQ y sus efectores.
- Probar horarios restringidos de alimento como una estrategia, para disminuir las alteraciones que provoca el trabajo nocturno.

## **HIPÓTESIS GENERALES**

- La exposición diaria por 8 horas a la rueda de actividad forzada provocará una desincronización interna en roedores, semejante a las que se observan en un trabajador nocturno.
- La actividad forzada durante la fase de descanso, provocara que el NSQ:
  - Pierda su relación de fase con el ciclo L/O.
  - Pierda su relación de fase con sus efectores
- El alimento será una potente señal que ocasiona una desincronización interna entre ritmos metabólicos y conductuales bajo esta manipulación.
- Restringir los horarios de alimento será una buena estrategia para resincronizar ritmos metabólicos y conductuales y disminuir las alteraciones que provoca el trabajo nocturno.

## **ETAPA 1**

### **CARACTERIZACIÓN DEL MODELO DE TRABAJO NOCTURNO**

Con la idea de poder determinar si el trabajo en una rueda de actividad forzada durante la etapa de descanso genera alteraciones fisiológicas y/o conductuales en la rata, se plantearon las siguientes hipótesis y objetivos:

#### **OBJETIVOS**

- Probar sí en la rata, la actividad forzada durante su etapa de descanso, por 8 horas diarias utilizando una rueda de actividad, genera alteraciones similares a las reportadas en un trabajador nocturno.
- Caracterizar en este modelo animal de horarios nocturnos de trabajo, sus ritmos circadianos, metabólicos y conductuales.

#### **HIPÓTESIS**

- La exposición diaria por 8 horas a la rueda de actividad forzada provocará una desincronización interna en roedores, semejante a las que se observan en un trabajador nocturno.
- La actividad forzada durante la fase de descanso, provocara que el NSQ:
  - Pierda su relación de fase con el ciclo L/O.
  - Pierda su relación de fase con sus efectores

#### **MATERIALES Y METODOS**

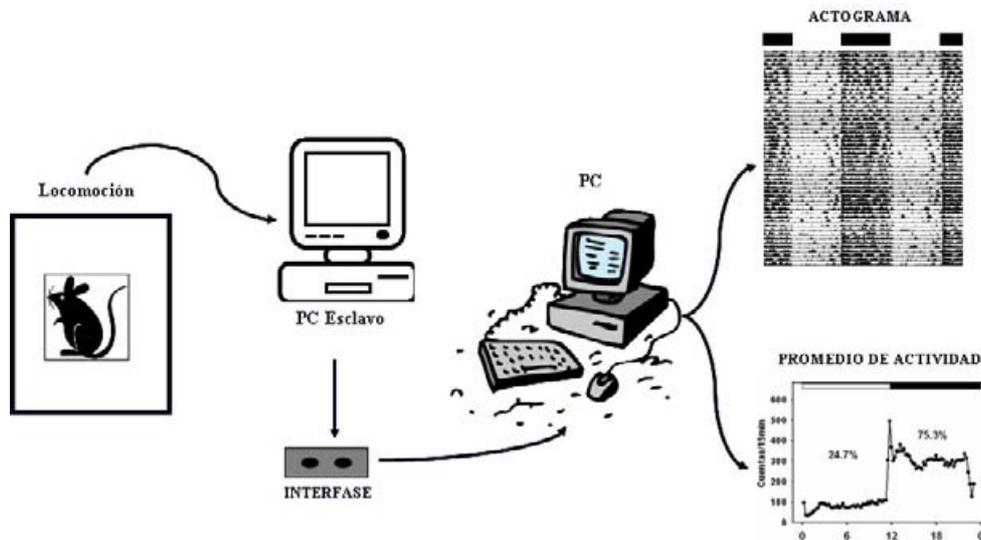
##### **ANIMALES**

Se utilizaron ratas Wistar macho con un peso inicial de 140-160gr., mantenidas en un cuarto de registro aisladas en cajas habitación individuales de acrílico (50x30x20 cm) en condiciones de temperatura controlada ( $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) y bajo un ciclo de luz / oscuridad (L/O) 12:12, donde el encendido de la luz fue a las 7 AM (Zeitgeber time, ZT0) y el apagado a las 19 horas (ZT12). Todos los grupos tuvieron libre acceso al agua y alimento (Rodent Laboratory Chow 5001).

##### **PROCEDIMIENTO PARA EL REGISTRO AUTOMATIZADO DE CONDUCTA.**

Las ratas utilizadas en todas las etapas de este trabajo se alojaron individualmente en un cuarto aislado, sono amortiguado, en cajas de acrílico transparente. A estas cajas se les

ha adaptado un sistema de registro conductual automatizado que consiste de sensores de presión colocados bajo las cajas, con los que se registra el movimiento de los animales (Fig.15). Los movimientos crean pulsos de conducta que se colectan en una computadora que almacena unidades de 1-5 minutos. Este mismo sistema programa la duración e inicio del fotoperíodo.



**Figura 15. Sistema de registro conductual para ratas.** A estas cajas se les ha adaptado sensores de presión colocados bajo las cajas, con los que se registra el movimiento de los animales. Los pulsos de conducta se colectan por una computadora que almacena unidades de 1-5 minutos. Otra computadora contiene los programas de análisis necesarios para realizar los estudios de cronobiología y estudiar la conducta del animal.

## ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO DE TRABAJO NOCTURNO: DISEÑO EXPERIMENTAL

Se asignaron al azar las ratas en 3 grupos.

**El grupo control:** Se mantuvo en registro conductual en el cuarto de registro sin manipulación durante 5 semanas.

**Grupo de trabajo durante la fase de descanso (TFD) (modelo de trabajo nocturno).**

Después de una semana de línea base, se inició la fase de trabajo. Para ello, se sacó a cada rata de su jaula habitación y se le colocó en una rueda de actividad cerrada y conectada a un motor que genera oscilaciones lentas y constantes (1 revolución / 2.5 minutos) obligándolas a moverse (trabajar) 8 horas diarias durante la fase de luz (etapa de descanso) de 9 a.m. a 5 p.m. (ZT2. ZT10) de lunes a viernes (Fig.16) Este procedimiento se siguió por 4-5 semanas. Después de las 8 horas de trabajo los animales

se regresaban a su jaula hasta el siguiente día. Los fines de semana se mantuvieron sin manipulación dentro de sus cajas habitación de registro (Fig. 17).

**Grupo de trabajo durante su fase de actividad (TFA) (modelo de trabajo diurno):** Este grupo tuvo como finalidad ser control de trabajo y permitió determinar que los efectos encontrados no se debieran a la rueda misma sino a la actividad durante el reposo. Después de una semana de línea base se inició la fase de trabajo de la misma forma que el grupo anterior de lunes a viernes, pero la estancia en la rueda se llevó a cabo durante la noche de 9 p.m. a 5 a.m. (ZT14, ZT22), que corresponde a la fase de actividad de las ratas. Igualmente, durante el trabajo tuvieron libre acceso al alimento y agua.

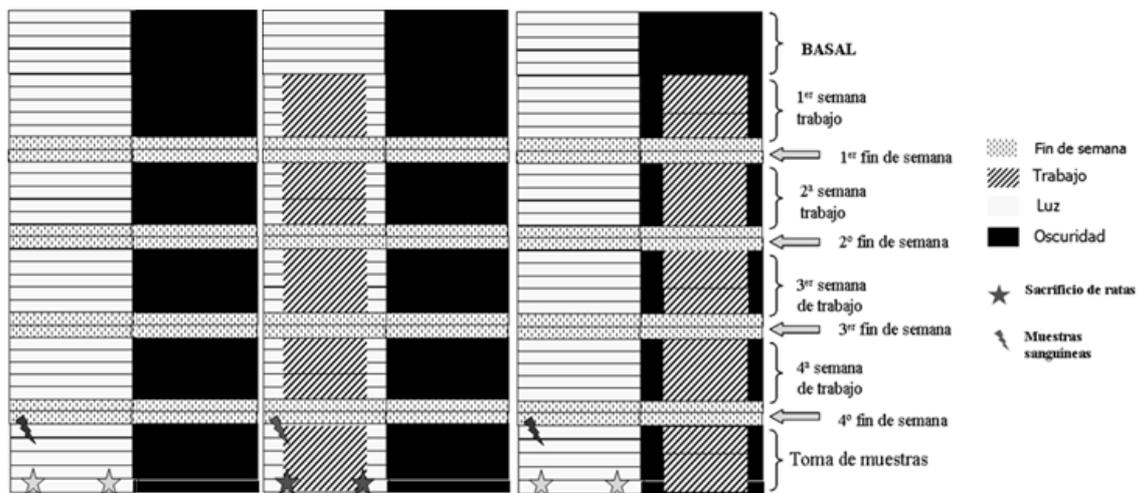


**Figura 16. Rueda de actividad forzada.** La rueda cuenta con cuatro divisiones, en cada división se mantiene una rata. Las rotaciones lentas de estas ruedas mantienen activas a las ratas durante las 8 horas de trabajo, en estas ruedas tienen la oportunidad de alimentarse y tomar agua *ad libitum*.

Se sometieron a esta rutina de actividad durante 4-5 semanas, similar a lo que realiza un trabajador diurno. Este grupo permitió descartar si los efectos observados en el grupo TFD se debían a su estancia en la rueda o a la actividad forzada asociada a la fase de reposo (Fig.17).

#### **MONITOREO DE PESO CORPORAL E INGESTA DE ALIMENTO**

Los animales se pesaron al inicio del estudio y una vez por semana (jueves) durante las semanas que duró la rutina de trabajo, a la misma hora. El alimento se pesó 2 veces a la semana (lunes y viernes) a las 7 de la mañana para medir el consumo de alimento nocturno y para medir el consumo de alimento durante el día a las 7 de la noche.



**Figura 17. Diseño experimental y procedimiento de trabajo.** La actividad en la rueda (cuadros con líneas diagonales) se siguió por 5 semanas 8 horas durante el día para el grupo TFD (izquierda) y durante la noche para el grupo TFA (derecha). Después de 5 días de trabajo, los animales se dejaban sin manipulación los fines de semana y el lunes siguiente se repitió el protocolo. Al final de la cuarta semana de trabajo se canularon los animales y se tomaron muestras de sangre (rayo) durante la 5ª semana de trabajo y al final de esta se sacrificaron todos los animales (estrella).

#### DETERMINACIÓN DE RITMOS METABÓLICOS Y HORMONALES

Al finalizar la cuarta semana de trabajo (jueves o viernes) y para determinar los ritmos metabólicos y hormonales en suero se les colocó a todas las ratas una cánula en la vena yugular externa, de acuerdo a Steffens (1969). Los animales fueron anestesiados con Zoletil 100 (Virbac 0,01 ml/100g) y canulados en la vena yugular interna con una cánula yugular pediátrica de silicón de polietileno (0,025 de diametro interno y 0,047 de diametro externo; Silastic Brand) llena de heparina (200 U/ml) como anticoagulante. La cánula fue fijada en la espalda entre ambas escápulas (omóplatos) y se tapó con una pequeña aguja.

Las ratas se dejaron en recuperación durante el fin de semana y el siguiente lunes el protocolo de trabajo se retomó. Al final de la 5ª semana de trabajo, se obtuvieron muestras de sangre distribuidas en dos días (el jueves y el viernes) cubriendo un ciclo de 24 h con intervalos de 3 h entre muestras (ZT0, ZT3, ZT6, ZT9, ZT12, ZT15, ZT18, ZT21). Las muestras de sangre (250µl) se colectaron en tubos Eppendorf (1.8 ml) que contenían un gel separador del coágulo (Vacutainer), se obtuvo el suero por centrifugación, 5 minutos a 3000 rpm y se guardaron alícuotas de 50-100µl a -45°C para su análisis posterior.

Las alícuotas fueron procesadas con métodos colorimétricos para la determinación de glucosa, triacilglicéridos (TAG) y con RIA para determinar corticosterona.

Se elaboraron perfiles temporales diarios por medio de promedios por grupo de cada punto temporal, que fueron comparados entre grupos y con relación al ciclo de L/O.

#### **DETERMINACIÓN DE GLUCOSA, TAG Y CORTICOSTERONA**

La glucosa fue estimada con una muestra de 10- $\mu$ l usando un Kit comercial de colorimetría (No. 70478; Hycel de México), en el que se basó la reacción entre la glucosa y *fenol-4amimofenazona* como cromógeno y fue medido a 500nm, con un espectrofotómetro (Novaspec II Visible, Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge, England).

Los TAG fueron evaluados con un kit comercial (no. B01-4512-01, SERA-PAK plus, Bayer, Sees, Francia) por cuantificación de *4-aminoantipiridina* a 500 nm, lo que es proporcional al glicerol producido por hidrólisis enzimática de una muestra de 10 $\mu$ l.

La corticosterona fue determinada con radioinmunoanálisis con un Kit comercial (Coat-A-Count Rat corticosterone; TKR1; DPC, Los Ángeles CA, USA), basado en la competencia de los sitios del anticuerpo entre <sup>125</sup>I-marcado y el suero de corticosterona. Esta reacción de unión es detectada por un contador gamma (Compañía Cobra II, Packard) y convertida con una curva estándar al suero de corticosterona. Los perfiles temporales diarios fueron comparados entre grupos y con relación al ciclo de luz- oscuridad.

#### **INMUNOHISTOQUÍMICA PARA PER1 Y PER2**

Las ratas (N=32 por grupo) fueron anestesiadas con una sobredosis de pentobarbital sódico (Sedal-Vet 65 mg/ml), y perfundidas transcardialmente (ventrículo izquierdo) con 250 ml. de solución salina (0.9%), seguido por 250 ml de paraformaldehído al 4% en buffer fosfato (PBS, 0.1 M, pH 7.2). Al finalizar la perfusión, se extrajeron los cerebros y se postfijaron en paraformaldehído al 4% durante 1 hora. Las ratas fueron perfundidas en 8 puntos temporales (ZT0, ZT3, ZT6, ZT9, ZT12, ZT15, ZT18 y ZT 21) para completar un ciclo de 24 h y determinar la ritmicidad de la proteína PER1 y PER2.

Los cerebros fueron removidos, posfijados por 1 h y crióprotegidos sucesivamente en una solución de sacarosa al 10, 20 y 30% en PB al 0.1 M por 24 horas. Los cerebros se congelaron y se cortaron en secciones coronales de 40  $\mu\text{m}$  con un crióstato a  $-18^{\circ}\text{C}$  y se colectaron en 4 series. De estas series una se incubó por 72 horas a  $4^{\circ}\text{C}$  con un anticuerpo primario para la proteína PER1 hecho en cabra (Santa Cruz biotechnology, USA) diluido 1:1000 en PBS pH 7.2 con 1% suero de conejo y 0.3% tritón X-100 (PBSRT). Una segunda serie se incubó 48 hrs. con un anticuerpo para la proteína PER2 hecho en conejo (Alpha Diagnostic International) diluido 1:500 en PBS pH 7.6 con 1% de suero de cabra y 0.3% tritón X-100 (PBSGT).

Después de la incubación las secciones se lavaron 3 veces por 10 minutos en PBS, y posteriormente se incubaron por 2h con un anticuerpo secundario biotinilado 1:200 (Anti-cabra hecho en conejo para PER1 y anti-conejo hecho en cabra para PER2; Vector laboratorios) en PBSRT o PBSGT respectivamente. Al finalizar las dos hrs. de incubación, los cortes se lavaron 3 veces por 10 minutos en PBS y se incubaron en una solución de avidina-biotina peroxidasa al 0.9% (Vectastain Elite ABC Kit; vector Labs, USA) por 2 horas. La incubación para PER1 fue hecha a temperatura ambiente mientras que para PER2 se incubó a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Al finalizar la incubación los cortes nuevamente se lavaron 3 veces por 10 minutos en PBS y al finalizar el último lavado, los cortes se visualizaron con diaminobenzidina (0.5 mg/ml, en buffer de trizma 7.2) y peróxido de hidrógeno al 30% (35  $\mu\text{l}$ /100 ml). Cada corte fue montado en láminas (porta-objetos) gelatinizadas y deshidratadas en una serie de alcoholes y aclaradas con xilol para posteriormente ser cubiertas con cubreobjetos y Permout (Fisher Chemicals).

#### **CONTEO CELULAR**

Para cuantificar la expresión de PER1 y PER2 en el NSQ, se escogieron 3 secciones representativas de este núcleo de acuerdo con el atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (1998), una sección anterior (bregma 0,92); una sección medial (bregma 1,20) y una sección posterior (bregma 1,40). Las imágenes fueron examinadas bajo un microscopio (Nikon Eclipse E600; Nikon, Tokio, Japón) y capturados en una ampliación 10X que utiliza un sistema computarizado de análisis de imagen (de la serie Meta Vue 4.5, Universal Imaging Corporation, Downingtown, PA, USA). Los núcleos

inmunoreactivos fueron contados bilateralmente por un observador que fue ciego a las condiciones experimentales. Para evitar el número de falsos positivos, se determinó la densidad óptica del fondo en una región cercana que carece PER1 o PER2. Las células inmunorreactivas que alcanzaron o superaron tres veces la densidad óptica del fondo fueron contadas, mientras las células por debajo de este umbral fueron descartadas. La media de los valores por punto temporal se representa con curvas temporales y se compararon con un ANOVA de dos vías para los factores grupo y tiempo.

### **ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

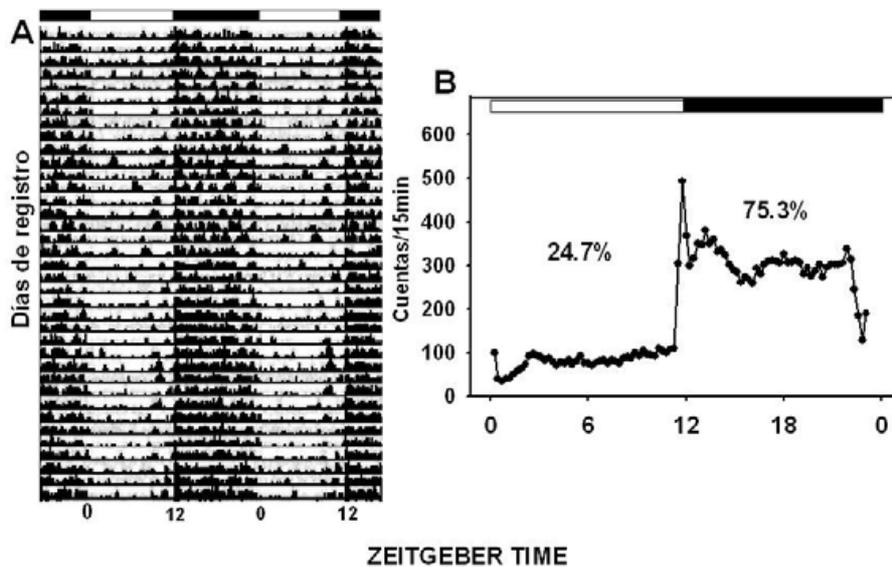
Los datos se ordenaron por grupos y tiempo y se representan como medias  $\pm$  el error estándar (sem). El incremento en peso corporal fue analizado con una ANOVA de una vía. La ingestión de alimento fue analizada con una ANOVA de dos vías para los factores: grupo y semanas (5).

La concentración de glucosa sérica, TAG y corticosterona, así como el número de células positivas a PER1 y PER2 fueron evaluadas con una ANOVA de dos vías para los factores grupo (3 niveles) y tiempo (8 niveles), como un factor de medidas repetidas para las medidas metabólicas y para medidas independientes para PER1 y PER2. Todos los análisis fueron seguidos de una comparación post-hoc múltiple de Tukey ( $P < 0,05$ ). El análisis estadístico fue realizado con el programa Statistica para la versión de Windows 4,5 (StatSoft, 1993).

## RESULTADOS

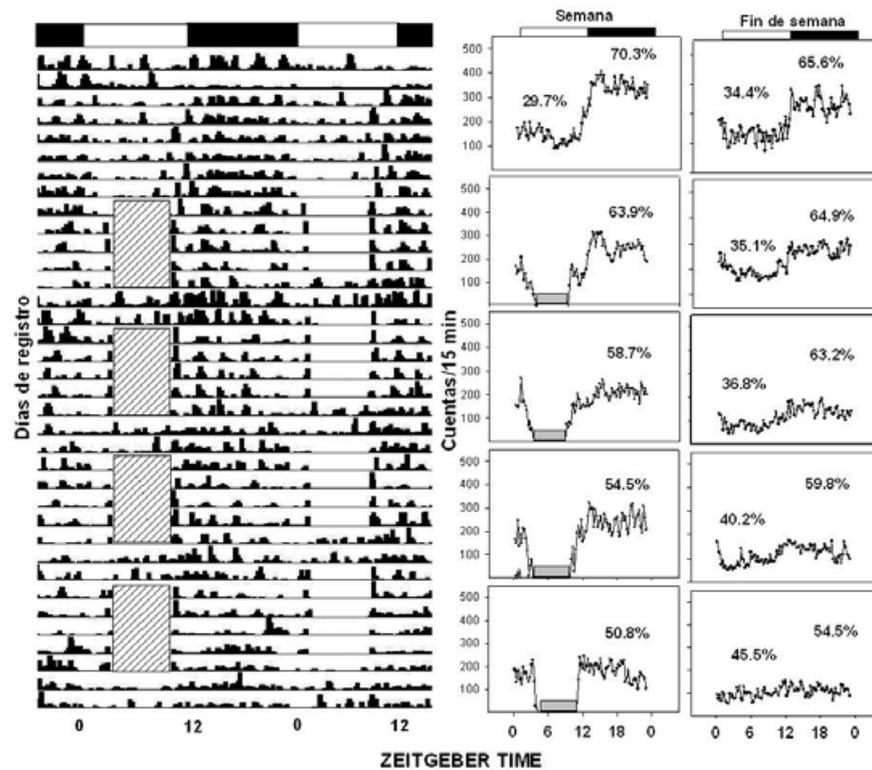
### RITMOS CONDUCTUALES

Las ratas control, así como las ratas TFD y TFA en su línea base exhibieron ritmos claros sincronizados al ciclo L/O. La actividad nocturna representada para todos los grupos fue de 75-80%, mientras que la actividad diurna representó entre 20 y 25% de la actividad total diaria (Fig.18)



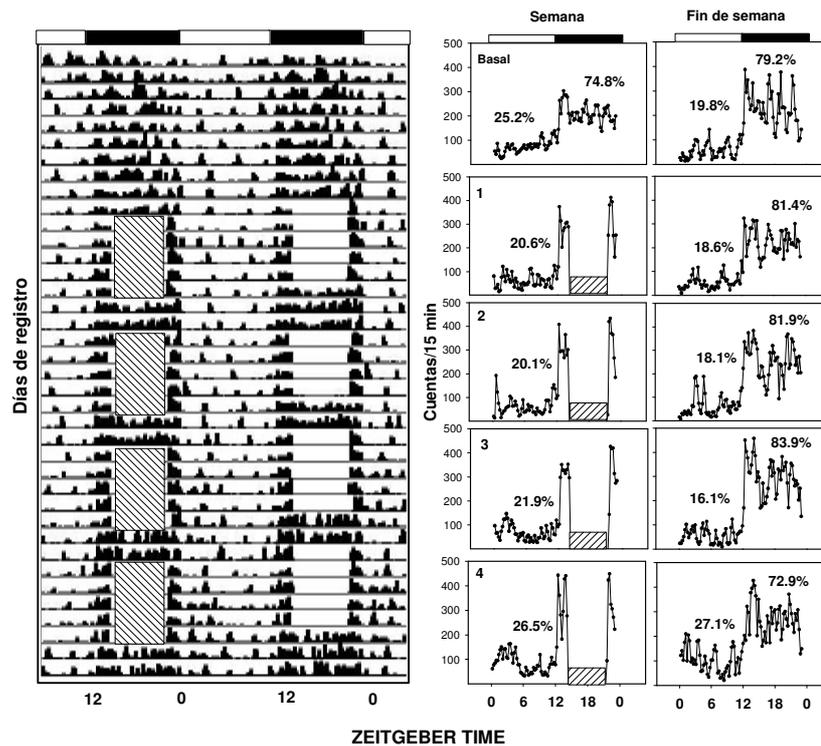
**Figura 18.** Actograma representativo en doble representación de la actividad general de una rata control con alimento y agua *ad libitum*. (A). En el actograma, cada línea representa un día de registro. En (B) promedio de actividad de 16 ratas control y el porcentaje de actividad diurna y nocturna. Se observan claramente ritmos diarios sincronizados al ciclo LD. La barra blanca y negra representa el ciclo LD.

Las ratas TFD (forzadas a trabajar durante su fase de descanso) exhibieron a lo largo de las semanas de trabajo un progresivo decremento en su actividad nocturna como se observa en el actograma (Fig.19) y en los perfiles de actividad obtenidos para los días de trabajo y sus correspondientes fines de semana. Después de la cuarta semana de trabajo, durante el fin de semana la actividad nocturna representó una proporción de 54,5% de la actividad total diaria mientras que la actividad diurna había aumentado a 45,5%, sin observarse un ritmo diurno significativo (Fig.19).



**Figura 19.** Actograma representativo en doble representación de ratas TFD (Izquierda). Los primeros 9 días corresponden a la línea base, seguida de 4 semanas bajo condiciones de trabajo. Del lado derecho se presenta el promedio de actividad para la línea base (Parte superior) seguida de cada semana de trabajo (numero 1-4) y los fines de semana (a la derecha). Las ratas TFD (n=16) exhiben a lo largo de las semanas un progresivo decremento de su actividad nocturna. El tiempo en la rueda de actividad, esta representado por los cuadros con líneas diagonales. Más indicaciones en Fig.18

Las ratas TFA (trabajaron durante su fase de actividad), mantuvieron un patrón temporal de actividad similar a su línea base y su actograma y promedio de actividad mostraron patrones similares al grupo control (Fig.20). Durante los días de trabajo, la actividad diurna mantuvo proporciones similares a las que se observaron en la línea base (20-25%) y durante los fines de semana, las ratas exhibieron una robusta ritmicidad con una alta proporción de actividad nocturna (Fig.20).

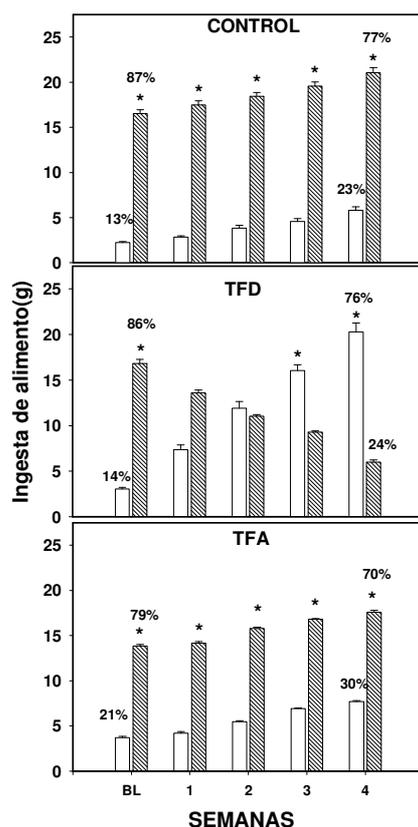


**Figura 20.** Actograma representativo en doble representación de ratas TFA (Izquierda). A la derecha se presenta el promedio de actividad para la línea base (Parte superior) seguida de cada semana de trabajo (numero 1-4) y los fines de semana correspondientes (a la derecha). Las ratas (n=12) mantuvieron similares proporciones de actividad diaria a las observadas en la línea base y las semanas de trabajo (1-4). Durante los fines de semana las ratas exhibieron una robusta ritmicidad con una alta proporción de actividad nocturna. El tiempo en la rueda de actividad, está representado por los cuadros con líneas diagonales. Más indicaciones en Fig. 18.

#### INGESTIÓN DE ALIMENTO Y PESO CORPORAL.

Durante la línea base los tres grupos mostraron una patrón similar diario en el consumo de alimento, caracterizado por una proporción baja en el consumo de alimento durante la fase luz (alrededor de 20%) y una proporción más alta de ingestión de alimento durante la fase oscura que osciló entre 79-87 % . Las ratas control mantuvieron esta proporción a lo largo de las 4 semanas (Fig.21 arriba).

Interesantemente, desde la primera semana de trabajo el grupo TFD disminuyó su consumo nocturno de alimento y a lo largo de las 4 semanas de trabajo aumentó progresivamente su consumo diurno mientras trabajaban en la rueda de actividad. Para la cuarta semana de trabajo, las ratas TFD habían invertido sus patrones de alimentación y ahora comían predominantemente durante sus horas "de trabajo" en la fase de luz (Fig.21 centro). En contraste, las ratas TFA mantuvieron su patrón nocturno de alimentación (durante sus horas "de trabajo") y la proporción en el consumo de alimento fue semejante al observado en el grupo control (Fig.21 abajo).



**Figura 21. Promedio de la ingesta de alimento de ratas control, TFD y TFA durante el día (Barras blancas) y durante la noche (barras rayadas).** Durante la línea base (BL) los tres grupos mostraron un patrón de consumo similar, caracterizado por un bajo consumo durante el día y alto consumo durante la noche. Esta proporción fue progresivamente revertida a lo largo de las 4 semanas de trabajo para el grupo TFD. Asteriscos indican una diferencia estadística entre los valores del día y la noche. ( $P < 0.05$ ).

La ingestión de alimento total por día fue semejante en todos los grupos, sin embargo las ratas sometidas a la actividad forzada durante el día ganaron más peso que los controles y que el grupo de TFA. Este efecto fue estadísticamente significativo a partir de la 3ª y 4ª semana de "trabajo" (Ver tabla 2). La actividad igualmente forzada durante la noche tuvo como resultado una disminución en la ganancia de peso en el grupo TFA. Al final del estudio los controles habían aumentado su peso en  $124.40 \pm 7.74$  g, las ratas TFD en  $142.90 \pm 5.36$  g y las TFA en  $97 \pm 1.3$  g, que representó +7% para el grupo TFD y -10% para el grupo TFA comparados con el grupo control. El ANOVA indicó una diferencia significativa entre grupos ( $F_{(2,29)} = 12.41$ ;  $p < 0.0001$ ) y la prueba post hoc indicó que el grupo TFA fue significativamente diferente del grupo control y TFD ( $P < 0.03$ ).

**TABLA 2.** Promedio de peso corporal ganado por semana, para las ratas mantenidas sin interrumpir (control), o las expuestas a la actividad forzada por 8 horas diarias.

	Basal	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Ganancia de peso
<b>CONTROL</b>	198 ± 2.2	228 ± 2.1	256 ± 1.1	289 ± 1.3	320 ± 3.1	124 ± 7.7
<b>TFD</b>	196 ± 2.6	232 ± 3.2	251 ± 3.6	299 ± 1.6 <sup>++</sup>	340 ± 2.7 <sup>++</sup>	142 ± 5.3
<b>TFA</b>	193 ± 1.4	220 ± 1.1	248 ± 2.1	277 ± 1.5 <sup>*</sup>	290 ± 2.6 <sup>*</sup>	97 ± 1.3

\* Indica diferencias estadística significativas de los grupos TFD y TFA con el grupo Control; + indica diferencias significativas entre el grupo TFD y el grupo TFA.

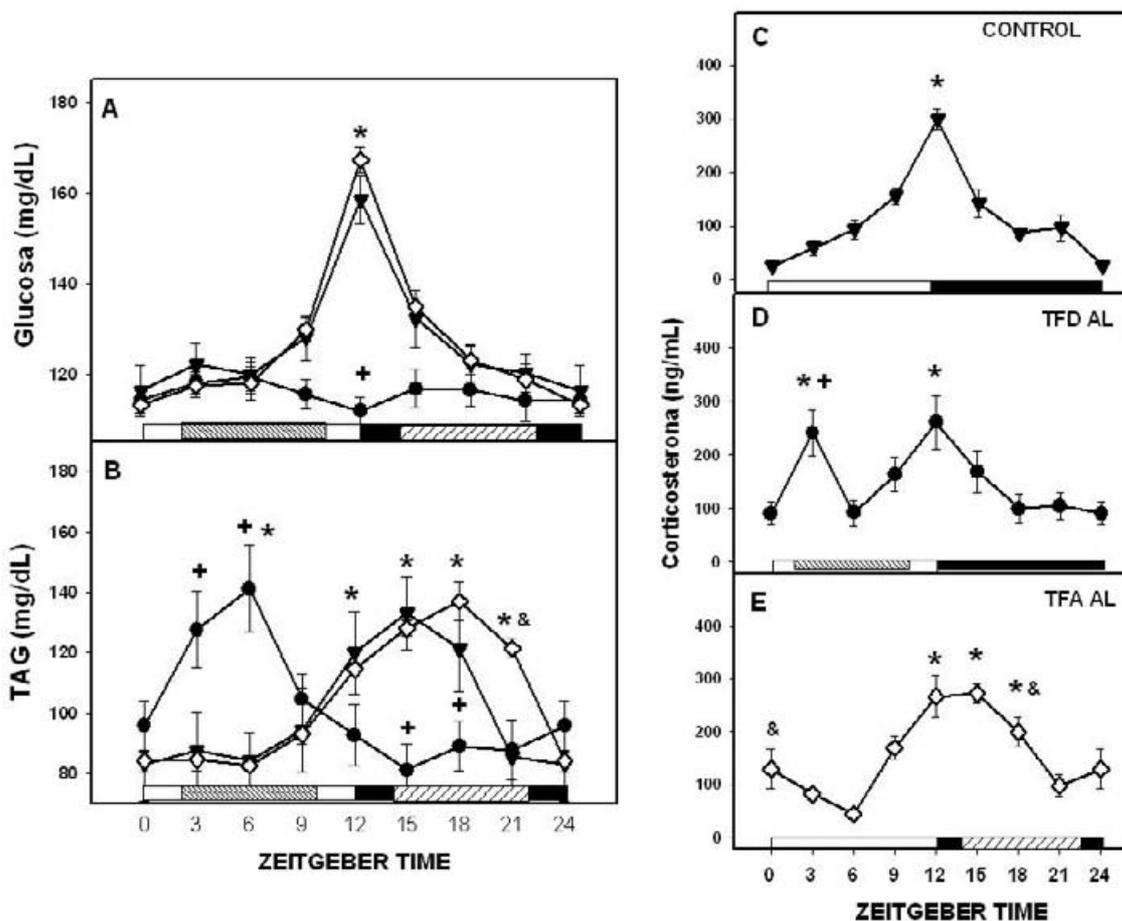
### RITMOS METABÓLICOS Y HORMONALES

Para determinar los ritmos de glucosa, TAG, y corticosterona, dos series adicionales de ratas (el grupo control n=10; TFD n=10 y TFA n=8) fueron expuestas al mismo protocolo de actividad forzada y en la semana 5 de trabajo, se colectaron las muestras de sangre a través de la vena yugular con una cánula cada 3 hrs. hasta completar un ciclo de 24hrs.

Las ratas control y TFA exhibieron un ritmo diario de glucosa con un pico durante la transición de la fase de luz a la fase de oscuridad, mientras que en las ratas TFD no se observó ritmicidad. (Fig.22; A). El ANOVA de dos vías, no indicó diferencia significativa entre grupos ( $F_{(2,28)} = 2.62$ ;  $P < N/S$ ), pero confirmó una diferencia significativa en el tiempo ( $F_{(7,196)} = 19.03$ ;  $P < 0.0001$ ) y para la interacción de ambos factores ( $F_{(14,196)} = 8.15$ ;  $P < 0.0001$ ).

Las ratas control mostraron un ritmo diurno de TAG sérico con un pico en ZT15, 3 horas después de comienzo de actividad. En las ratas TFD la acrofase cambió a la fase de luz, ahora en ZT6, que corresponde a 4 horas después colocar a las ratas en la rueda de actividad (Fig.22; B). En contraste el grupo TFA mostró un ritmo diario de TAG en la fase oscura con un cambio hacia ZT18, que también correspondió a 4 hrs. después del comienzo de la actividad en la rueda. El ANOVA de dos vías no indicó diferencia significativa entre grupos ( $F_{(2,15)} = 0,008$ ,  $P < N/S$ ), pero confirmó una diferencia significativa en el tiempo ( $F_{(7,105)} = 3.15$ ;  $P < 0.01$ ) y en la interacción de ambos factores ( $F_{(14,105)} = 3.32$ ;  $P < 0.001$ ).

El grupo control y los grupos de actividad forzada (TFD y TFA) exhibieron el aumento diario esperado para corticosterona el cual se presenta al inicio de la noche. Además en ambos grupos de ratas trabajadoras, TFD y TFA, se observó un incremento de corticosterona al comienzo de la actividad en la rueda, teniendo como resultado un patrón diario modificado (Fig.22; C,D,E). El ANOVA de dos vías no indicó diferencias significativas entre grupos ( $F_{(2,20)} = 1.64$ ;  $P < N/S$ ), pero confirmó una diferencia significativa en el tiempo ( $F_{(7,140)} = 33.50$ ;  $P < 0.0001$ ) y en la interacción de ambos factores ( $F_{(14,140)} = 7.81$ ;  $P < 0.001$ ). Tal diferencia estadística puede deberse al aumento adicional durante las horas de trabajo (Fig.22; E).

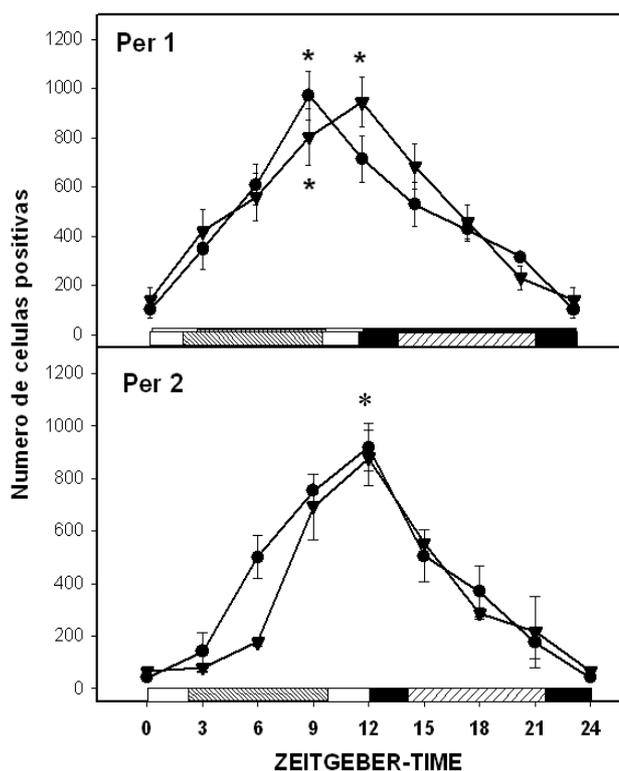


**Figura 22. Perfil temporal (medias  $\pm$  SEM), para glucosa (A), TAG (B) y Corticosterona (C,D,E). Ritmos metabólicos y hormonales posteriores a 4 semanas de trabajo en ratas control (Triangulos invertidos, n=10), ratas TFD (Circulos, n=10) y ratas TFA (diamantes, n=8). Las barras blancas y negras representan el ciclo LD, las barras con rayas diagonales representan el tiempo de actividad en la rueda. Asteriscos indican diferencia estadística entre los valores altos y bajos del mismo grupo (+) indica diferencias estadísticas entre puntos temporales equivalentes entre los TFD y los otros dos grupos; (&) indican diferencias estadísticas entre puntos temporales equivalentes entre TFA y los otros dos grupos ( $P < 0.01$ ).**

## INMUNOHISTOQUIMICA PARA PER 1 Y PER 2

Para determinar la expresión temporal de PER1 y PER2 en el NSQ, un grupo diferente de ratas control y TFD (n=32 por grupo), que experimentaron las mismas condiciones descritas arriba, fueron perfundidas al final de la 5<sup>th</sup> semana de trabajo en uno de 8 puntos temporales para completar un ciclo de 24 hrs. Debido a que no observamos cambios en la conducta y metabolismo en el grupo TFA, este grupo no se incluyó en esta fase.

El grupo control y TFD mostraron un ritmo claro en la expresión de la proteína PER1 y PER2 en el NSQ. El grupo control mostró en ambas proteínas, valores máximos en ZT12 (Fig.23). En el grupo TFD, el pico de PER1 fue observado en ZT9 y el pico de PER2 en ZT12, sin embargo el ANOVA de dos vías no indicó diferencia estadística entre grupos, ni en la interacción de grupo X tiempo; pero indicó un efecto estadístico en el tiempo para ambos grupos ( $F_{(7,42)} = 7.23$ ;  $p < 0.001$  para PER1 y  $F_{(7,16)} = 57.38$ ;  $p < 0.0001$  para PER2).



**Figura 23. Perfil temporal (medias ± SEM), de células positivas para la proteína PER 1 y PER 2 en el NSQ de ratas control (Triángulos invertidos, n=32 por grupo) y TFD (Círculos negros, n=32 por grupo). El asterisco indica diferencia estadística entre valores altos y los bajos del mismo grupo ( $P < 0.05$ ).**

## DISCUSION

En esta etapa del estudio proporcionamos evidencia de que la actividad forzada durante las horas de descanso (TFD) altera no sólo la conducta sino también los patrones temporales de consumo de alimento y oscilaciones metabólicas.

En las ratas TFD la ingesta de alimento se desplazó hacia las horas de actividad forzada, y que la actividad nocturna disminuyó progresivamente. Este efecto no se debió al agotamiento físico, ya que este patrón de actividad también se observó durante los fines de semana, cuando las ratas permanecieron inalteradas en sus cajas, y además no fue observado en las ratas obligadas a moverse durante su fase de actividad (TFA). Asociado con la modificación de los patrones de alimentación las ratas TFD presentaron una pérdida de los ritmos de glucosa y los ritmos de triacilglicéridos se observaron invertidos con respecto a su control. En contraste, el aumento de la corticosterona nocturna y los picos de expresión de los genes reloj PER1 y PER2 en el NSQ se mantuvieron sincronizados al ciclo L/O. Estas observaciones indican que en los animales sometidos a un régimen de trabajo durante su período de sueño se induce una desincronización interna en el que la alimentación y las funciones metabólicas se desvinculan del mensaje del reloj biológico

En ratas TFD los patrones de actividad diaria se caracterizan por la reducción en la actividad nocturna, manteniéndose esta reducción durante los fines de semana, cuando quedan inalteradas en su caja. También con otras manipulaciones en las que los animales se ven obligados a estar activos durante el día con una rueda de actividad, se observa una reducción de la actividad nocturna similar a la descrita por nosotros (Mrosovsky, 1996; Hut y col., 1999; Mistlberger, 1994). La persistencia de este efecto durante los fines de semana confirma que los efectores están desacoplados de la transmisión de señales horarias por el SNC y que 2 días de fin de semana no son suficientes para recuperar y reajustar su ritmicidad. Esa perturbación confirma lo que sucede en humanos, ya que los trabajadores nocturnos no pueden reajustar su actividad a las señales horarias del ciclo L/O en tan solo 2 días.

Aunque la ingestión diaria total de alimento fue similar en todos los grupos, las ratas TFD, presentaban un aumento en su peso corporal en mayor proporción que los controles, mientras que las ratas TFA se mantuvieron con un menor peso corporal que

los controles. Un factor que influye en esta propensión puede ser una disminución de la actividad en las ratas TFD, mientras que la actividad aumentó en el grupo TFA. Este factor junto con la alimentación en el momento equivocado, fuera de fase con las señales del NSQ, podría haber fomentado el aumento de peso corporal. Una perturbación similar y propensión para el sobrepeso se ha descrito en los trabajadores nocturnos y rotatorios (Karlsson, y col., 2001, Karlsson, y col. 2005) y alteraciones en los patrones de sueño en humanos también se ha vinculado a una propensión a la obesidad (Pearson, 2006; Gangwisch y col., 2005).

Un estudio reciente informó que las ratas expuestas a cambios regulares del ciclo L/O aumentan su peso corporal (Tsai y col., 2005); sin embargo, a largo plazo, el ejercicio diario en combinación con los cambios del ciclo L/O invierte esta ganancia de peso (Tsai y Tsai, 2007). En el trabajo de Tsai-Tsai, los animales se vieron obligados a realizar ejercicio en una rueda durante 12 h diarias, cubriendo una distancia de 2,2 km. En nuestro estudio, las ratas no estaban sometidas a un ejercicio extenso, la rotación de las ruedas usadas era lenta ocasionando que las ratas sólo caminaran 20,6 m/h con un total de 165 m / 8 h.

Las ratas TFD no mostraron un ritmo diurno de glucosa, además que se observó un cambio en los ritmos de triacilglicéridos (TAG) ahora presentados en el día. El ritmo de glucosa en la sangre depende del NSQ (La Fleur y col., 2001), pero este puede ser alterado por una privación de sueño aguda (Knutsson y col., 2007; Simon y col., 2000; Van Cauter y col., 2007) y modificado por los horarios de alimentación (Escobar y col., 1998). Dado que se observó una alteración en la ritmicidad en las ratas TFD, podemos asumir que el cambio de actividad está asociado con una redistribución o perturbación de los patrones de sueño. Por otro lado el pico de secreción de la hormona de crecimiento está directamente relacionados con la fase del sueño y está bien documentado que la privación aguda de sueño se traduce en una perturbación o incluso pérdida completa de los picos nocturnos de hormona de crecimiento (Brandenberger y Weibel, 2004), lo cual pudo influir en la captación de glucosa por el músculo y la síntesis de proteína (Moller y col., 1989). Otras hormonas como la grelina, leptina, prolactina y corticosterona también pudieron influir en el estado metabólico y la absorción de glucosa por las células (Simon y col. 2000), ya que la privación de sueño suprime la ritmicidad y disminuye los niveles de hormonas pancreáticas (Schmid y col., 2007), de leptina, prolactina y hormona de crecimiento, pero no de corticosterona

(Everson y Crowley, 2004). Por lo tanto, la pérdida en el ritmo de glucosa en las ratas TFD puede tener una causa multifactorial que debe ser estudiado más a fondo.

El patrón invertido de TAG observado en las ratas TFD se debe probablemente a la ingesta diurna de alimentos en la rutina de trabajo. En los tres grupos el pico de TAG se observó 3-4 h después del inicio de actividad, que para los grupos TFD y TFA representa la introducción de las ratas a la rueda, y en el grupo control, representa el inicio de la fase oscura, esto sugiere que para los tres grupos el pico de TAG siguió a la aparición de la conducta de alimentación. Las presentes observaciones encontraron apoyo en estudios de trabajadores humanos, en donde el pico de TAG se observan de manera postprandial 3-4 horas después de una comida (Ribeiro y col. 1998). Además, algunos estudios reportan aumento de las concentraciones de TAG durante los turnos de trabajo, sin embargo este hallazgo no es coherente en todos los estudios (Boggild y Knutsson, 1999).

Los ritmos metabólicos y el aumento de corticosterona nocturna no fueron modificados por la actividad forzada durante la fase de sueño. El ritmo diario de corticosterona depende del NSQ (Buijs y col., 2003) sin embargo con horarios restringido de alimento, las ratas muestran un pico de corticosterona que anticipa al tiempo de la comida y restaura la ritmicidad en ratas con lesiones bilaterales del NSQ (Krieger y Herbert, 1978). Los datos reportados aquí indican que, a pesar de la actividad forzada y la alimentación diurna el ritmo de corticosterona permaneció fijo a las señales temporales transmitidas por el NSQ y al ciclo L/O.

Teniendo en cuenta que las ratas comieron principalmente durante sus horas "de trabajo", el aumento de corticosterona observado cuando las ratas fueron introducidas a las ruedas podría estar relacionado a una conducta de anticipación al alimento. El hecho de que niveles altos de corticosterona en este momento no se asocien con un aumento en la glucosa, parecería sorprendente, sin embargo, se sabe que con otros estímulos que elevan la corticosterona tampoco se observa un aumento de la glucosa (Kalsbeek y col. 2004).

Las pautas temporales de las proteínas PER1 y PER2 en ratas TFD confirmaron que la actividad del NSQ permaneció sincronizada con el ciclo L/O, que es la principal señal de sincronización. Similarmente el acceso restringido a una rueda de actividad (Dallmann y Mrosovsky, 2006), la administración de anfetaminas (Masubuchi y col.,

2000) y horarios restringidos de alimento (Hara y col., 2001; Wakamatsu y col 2001) modifica los patrones temporales de la actividad, ritmos metabólicos y periféricos, pero no cambian la ritmicidad del NSQ, que se queda sincronizado al ciclo L/O.

Debido a que el alimento ha mostrado ser una fuerte señal sincronizadora que desacopla a los osciladores periféricos del NSQ (Damiola, y col. 2000., Hara, y col. 2001, Stokkan, y col. 2001), podemos sugerir que el factor principal que promueve la desincronización interna en nuestro modelo del trabajo nocturno es la combinación de la actividad y la alimentación durante la fase de sueño y la resistencia del NSQ a cambiar y que permanece sincronizado al ciclo L/O. Este aspecto se estudió en la etapa 3.

En conclusión, el presente estudio demuestra que la exposición diaria a una rueda de actividad forzada durante la fase de descanso es un buen modelo para estudiar los mecanismos subyacentes a la desincronización interna en trabajadores nocturnos y con trabajo rotatorio. Con este modelo se pudo determinar que la desincronización se da principalmente por una pérdida de acoplamiento entre el NSQ y sus efectores asociados con la conducta y el metabolismo.

## **ETAPA 2**

### **ANÁLISIS INMUNOCITOQUÍMICO DE NÚCLEOS HIPOTALÁMICOS IMPLICADOS EN EL METABOLISMO Y LA VIGILIA, EN ANIMALES SOMETIDOS A TRABAJO DURANTE SU FASE DE DESCANSO.**

En esta etapa, nos propusimos determinar el origen de la desincronización observada en los ritmos metabólicos y conductuales. Para ello nos preguntamos si los núcleos hipotalámicos implicados en el metabolismo como el DMH, PVN, ARQ, PVT y en mantener la vigilia como el HL y PeF están alterados por la actividad forzada durante la fase de descanso, promoviendo la desincronización interna desde un nivel central. Para esto, caracterizamos los ritmos diurnos de la inmunoreactividad de c-Fos como marcador de actividad neuronal y de la proteína PER1 como marcador de ritmicidad.

#### **OBJETIVOS**

- Determinar el efecto del trabajo nocturno, utilizando el modelo de actividad forzada, sobre diferentes ritmos de estructuras hipotalámicas.
- Caracterizar el origen de la desincronización interna comparando el ritmo del NSQ con sus efectores hipotalámicos.

#### **HIPOTESIS**

- El “trabajo nocturno” en ratas producirá una desincronización en la expresión de c-Fos y PER1 en núcleos hipotalámicos relacionados con el metabolismo y la vigilia
- La actividad forzada durante la fase de descanso, provocara que el NSQ pierda su relación de fase con sus efectores.

#### **MATERIALES Y METODOS**

##### **ANIMALES Y DISEÑO EXPERIMENTAL**

Las ratas utilizadas se mantuvieron con las mismas condiciones a las descritas en la pagina 34.

En esta etapa, se utilizaron 2 grupos;

**Grupo control:** Se mantuvo en registro conductual en el cuarto de registro sin manipulación durante 5 semanas, con alimento y agua *ad libitum*. (C-AL).

**Grupo experimental** se siguió el protocolo de trabajo durante la fase de descanso (T-AL) idéntico al descrito en la pagina 41. (Fig.17).

#### **INMUNOHISTOQUIMICA PARA PER 1 Y C-FOS**

Después de 5 semanas, durante los últimos dos días de trabajo, los animales se perfundieron cada 3 horas (n=5 por punto temporal) para completar un ciclo de 24 horas. Esta manipulación se realizó de manera idéntica a la descrita en la metodología de la etapa 1 (Pagina 42-43).

#### **DOBLEINMUNO PARA C-FOS Y OREXINA A**

Una serie de cortes, se incubaron por 72 horas a 4°C con un anticuerpo para la proteína c-FOS hecho en conejo (Alpha Diagnostic International) diluido 1:2500 en SuperMix (0.25 % de gelatina, 0.5 % de triton X-100 en PBS pH 7.6), y un anticuerpo primario para Orexina A hecho en cabra (Santa Cruz biotechnology, USA) diluido 1:2500 en SuperMix.

Después de dos días de incubación las secciones se lavaron 3 veces por 10 minutos en PBS, y posteriormente se incubaron por 2h con un anticuerpo secundario biotinilado 1:200 (Anti-conejo hecho en cabra; Vector laboratorios) en SuperMix. Al finalizar las dos hrs. de incubación se lavaron 3 veces por 10 minutos en PBS y los cortes se incubaron en una solución de avidina-biotina peroxidasa al 0.9% (Vectastain Elite ABC Kit; vector Labs, USA) por 2 horas a 4°C.

Al finalizar la incubación, los cortes se lavaron 3 veces por 10 minutos en PBS y al finalizar el ultimo lavado, se visualizaron con diaminobenzidina (0.5 mg/ml, en buffer de trizma a pH 7.2), con 100 µl de níquel (50 mg en 5ml de H<sub>2</sub>O), 100 µl de cobalto (50 mg en 5ml de H<sub>2</sub>O) y peroxido de hidrógeno al 30% (35 µl/100 ml), dando un color negro azulado.

Al finalizar el revelado de la proteína c-Fos se inició el revelado para orexinas. Las secciones se lavaron 3 veces por 10 minutos en PBS y se incubaron por 2 horas con un anticuerpo secundario biotinilado 1:200 (Anti-cabra hecho en conejo; Vector laboratorios) en SuperMix. Al finalizar las dos horas de incubación se lavaron 3 veces

por 10 minutos en PBS y los cortes se incubaron por segunda vez en una solución de avidina-biotina peroxidasa al 0.9% (Vectastain Elite ABC Kit; vector Labs, USA) por 2 horas a 4°C. Posteriormente se revelaron con diaminobenzidina (0.5 mg/ml, en buffer de trizma 7.2) y peróxido de hidrógeno al 30% (35 µl/100 ml), que dio un color citoplásmico café.

Al finalizar el segundo revelado, se lavaron los cortes 3 veces por 5 minutos y cada corte fue montado en láminas (porta-objetos) gelatinizadas y deshidratadas en una serie de alcoholes y aclaradas con xilol para posteriormente ser cubiertas con cubreobjetos y Permount (Fisher Chemicals).

### CONTEO CELULAR

Para cuantificar la expresión de c-FOS y PER1 en el ARQ, NSQ, PVN, PVT, DMH, y exclusivamente c\_Fos en el HL y PeF. Se escogieron 3 secciones representativas de cada núcleo de acuerdo con el atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (1998) como se indica en la tabla 3.

**TABLA 3.** Niveles en el plano antero-posterior de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson (1998), de los que se seleccionaron las secciones para analizar la expresión de la proteína c-Fos y Per1.

ESTRUCTURA	Secc. anterior	Secc. medial	Secc.posterior
ARQ	2.12	2.56	3.14
DMH	2.8	3.14	3.30
HL y PeF	2.8	3.14	3.40
NSQ	0.92	1.20	1.40
PVN	1.6	1.88	2.12
PVT	1.80	1.88	2.12

Las imágenes fueron examinadas bajo un microscopio de luz (Nikon Eclipse E600; Nikon, Tokio, Japón) y capturadas a una ampliación 20X y se utilizó un sistema computarizado de análisis de imágenes para digitalizar imágenes y evaluar el número de células inmunopositivas a cada anticuerpo (Image-Pro, Plus. 5.1)..

Los núcleos inmunoreactivos fueron contados bilateralmente por un observador que fue ciego a las condiciones experimentales. Para evitar el número de falsos positivos, se determinó en una región cercana que carece de PER1 o c-FOS la densidad óptica del fondo. Las células marcadas que alcanzaron o superaron dos veces la densidad óptica del fondo fueron contadas, mientras las células por debajo de este umbral fueron descartadas. La media de los valores se representa con curvas temporales y se compararon con un ANOVA de dos vías para los factores grupo y tiempo.

## **RESULTADOS**

### **EXPRESIÓN DE C-FOS**

En las ratas Control, el ARQ, el LH y el PeF presentaron su acrofase justo en el momento de apagarse la luz que corresponde a ZT12 (Fig. 24); el DMH, y el PVN no mostraron un ritmo diurno en la inmunoreactividad de la proteína c-Fos (Fig. 25).

Además, el ritmo diurno de la proteína c-Fos en el NSQ mostró su acrofase a la mitad del ciclo L/O en ZT6. (Fig. 26)

En los núcleos del hipotálamo; ARQ, PeF y HL de los animales sometidos a actividad durante su etapa de descanso (T-AL), mostraron un adelanto de fase en la expresión de c-Fos en comparación con los animales control (Fig.24).

El núcleo arqueado ARQ, mostró su acrofase en ZT6, y su nadir en ZT18, nótese que el valor máximo ahora se encontró asociado al tiempo en que los animales estaban activos y comiendo en la rueda de actividad. El ANOVA de dos vías, indicó una diferencia en el tiempo ( $F(3,8)=0.64$ ;  $P<0.04$ ) pero no confirmó una diferencia entre grupos ( $F(1,8)=0.18$ ; N/S), ni en la interacción del grupo con el tiempo. ( $F(3,8)=2.63$ ; N/S).

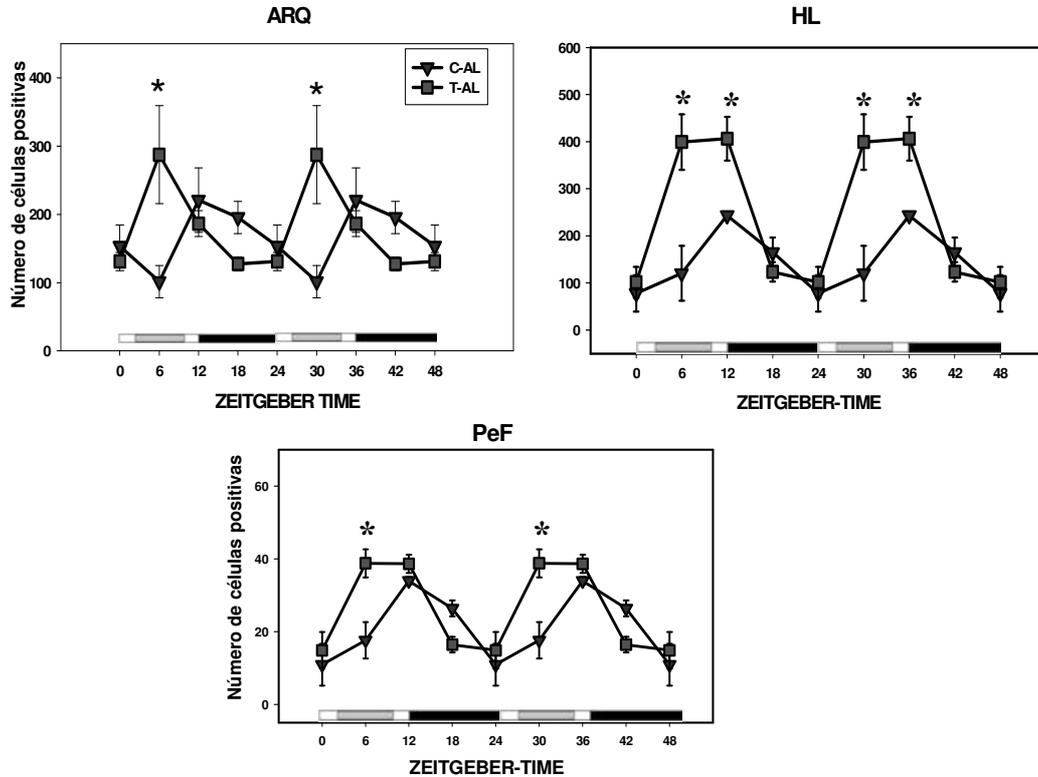
El HL en el grupo T-AL mostró mayor amplitud que los controles (Fig. 24), mostrando valores altos en ZT6 y ZT12 ( $P < 0.001$ ), y valores bajos similares al control en ZT0 y ZT18. El ANOVA de dos vías, confirmó una diferencia entre grupos ( $F(1,8)=6.85$ ;  $P < 0.03$ ), además de una diferencia en el tiempo ( $F(3,8)=6.99$ ;  $P < 0.01$ ) pero no una diferencia en la interacción de ambos factores. ( $F(3,8)=3.13$ ; N/S).

El PeF también mostró valores elevados en ZT6 y ZT12 ( $P < 0.001$ ) y valores bajos en ZT0. El ANOVA de dos vías, no indicó una diferencia entre grupos ( $F(1,8)=0.18$ ; N/S), pero si una diferencia en el tiempo ( $F(3,8)=3.73$ ;  $P < 0.04$ ) y no diferencia en la interacción de ambos factores. ( $F(3,8)=2.99$ ; N/S).

El DMH, mostró un ritmo en la inmunoreactividad de c-Fos el cual fue impuesto por la manipulación ejercida al grupo T-AL ya que no se observa en el control. El ritmo del PVN no se modificó con la manipulación de los animales ya que no se observa un ritmo, al igual que los animales control (Fig.25). Por otro lado el ritmo de la proteína c-Fos en el NSQ no se vió alterado, pero se observó un efecto en la amplitud del ritmo ya que hubo una reducción en la actividad del NSQ (Fig.26).

El DMH que en condiciones *ad libitum* no mostró un ritmo claro durante las 24 hrs. (Figura. 25), en las ratas T-AL mostró un patrón rítmico claro, presentando su acrofase en ZT6 y su nadir en ZT18, nótese que el valor máximo se encuentra asociado al tiempo en que los animales están despiertos y comiendo en la rueda de actividad. El ANOVA de dos vías confirmó una diferencia significativa, entre grupos ( $F(1,8)=6.40$ ;  $P < 0.03$ ) pero no en la interacción del trabajo con el tiempo. ( $F(3,8)=6.91$ ;  $p < 0.03$ ).

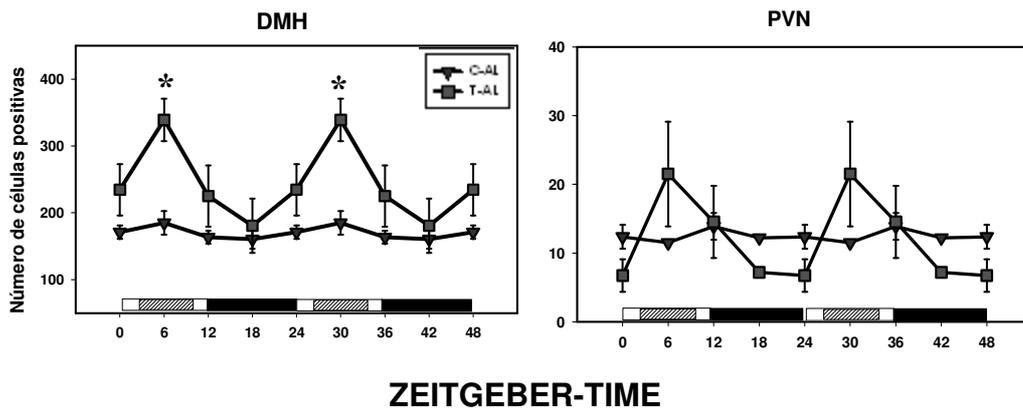
## C-FOS



**Figura 24.** Patrones temporales para células Fos-IR en estructuras hipotalámicas de ratas control (C-AL) y de ratas sometidas a trabajo durante su etapa de descanso (T-AL). Un adelanto de fase asociado al tiempo de trabajo, se puede observar en todas las estructuras en las ratas T-AL. Las barras blancas y negras representan el ciclo luz/oscuridad y la barra gris dentro de la blanca, la hora en que las ratas trabajaban en la rueda. Los \* representan una diferencia significativa entre el grupo C-AL y T-AL obtenida con la prueba de Tukey post hoc ( $P < 0.03$ ). Arq; núcleo arqueado, HL; hipotálamo lateral y PeF; núcleo perifornical.

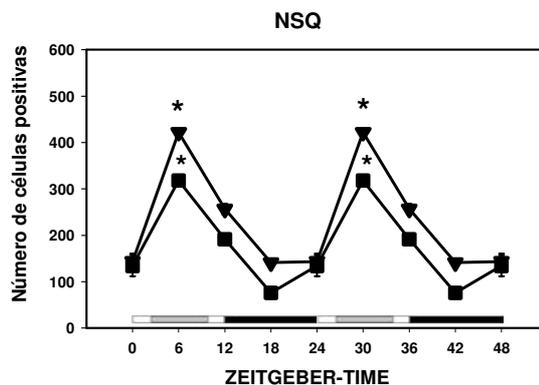
De igual manera, el PVN no mostró cambios significativos en las ratas T-AL en todos los puntos temporales analizados, aunque existe una clara tendencia de ritmicidad con su acrofase asociada al inicio de la actividad en la rueda. (Fig.25). El ANOVA de dos vías no mostró una diferencia significativa, ni entre grupos ( $F(1,8)=0.45$ ; N/S) ni en la interacción del trabajo con el tiempo. ( $F(3,8)=0.30$ ; N/S).

## C-FOS



**Figura 25.** Patrones temporales para células Fos-IR en estructuras hipotalámicas en ratas control (C-AL) y en ratas sometidas a trabajo durante su etapa de descanso (T-AL). Se puede observar un ritmo claro en la actividad de ambos núcleos hipotalámicas, el cual es inducido por el trabajo nocturno. Las barras blancas y negras representan el ciclo luz/oscuridad y la barra gris dentro de la blanca la hora en que las ratas trabajaban en la rueda. Los \* representan una diferencia significativa entre el grupo C-AL y T-AL obtenida con la prueba de Tukey post hoc ( $P < 0.03$ ). DMH; núcleo dorsomedial del hipotálamo, PVN; núcleo paraventricular del hipotálamo.

En el NSQ no se observaron diferencias significativas en los tiempos de la acrofase y valle en ambos grupos, mostrando un ritmo claro con su pico en ZT6 y valle en ZT18. Sin embargo, el número de células inmunoreactivas de c-Fos en el NSQ del grupo T-AL disminuyó significativamente en todos los puntos temporales, lo que nos sugiere que el NSQ se encuentra tónicamente inhibido en el grupo T-AL (Fig 26). El ANOVA de dos vías mostró una diferencia significativa, entre grupos ( $F(1,8)=16.94$ ;  $P < 0.003$ ) pero no en el tiempo ( $F(3,8)=3.53$ ; N/S), ni en la interacción del trabajo con el tiempo ( $F(3,8)=0.04$ ; N/S).

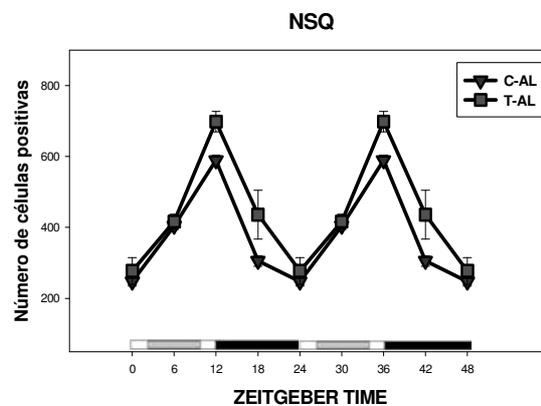


**Figura 26.** Patrones temporales para células Fos-IR en el núcleo supraquiasmático de ratas control (C-AL) y en ratas sometidas a trabajo durante su etapa de descanso (T-AL). El grupo T-AL muestra una ligera inhibición en su actividad. Los \* representan una diferencia significativa entre el grupo C-AL y T-AL; post hoc ( $P < 0.03$ ). Mas detalles ver Fig.25.

## EXPRESIÓN DE PER1

En las ratas control, el ritmo diurno de PER 1 se observó en varios núcleos hipotalámico; NSQ, DMH, ARQ, PVN y PVT, sin embargo en el HL y en el PeF no se observó la expresión de Per1 a ninguna hora.

Como ya se ha descrito, el NSQ mostró su acrofase justo en el momento de apagarse la luz, lo cual equivale a ZT12. El grupo T-AL no modificó este ritmo presentándose idéntico al grupo control (Fig.27). El ANOVA de dos vías no indicó diferencias significativas entre grupos ( $F(1,13)= 1.28$ ; N/S), pero si en el tiempo ( $F(3,13)=33.83$ ;  $P<0.001$ ), pero no en la interacción ambos factores ( $F(3,13)=1.07$ ; N/S).

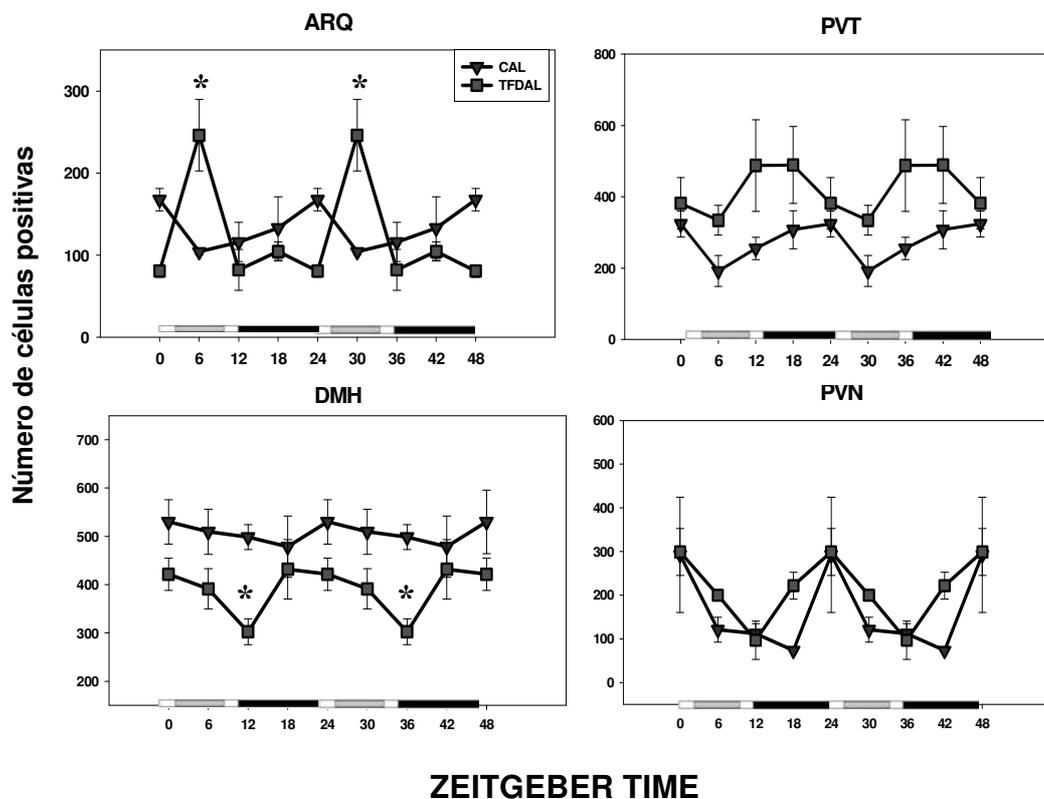


**Figura 27.** Patrones temporales para células inmuno positivas a PER1 en el núcleo supraquiasmático de ratas control (CAL) y en ratas sometidas a trabajo durante su etapa de descanso (T-AL). No existen diferencias ni en el ritmo ni en la amplitud entre ambos grupos. Mas detalles ver Fig.23.

En el grupo control el ARQ, el PVN y el PVT presentaron su acrofase justo en el momento de encenderse la luz; mientras el DMH no mostró un ritmo diurno en la inmunoreactividad de la proteína PER1. (Fig.28).

El trabajo durante la fase de descanso ocasionó cambios de fase en el ARQ y el PVT, presentando ahora sus picos de actividad durante las horas de trabajo que es cuando las ratas estaban activas y alimentándose. Para el ARQ el ANOVA de dos vías indicó diferencias significativas entre grupos ( $F(1,8)=12.8$ ;  $P<0.01$ ), un efecto significativo en el tiempo ( $F(3,8)=2.27$ ;  $P<0.01$ ) pero no en la interacción de ambos factores. ( $F(3,8)=0.89$ ; N/S). Para el PVT el análisis estadístico indicó una diferencia significativa entre grupos ( $F(1,12)=6.44$ ;  $P<0.02$ ), pero no en el tiempo ( $F(3,12)=0.92$ ; N/S) ni en la interacción del grupo por tiempo ( $F(3,12)=0.39$ ; N/S).

## PER 1



**Figura 28.** Patrones temporales de células inmunopositivas a PER 1 en estructuras hipotalámicas de ratas control (C-AL) y de ratas sometidas a trabajo durante su etapa de descanso (T-AL). Un adelanto de fase asociado al tiempo de trabajo, se puede observar en el ARQ y el PVT. El ritmo de PER1 en el DMH es inducido por el trabajo nocturno y el PVN es la única estructura que no muestra una modificación para PER 1. Las barras blancas y negras representan el ciclo luz/oscuridad y la barra gris dentro de la blanca, la hora en que las ratas trabajaban en la rueda. Los \* representan una diferencia significativa entre el grupo C-AL y T-AL obtenida con la prueba de Tukey post hoc ( $P < 0.03$ ). Arq; núcleo arqueado, PVT; núcleo paraventricular talámico, DMH; Núcleo dorsomedial del hipotálamo y PVN; núcleo paraventricular del hipotálamo.

En el DMH no se observó una expresión rítmica de la proteína PER1 en el grupo control (Fig.28), sin embargo el grupo T-AL indujo el ritmo de la proteína PER1 con un pico en ZT18 (8h después de que se regresan a sus cajas), aunque con valores más bajos que los mostrados a lo largo del día por el control. El análisis estadístico indicó diferencia significativa entre grupos ( $F(1,10)=2.56$ ;  $P < 0.0001$ ), pero no un efecto significativo en el tiempo ( $F(3,10)=0.18$ ; N/S) ni en la interacción de ambos factores ( $F(3,10)=0.16$ ; N/S).

Finalmente, en el PVN el grupo control mostró un patrón diurno en la expresión de la proteína PER1, con un pico en ZT0, el cual no se modificó con la rutina de trabajo (Fig.28). El análisis estadístico no indicó diferencias significativas entre grupos ( $F(1,9)=1.12$ ; N/S), ni un efecto significativo en el tiempo ( $F(3,9)=2.57$ ; N/S) ni en la interacción del grupo y tiempo ( $F(3,9)=0.52$ ; N/S).

## DISCUSIÓN

En esta etapa del estudio proporcionamos evidencia de que la actividad forzada y el consumo de alimento durante las horas de descanso alteran no sólo la conducta sino también los patrones rítmicos y de activación neuronal de varios núcleos hipotalámicos involucrados en el metabolismo y la conducta. Esto pudiera ser la causa probable de la desincronización interna bajo el régimen de trabajo nocturno.

En las ratas T-AL los núcleos hipotalámicos relacionados con la regulación metabólica como ARQ, DMH y PVN, así como aquellos asociados con el alertamiento e inicio de la actividad como el HL y el área PeF, mostraron un adelanto de fase, asociado al nuevo horario de actividad y alimentación. Por el contrario la actividad del NSQ disminuyó en todos los puntos temporales.

Patrones similares se observan en el ritmo de la proteína reloj PER 1 en los mismos núcleos hipotalámicos relacionados con la regulación metabólica y alertamiento, éstos mostraron un adelanto de fase asociado al inicio de la actividad para los núcleos ARQ, PVT, DMH y PVN, sin embargo el NSQ no mostró cambio en su ritmicidad. Lo que nos confirma una desincronización interna ya que los osciladores periféricos perdieron su relación de fase con el reloj biológico.

En la actualidad se conoce que una serie de estructuras en el sistema nervioso central (SNC), así como órganos en la periferia tienen la capacidad de oscilar tanto a nivel central como periférico y que estos osciladores se encuentran organizados de una manera jerárquica, en donde un reloj central mantiene al control de todos los demás osciladores circadianos con el fin de proveer un control rítmico de todas las funciones del organismo (Reppert y Weaver, 2002). El control rítmico de todos estos osciladores depende del reloj circadiano central o NSQ, que al transmitir a todo el organismo su señal de tiempo mantiene sincronizadas todas las funciones y la conducta para que oscilen con un orden de acuerdo a las fluctuaciones externas del día y la noche. Con ello

se mantiene un “orden temporal interno” que permite el buen funcionamiento del cuerpo.

El ser humano es esencialmente diurno, por lo tanto está preferentemente activo durante el día, tomando las horas de descanso durante la noche. Por lo tanto las señales temporales que sincronizan al reloj biológico del ser humano son muy variadas. Las más evidentes son claves periódicas (de 24 horas) del ambiente, de las cuales la principal es el ciclo de día/noche; sin embargo, también influyen sobre el reloj como sincronizadores, señales artificiales como la organización de horarios de trabajo, el esparcimiento, y otros compromisos sociales; así como la propia actividad física y cognitiva del individuo. Los horarios de comidas también son fuertes claves de tiempo para los osciladores cerebrales y periféricos debido a los cambios metabólicos producidas por la comida y necesarios para la síntesis de los neurotransmisores involucrados en la transmisión sináptica (Winget y col. 1984).

Al existir la presencia de una señal *no fótica fuerte* como el alimento, se sugiere la existencia de fuertes mecanismos de desacoplamiento interno del reloj hacia la hora en que se presenta el estímulo. Se ha visto que a nivel conductual, la exposición a la luz genera un cambio de fase en la actividad del animal, adelantándose la actividad hacia la hora en que se presenta el alimento. (Ángeles-Castellanos y col. 2007, 2008, Segall y col. 2008, Hara y col. 2001,). Esto se observa claramente en aquellos núcleos involucrados en la regulación metabólica como el ARQ, DMH, HL, PVN.

Este estudio confirma que el alimento provocar un avance de fase en varios osciladores periféricos asociados con el metabolismo. Varios estudios han encontrado un avance de fase en núcleos asociados al metabolismo y reforzamiento siempre asociado a la hora de alimentación (Angeles-castellanos y col. 2007, 2008, Segall y col. 2008, Hara y col. 2001, Stokkan y col. 2001, Stephan y col. 2001).

La diferencia es que solo les permiten el acceso al alimento por 2-3 horas en las cuales las ratas obtienen todo el alimento necesario.(Hara y col. 2001, Angeles-Castellanos y col. 2007), o algunos protocolos donde el alimento es hipocalórico (Challet y col. . 1998, Mendoza y col. 2007). Estas ratas bajo el protocolo de restricción en el acceso al alimento muestran una conducta anticipatoria, conocida como anticipación al alimento. (AA). Sin embargo las ratas T-AL muestran un cambio de fase en los núcleos

hipotalámicos asociados con el alimento, aunque el alimento está ad libitum (Salgado-Delgado y col. 2008).

El avance de fase observado en nuestros datos también puede estar relacionado con la actividad locomotora, ya que se sabe que los estímulos no luminosos como la actividad y el alimento, generan principalmente grandes avances de fase cuando se aplican durante el día circadiano, un tiempo en el cual el reloj no es sensible a la luz (Mrosovsky, 1995,1996). Por otro lado, a nivel molecular los estímulos no-fóticos producen una supresión de genes como *per*, a la hora en la cual los niveles de dicho gene son máximos, que como consecuencia puede traer un avance de fase de algunas estructuras, como las aquí observadas en ARQ y PVT, aunque el ritmo del reloj no se modifico (Maywood y col. 1999; Horikawa y 2000; Maywood y Mrosovsky, 2002).

Los mecanismos neuroanatómicos que subyacen a la sincronización no luminosa, no son del todo claros. Sin embargo, existe evidencia de que son mediados por las proyecciones que llegan directamente al NSQ, provenientes tanto de la hojuela intergeniculada lateral del talamo (HIL), a través del tracto genículo-hipotalámico, y de los núcleos del rafe y del PVT utilizando el glutamato como neurotransmisor (Meyer-Bernstein y Morin 1996; Mrosovsky 1996). Por ejemplo, las lesiones ya sea del HIL o de las vías serotoninérgicas hacia el NSQ bloquean los cambios de fase por estímulos no luminosos (Biello y col 1991; Wickland y Turek, 1994; Cutrera y col. 1994; Penev y col. 1995; Maywood y col. 1997).

El ritmo en la actividad del reloj medido con la proteína c-Fos, se observó ligeramente inhibido. Esto puede ser debido a que la exposición a la luz durante la noche circadiana incrementa la tasa de disparo de las neuronas del NSQ, así como la expresión de genes reloj (Aschoff y col. 1981) y esto es necesario para inhibir la actividad de la rata y que pueda descansar. En el caso de las ratas T-AL, la actividad forzada provocaría una inhibición en la actividad del NSQ, lo que a nivel conductual generaría un cambio de fase en la actividad del animal (Meijer 2001). Aunque el ritmo del NSQ no se ve afectado ya que el ciclo L/O no se modifico.

La evidencia aquí mostrada de que el alimento durante la noche puede fortalecer el ritmo de glucosa, así como evitar el cambio del ritmo de triacilglicéridos y temperatura sugiere que se deben considerar los horarios de alimentación para diseñar una estrategia

que permita restablecer la ritmicidad en los individuos sometidos a trabajo nocturno o jet lag.

Por lo tanto nuestros datos pudieran sugerir que la combinación de dos estímulos no fóticos como la actividad y el nuevo horario de alimentación sean señales fuertes para algunos osciladores periféricos que participan directa o indirectamente en el cambio de fase del ritmo y actividad neuronal, manteniéndose sincronizado el reloj con el ciclo L/O. Algunos trabajos apoyan esta hipótesis (Amir y col. 1999a; 1999b, Governale y col. 2001, Granados-Fuentes y col. 2004).

En conclusión, nuestros datos proporcionan otra pieza de información acerca de las estructuras involucradas o modificadas por el trabajo nocturno y el alimento. Por lo que sería relevante explorar con el presente modelo experimental el efecto único del alimento sobre los núcleos hipotalámicos y de la actividad durante su etapa de descanso.

### **ETAPA 3**

#### **EL ALIMENTO EN LA ETAPA DE DESCANSO, COMO POSIBLE CAUSA DE LA DESINCRONIZACION INTERNA**

En el tercer experimento, exploramos la influencia que tiene el alimento durante el trabajo como posible causa de la desincronización interna, observada en los animales sometidos al protocolo de trabajo nocturno.

#### **OBJETIVOS**

- Determinar el efecto de horarios restringidos de alimento sobre los ritmos circadianos metabólicos y conductuales en ratas sometidas al protocolo de trabajo nocturno.

#### **HIPOTESIS**

- La desincronización interna que se observa en los trabajadores nocturnos se debe a la alimentación durante el trabajo.
- El alimento durante la fase de reposo desacopla los osciladores periféricos del reloj biológico principal.
- El alimento durante la fase de reposo promueve el aumento de peso en el trabajador nocturno.
- Los horarios de alimento restringidos a la fase nocturna serán una buena estrategia para evitar el desacoplamiento de los osciladores periféricos en el modelo trabajo nocturno en ratas.

#### **MATERIALES Y METODOS**

##### **ANIMALES Y GRUPOS**

Las ratas utilizadas se mantuvieron con las mismas condiciones a las descritas en la pagina 38.

Para poder determinar la influencia del alimento en el trabajo nocturno, se dividieron las ratas en 2 grupos (control y experimental); tanto los controles como los grupos de

trabajo se dividieron a su vez en 3 grupos según las condiciones de alimentación (Tabla 4).

GRUPO	CONDICIONES DE ALIMENTACION	NOMBRE
Control	Sin trabajo + Ad libitum	C-AL
	Sin trabajo + Comen de día	C-CD
	Sin trabajo + Comen de noche	C-CN
Experimental	Trabajo + Ad libitum	T-AL
	Trabajo + Comen de día	T-CD
	Trabajo + Comen de Noche	T-CN

**Los grupos control:** Se mantuvieron en el cuarto de registro de conducta sin manipulación durante 5 semanas y sometidos a diferentes condiciones de alimentación. (Tabla 4):

C-AL: *alimento ad libitum*

C-CD: alimento solamente durante el día

C-CN: alimento solamente durante la noche

**Los grupos experimentales:** Los sujetos se dejaron en registro de línea base por una semana y se les sometió a la rutina de trabajo en la rueda de actividad forzada por 5 semanas con diferentes condiciones de alimentación (tabla 4):

T-AL: acceso *ad libitum* al alimento

T-CD: alimento únicamente durante el día

T-CN: alimento únicamente durante la noche.

#### PROTOCOLO DE TRABAJO

Los sujetos se dejaron en registro de línea base por una semana, en la segunda semana se inició la fase de trabajo. Para ello, se sacó a cada rata de su caja de registro y se colocó en una rueda de actividad cerrada y conectada a un motor que genera oscilaciones lentas y constantes (1 revolución / 2.5 minutos) obligándolas a moverse

(trabajar) 8 horas diarias durante la fase de luz (etapa de descanso) de 9 a.m. a 5 p.m. (ZT2. ZT10) de lunes a viernes. Este procedimiento se siguió por 4-5 semanas. Después de las 8 horas de trabajo los animales se regresaban a su caja de registro hasta el siguiente día.

Los fines de semana se mantuvieron sin manipulación dentro de sus cajas habitación de registro y los tres grupos con alimento ad libitum.

#### **MONITOREO DE PESO CORPORAL E INGESTA DE ALIMENTO**

Los animales se pesaron al inicio del estudio y una vez por semana durante la fase de trabajo, (jueves) siempre el mismo día y a la misma hora. El alimento se pesó 1 vez a la semana (viernes) a las 9 de la mañana para medir el consumo de alimento diario total.

#### **LA DETERMINACIÓN DE LOS RITMOS DE METABOLITOS METABÓLICOS**

Para obtener el suero, al final de la 4ª semana de trabajo a las ratas se les insertó una cánula en la vena yugular de la misma manera como se describió en la etapa 1. Durante la quinta semana de trabajo se obtuvieron muestras de sangre cada 3 horas para completar un ciclo de 24 horas, siguiendo la misma metodología que en la etapa 1.

La glucosa fue estimada por una muestra de 10- $\mu$ l usando un Kit comercial de colorimetría (No. 70478; Hycel de México), en el que se basó la reacción entre la glucosa y *fenol-4-amimofenazona* como cromógeno y fue medido a 500 nm, con un espectrofotómetro (Novaspec II Visible, Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge, England).

Los TAG fueron evaluados con un kit comercial (no. B01-4512-01, SERA-PAK plus, Bayer, Sees, Francia) por cuantificación a *4-aminoantipiridin* a 500 nm, lo que es proporcional al glicerol producido por hidrólisis enzimática de una muestra de 10- $\mu$ l.

#### **MONITOREO DE LA TEMPERATURA CORPORAL.**

Para determinar la temperatura corporal se utilizó otra serie de ratas que se asignaron a los grupos control y a las tres condiciones de trabajo (n=8 por grupo), con condiciones diferentes de alimentación (C-AL, C-CD, C-CN, T-AL, T-CD y T-CN).

Para monitorear la temperatura se utilizaron sensores colocados en el abdomen. Para insertar estos sensores después de la segunda semana de trabajo, los animales fueron anestesiados con una mezcla de anestésicos; Inoketam 1000 (Virbac 0,1 ml/100g) vía intraperitoneal y Xilazina (Procin 0.08 ml/100g ) vía intramuscular. Se realizó una

pequeña incisión en la cavidad abdominal, introduciendo un sensor para medir temperatura (iButton Sensor-Temperature Logger; Maxim Integrated Products, Dallas Semiconductor, USA) totalmente esterilizado. Se cerró la incisión en capas con hilo para suturar catgut 000. Las ratas se dejaron en recuperación durante el fin de semana y el siguiente lunes se retomó el protocolo de trabajo.

Los iButtons se programaron previamente para que guardaran datos de temperatura cada 20 minutos durante las 24 horas por el resto de la manipulación.

Al final de la manipulación, las ratas fueron anestesiadas con una sobredosis de pentobarbital sódico (Sedal-Vet 65 mg/ml), y perfundidas transcardialmente (ventrículo izquierdo) con 250 ml. de solución salina (0.9%), seguido por 250 ml de paraformaldehído al 4% en buffer fosfato (PBS, 0.1 M, pH 7.2) para obtener sus cerebros que se utilizaron para la etapa 2 de esta tesis; y se recuperaron los iButtons. Los datos de temperatura se vaciaron a una computadora para observar la distribución temporal de la temperatura día por día durante la fase experimental y para determinar el patrón temporal promedio de cada grupo experimental y su control..

#### **MEDICIÓN DE GRASA CORPORAL**

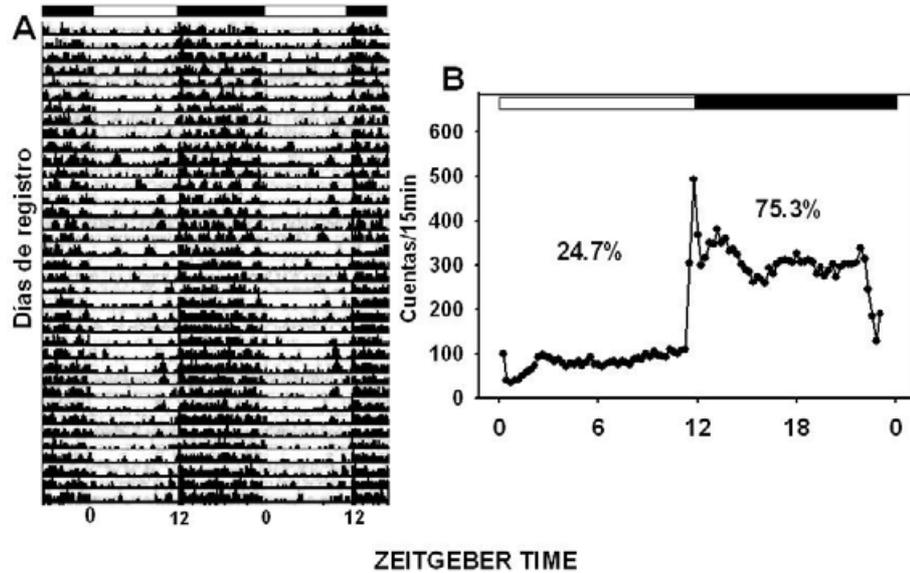
Al finalizar la perfusión, se extrajo de cada rata el cerebro, se recuperaron los iButton y se disecó bilateralmente la grasa abdominal, la grasa retroperitoneal y del epidídimo. Cada tipo de grasa se pesó inmediatamente. Los datos obtenidos se capturaron en una base de datos y se realizaron los análisis correspondientes.

## **RESULTADOS**

#### **RITMOS CONDUCTUALES**

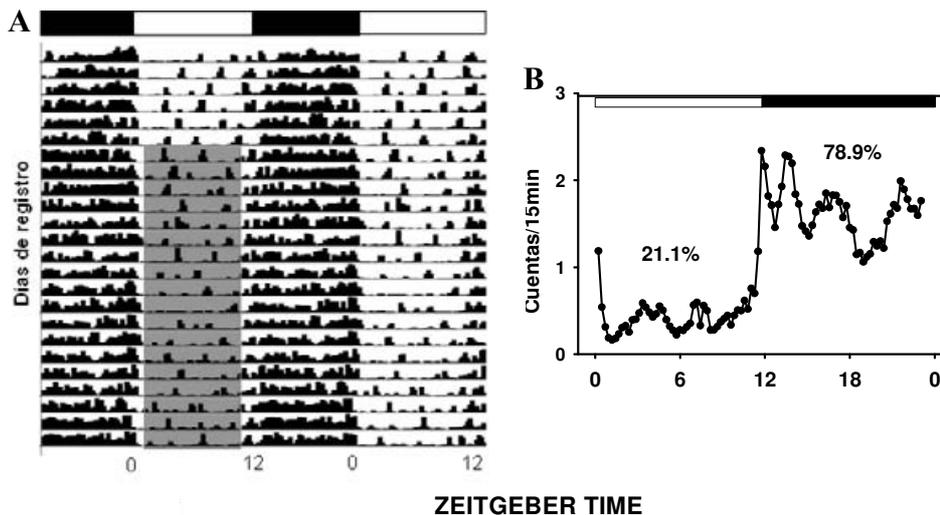
En su línea base todas las ratas control (C-AL, C-CD, C-CN), y las asignadas al trabajo en su fase de descanso (T-AL, T-CD y T-CN) exhibieron ritmos claros sincronizados al ciclo L/D. La actividad nocturna representó para todos los grupos el 66-75% de la actividad total de las 24 horas, mientras que la actividad diurna fluctuó entre 23 y 33% de la actividad total diaria (Figuras 29-31).

Las ratas C-CN y C-CD mantuvieron un patrón temporal de actividad nocturna similar durante toda la manipulación, la cual fue muy similar a la de la línea base y al grupo control (C-AL).

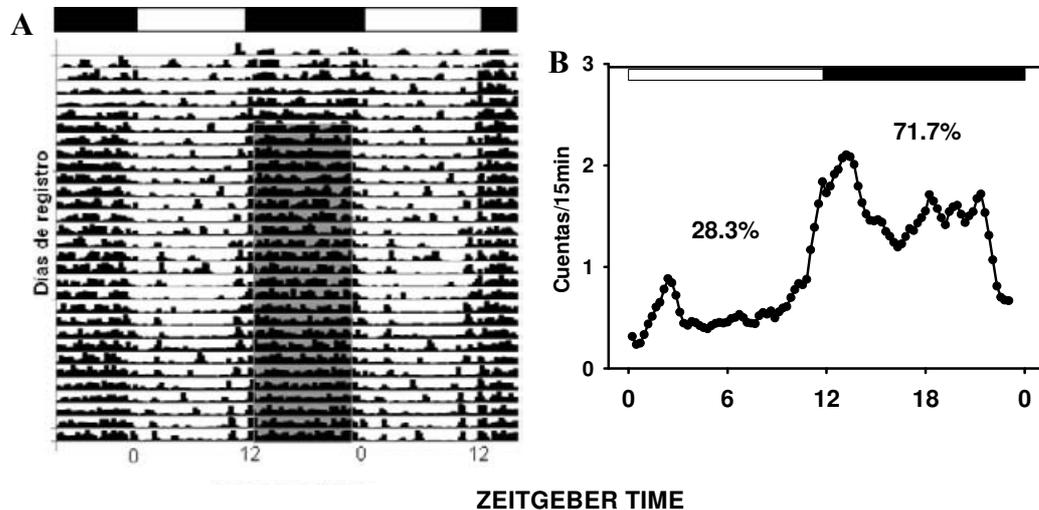


**Figura 29.** Actograma representativo en doble representación de la actividad general de una rata control con alimento y agua *ad libitum*. (A). En el actograma, cada línea representa un día de registro. En (B) promedio de actividad de 16 ratas control y el porcentaje de actividad diurno y nocturno. Se observan claramente ritmos diarios sincronizados al ciclo LD. La barra blanca y negra representa el ciclo LD.

La actividad durante el día representó 21.1 y 28.3 % de la actividad total para los grupos C-CN y C-CD, mientras que la actividad durante la noche representó 78.9 y 71.1% respectivamente. Esto puede ser observado claramente en los actogramas y perfiles de actividad (Figuras 30 y 31).



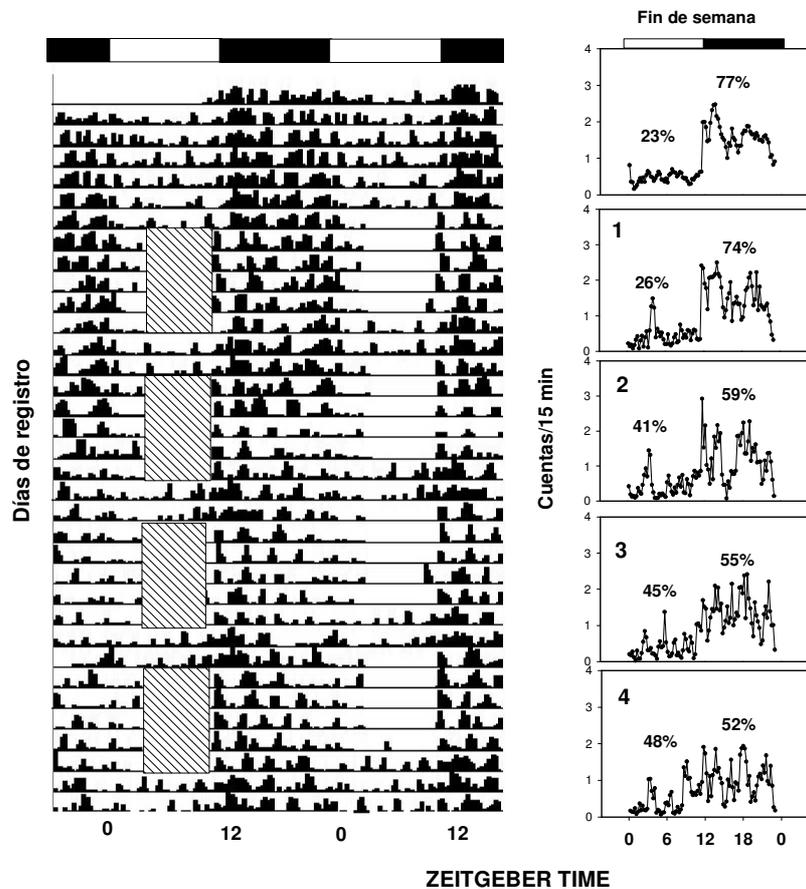
**Figura 30.** Actograma representativo en doble representación de la actividad general de una rata que recibía el alimento únicamente durante el día (C-CD), y agua *ad libitum*. (A). En el actograma, cada línea representa un día de registro. En (B) promedio de actividad de 5 ratas y el porcentaje de actividad diurno y nocturno. Se observan claramente ritmos diarios sincronizados al ciclo LD. La barra blanca y negra representa el ciclo LD.



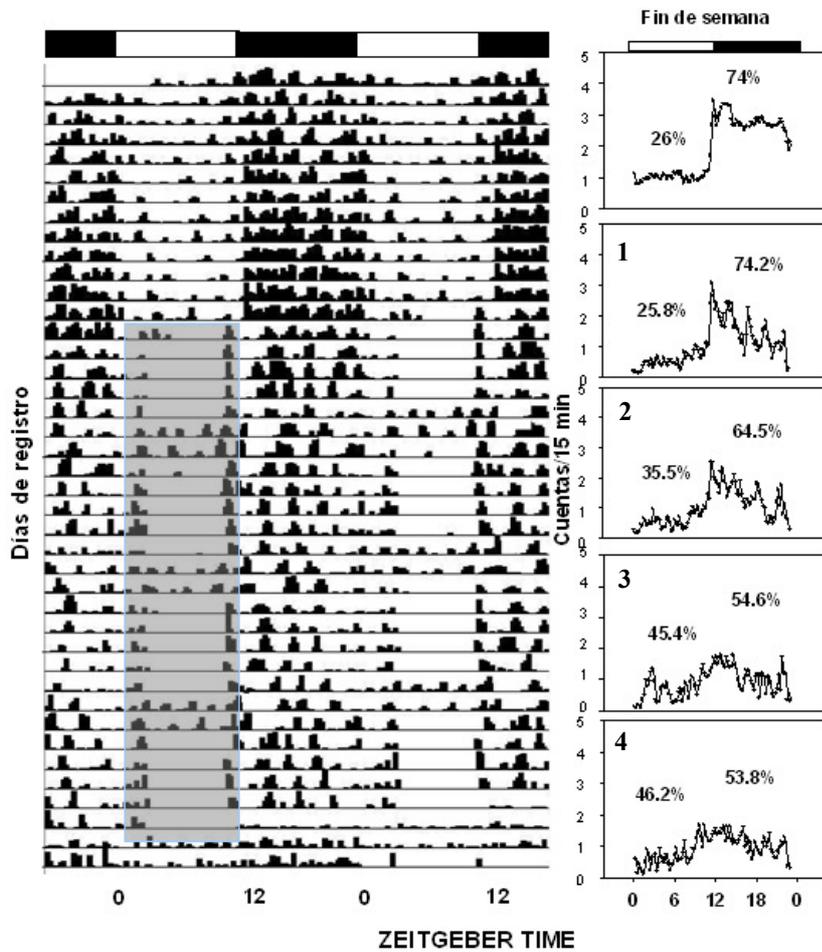
**Figura 31.** Actograma representativo en doble representación de la actividad general de una rata con alimento restringido únicamente durante la noche (C-CN) y agua *ad libitum*. (A). En el actograma, cada línea representa un día de registro. En (B) promedio de actividad de 5 ratas y el porcentaje de actividad diurno y nocturno. Se observan claramente ritmos diarios sincronizados al ciclo LD. La barra blanca y negra representa el ciclo LD.

Las ratas T-AL y T-CD (forzadas a trabajar durante su fase de descanso con alimento *ad libitum* y alimento durante el día) exhibieron a lo largo de las semanas de trabajo un progresivo decremento en su actividad nocturna como se observa en el actograma y en los perfiles promedio de actividad obtenidas en los días de trabajo y sus correspondientes fines de semana (Fig.32 y 33).

Después de la cuarta semana de trabajo las ratas T-AL y T-CD mostraron durante el fin de semana una actividad nocturna disminuida con una proporción aproximada de 53% de la actividad total diaria mientras que la actividad diurna había aumentado a 47% sin observarse un ritmo diurno significativo (Figs.32 y 33).

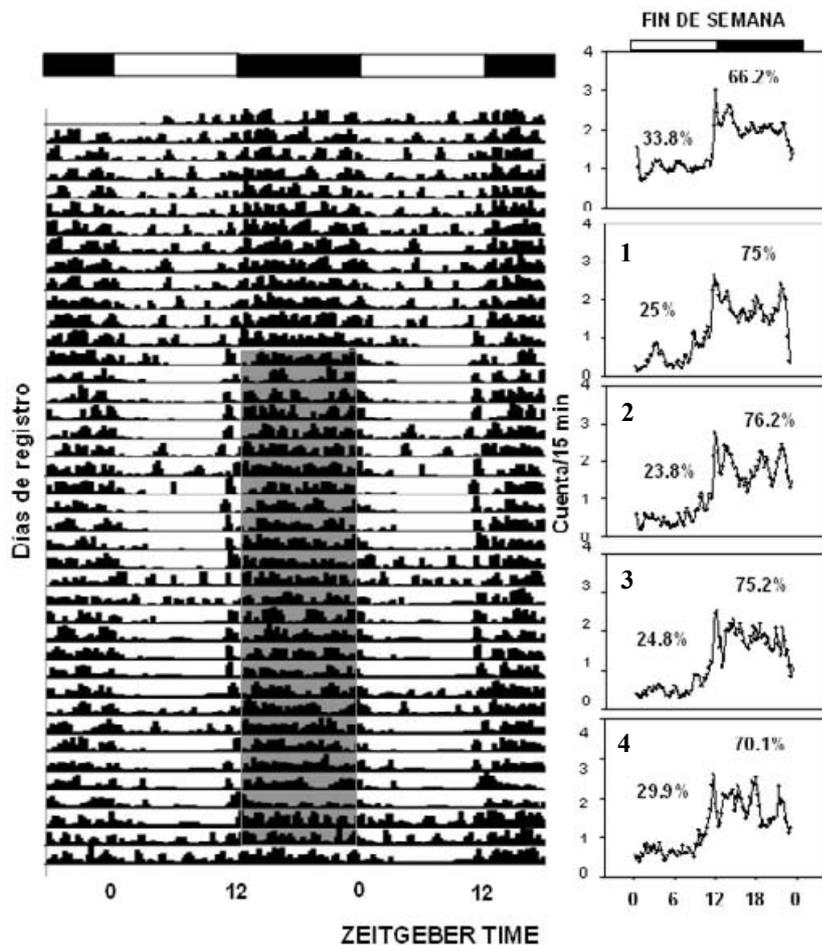


**Figura 32.** Actograma representativo en doble representación de ratas T-AL (Izquierda). Los primeros 7 días corresponden a la línea base, seguida de 4 semanas bajo condiciones de trabajo. Del lado derecho se presenta el promedio de actividad para la línea base (Parte superior) seguida de cada fin de semana (números 1-4). Las ratas T-AL (n=6) exhiben a los largo de las semanas un progresivo decremento de su actividad nocturna. El tiempo en la rueda de actividad, esta representado por los cuadros con líneas diagonales. Más indicaciones en Fig.30.



**Figura 33.** Actograma representativo en doble representación de ratas T-CD (Izquierda). Los primeros 13 días corresponden a la línea base, seguida de 4 semanas bajo condiciones de trabajo. Del lado derecho se presenta el promedio de actividad para la línea base (Parte superior) seguida de cada fin de semana (números 1-4). Las ratas TFD (n=12) exhiben a los largo de las semanas un progresivo decremento de su actividad nocturna. El tiempo en la rueda de actividad, esta representado por los espacios en blanco y el tiempo de acceso al alimento por una barra gris tenue. Más indicaciones en Fig.30.

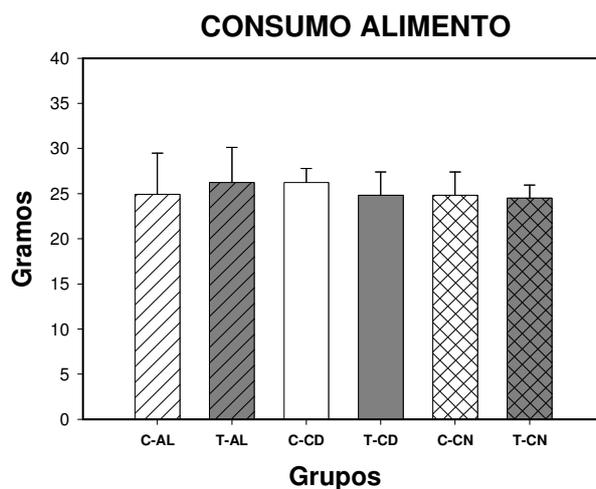
En contraste aquellos animales expuestos a la rueda de actividad pero con alimento restringido a la noche no mostraron un decremento de su actividad nocturna durante la semana y fines de semana, a pesar de estar expuestos a la rutina de trabajo forzado durante su fase de reposo. Durante los fines de semana mostraron una actividad nocturna con proporciones similares a las que se observaron en la línea base (66-75%) (Fig.34).



**Figura 34.** Actograma representativo en doble representación de ratas T-CN (Izquierda). A la derecha se presenta el promedio de actividad para la línea base (Parte superior) seguida de cada fin de semana (numero 1-4). Las ratas (n=12) mantuvieron similares proporciones de actividad diaria a las observadas en la línea base y en los fines de semana (1-4), las ratas exhibieron una robusta ritmicidad con una alta proporción de actividad nocturna. El tiempo en la rueda de actividad, está representado por los espacios en blanco, y el tiempo de acceso al alimento por una barra gris tenue. Más indicaciones en Fig. 29.

**INGESTIÓN DE ALIMENTO Y PESO CORPORAL.**

Interesantemente a lo largo de las 4 semanas de manipulación los 6 grupos consumieron cantidades similares de alimento (Fig.35), que no se alteró por la hora de acceso a la comida.

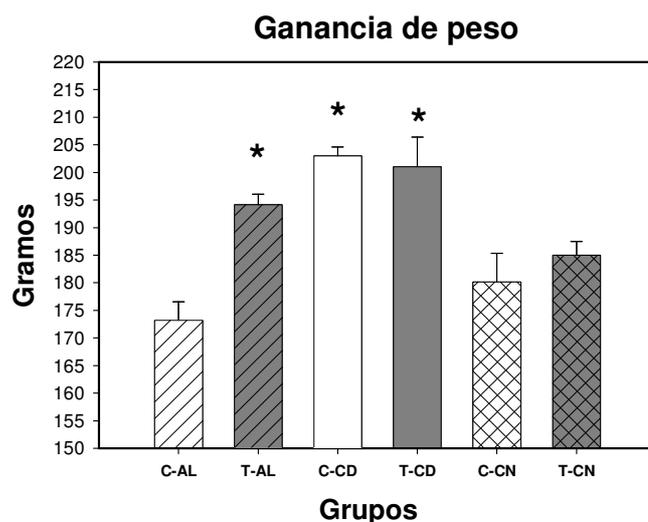


**Figura 35.** Promedio de la ingesta total diaria de alimento en los 6 grupos de ratas. Los seis grupos mostraron un patrón de consumo similar, Estos datos se obtuvieron en la 4ª semana de manipulación en todos los grupos. No hubo diferencias estadísticas entre los valores de todos los grupos.

A pesar de que la ingesta de alimento total por día fue semejante en todos los grupos. Las ratas que trabajaron y se alimentaron preferentemente durante el día, (T-AL, T-CD) e incluso aquellas que se alimentaron sólo durante el día sin trabajar, (C-CD) ganaron más peso que el control (C-AL) y que las ratas que sólo se alimentaban de noche (T-CN y C-CN), lo cual es la fase normal de alimentación para una rata (Fig.36).

Al final del estudio el aumento de peso comparado con el grupo control (C-AL) fue de de +12% para las T-AL, de +17% para el grupo C-CD, de + 16% para las T-CD, de +4% para las C-CN y de 6% para el T-CN. El ANOVA indicó una diferencia significativa entre los grupos que comen de día y los que comen de noche. ( $F_{(2,40)}=3.46$   $P<0.04$ ), pero no entre los grupos que trabajan y no trabajan ( $F_{(1,40)}=0.15$  N/S) y la prueba post hoc indicó que el grupo T-AL, C-CD y T-CD fueron significativamente diferentes del grupo control (C-AL) ( $P<0.001$ ).

Por lo tanto con estos resultados podemos concluir que el alimento a deshoras (durante la etapa de descanso) es el que ocasiona una ganancia de peso mayor, independientemente de la actividad.



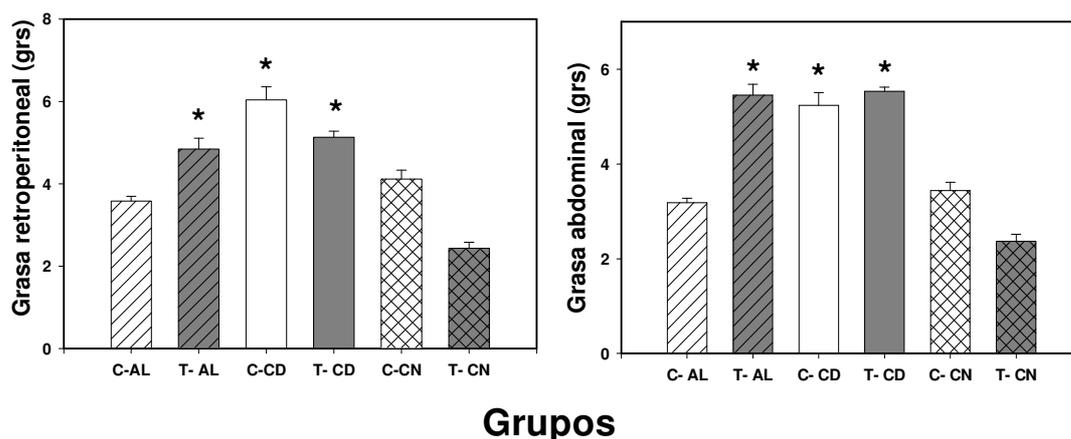
**Figura 36.** Promedio de la ganancia de peso de los 6 grupos de ratas. Note que los tres grupos que se alimentan durante el día tienen una mayor ganancia de peso. Los asteriscos indican una diferencia estadística de los grupos que se alimentan de día con los demás grupos. ( $P < 0.001$ ).

#### TEJIDO ADIPOSO

Aunque la ingesta diaria total de alimento fue similar en todos los grupos, independientemente de que trabajaran o no, la grasa acumulada total, fue mayor en los grupos que se alimentaban durante su etapa de descanso (T-AL, C-CD, T-CD). El ANOVA indicó una diferencia significativa entre los grupos que comen de día con los que comen de noche ( $F_{(2,40)} = 32.81$ ;  $P < 0.0001$ ), pero no entre los que trabajan y no trabajan ( $F_{(1,40)} = 1.94$ ; N/S), pero si una diferencia en la interacción de ambos factores ( $F_{(2,40)} = 29.79$ ;  $P < 0.0001$ ) y la prueba post hoc indicó que el grupo T-AL, C-CD, T-CD y C-CN fueron significativamente diferentes del grupo control ( $P < 0.001$ ).

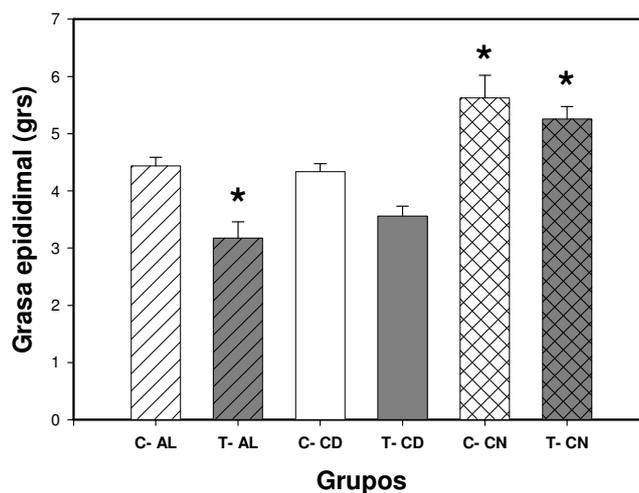
Fue diferencial la acumulación de grasa en el tejido adiposo, la grasa retroperitoneal y abdominal se acumularon en mayor cantidad en los grupos que se alimentaron durante su fase de descanso (día) con respecto a los que comían durante la noche. (Fig.37 y 38). El ANOVA para la grasa retroperitoneal indicó una diferencia significativa entre los grupos que comen de día y los que comen de noche ( $F_{(2,40)} = 18.90$ ;  $P < 0.0001$ ), pero no hubo diferencia entre los que trabajan y no trabajan ( $F_{(1,40)} = 0.40$ ; N/S) pero si hubo diferencia en la interacción de ambos factores. ( $F_{(2,40)} = 11.21$ ;  $P < 0.001$ ). La prueba post hoc indicó que los tres grupos que se alimentaron en su fase de reposo (T-AL, C-CD y T-CD) fueron significativamente diferentes del grupo control. (Fig.37).

Al igual que con la grasa retroperitoneal, para la grasa abdominal el ANOVA indicó una diferencia significativa entre los grupos que comen de día de los que comen de noche ( $F_{(2,40)}=29.40$ ;  $P<0.0001$ ), y los que trabajan y no trabajan ( $F_{(1,40)}=13.41$ ;  $P<0.001$ ) además en la interacción de ambos factores. ( $F_{(2,40)}=14.61$ ;  $P<0.001$ ) y la prueba post hoc indicó que el grupo T-AL, C-CD y T-CD también fueron significativamente diferentes del grupo control ( $P<0.001$ ). (Fig.37).



**Figura 37.** Promedio de la acumulación de grasa retroperitoneal y abdominal de los 6 grupos de ratas. Note que los tres grupos que se alimentan durante el día tienen una mayor acumulación de grasa. Los asteriscos indican una diferencia estadística de los grupos que se alimentan de día con los demás grupos. ( $P<0.001$ ).

Con respecto a la grasa epididimal, ésta se encontró en mayor cantidad en los grupos que se alimentan durante su fase de actividad (noche) (C-CN, T-CN), con respecto a los grupos que se alimentaban únicamente durante el día (C-CD, T-AL, T-CD) (Fig.38). El ANOVA indicó una diferencia significativa entre los grupos que comen de día y los que comen de noche ( $F_{(2,40)}=30.40$ ;  $P<0.0001$ ) y una diferencia entre los que trabajan y no trabajan ( $F_{(1,40)}=18.08$ ;  $P<0.001$ ) pero no hubo diferencia en la interacción de ambos factores. ( $F_{(2,40)}=1.89$ ; N/S, la prueba post hoc indicó que los grupos C-CN, T-CN y T-AL fueron significativamente diferentes del grupo control (C-AL) ( $P<0.001$ ).



**Figura 38.** Promedio de la acumulación de grasa epididimal de los 6 grupos de ratas. Note que los grupos que se alimentan durante la noche tienen una mayor acumulación de grasa. Los asteriscos indican una diferencia estadística de los grupos que se alimentan de día con los demás grupos. ( $P < 0.001$ ).

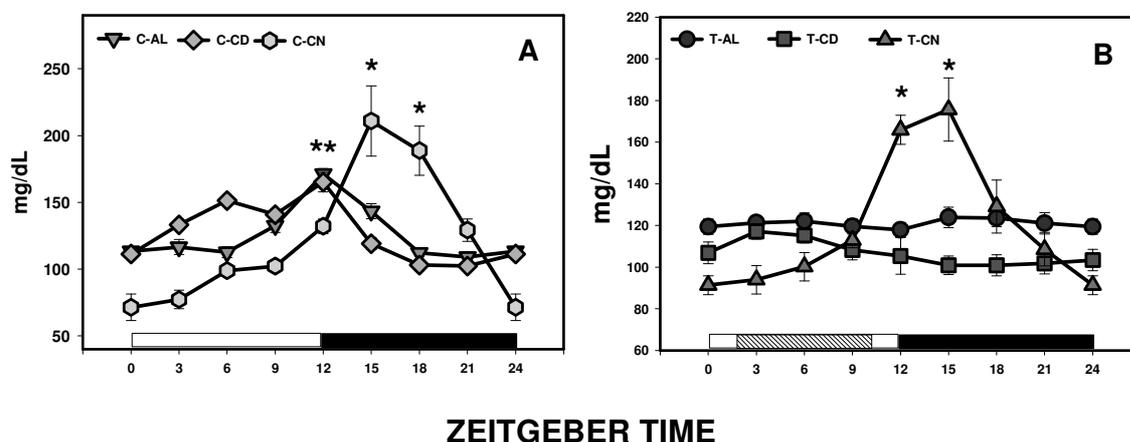
#### DETERMINACIÓN DE GLUCOSA Y TRIACILGLICÉRIDOS

Las ratas control (C-AL) exhiben un pico de glucosa durante la transición de la fase de luz a la fase de oscuridad. De igual manera el grupo C-CD mostró este pico durante la transición de la fase de luz a la fase de oscuridad (en ZT12), indicando que la alimentación restringida no modifica el patrón temporal de glucosa. En el grupo que comió solamente de noche C-CN, el pico nocturno se fortaleció y mostró mayor amplitud que el grupo control *ad libitum*. El ANOVA de dos vías, indicó un efecto significativo por el trabajo ( $F_{(2,144)}=3.36$ ;  $P < 0.03$ ), confirmó un efecto en el tiempo de alimentación ( $F_{(7,144)}=22.79$ ,  $P < 0.0001$  y en la interacción de ambos factores ( $F_{(14,144)}=21.34$ ;  $P < 0.0001$ ).

Las ratas que trabajaron y preferentemente comieron de día T-CD y T-AL no se observó ritmicidad de la glucosa sanguínea (Fig.39 B). En cambio en el grupo T-CN, que solamente comió de noche se observó un ritmo robusto con acrofase durante la noche similar al C-CN. Es importante resaltar que el trabajo en la fase de reposo cuando no se acompaña de alimentación no cambia la fase del ritmo de glucosa. Para los grupos que trabajaban en la rueda de actividad en su etapa de descanso (T-AL, T-CD y T-CN), la ANOVA de dos vías, indicó una diferencia significativa entre grupos ( $F_{(2,152)}=12.65$ ;

$P < 0.0001$ ), además de una diferencia por el tiempo de alimentación ( $F_{(7,152)} = 6.89$ ;  $P < 0.0001$ ) y en la interacción de ambos factores. ( $F_{(14,152)} = 9.87$ ;  $P < 0.0001$ ).

## GLUCOSA

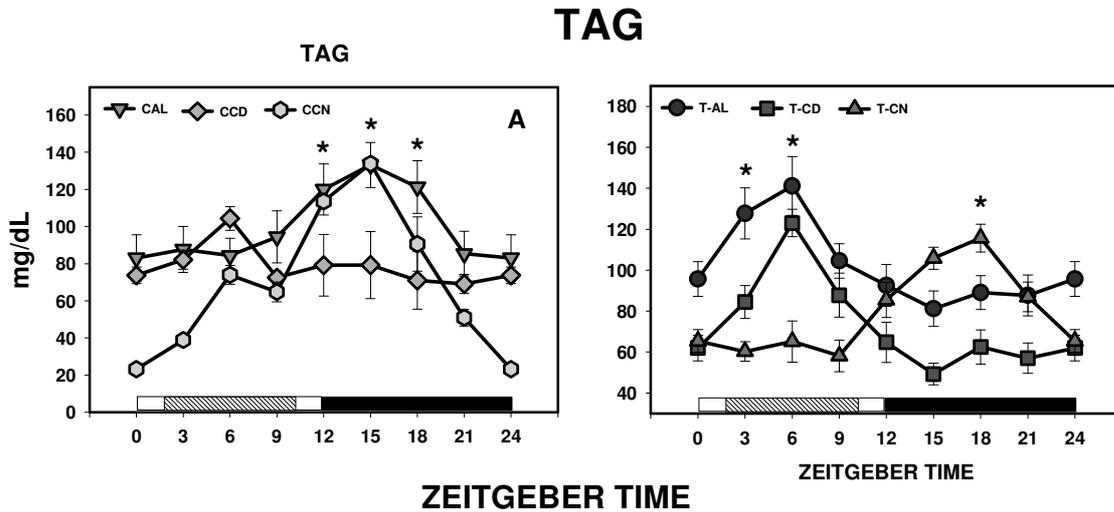


**Figura 39.** Perfil temporal (medias  $\pm$  SEM), para glucosa de los grupos que no trabajan (A), y para los grupos con trabajo y expuestos a diferentes tiempos de alimentación (B). Las barras blancas y negras representan el ciclo L/O, las barras con rayas diagonales en la grafica B representan el tiempo de actividad en la rueda. Asteriscos indican diferencia estadística entre los valores altos y bajos del mismo grupo ( $P < 0.01$ ).

Las ratas control (C-AL) mostraron un ritmo diurno de TAG sérico con un pico en ZT15, 3 horas después del comienzo de la actividad nocturna. En forma similar, el grupo C-CN presentó su pico en ZT15. En contraste el grupo C-CD mostró un ritmo de muy baja amplitud y con un pico diario de TAG en ZT6 que corresponde a la fase de luz, es decir mientras comen. El ANOVA de dos vías, indicó diferencia significativa entre grupos ( $F_{(2,126)} = 11.83$ ;  $P < 0.0001$ ), confirmó una diferencia en el tiempo ( $F_{(7,126)} = 6.49$ ;  $P < 0.001$ ) y en la interacción de ambos factores. ( $F_{(14,126)} = 2.22$ ;  $P < 0.01$ ) en los animales que no trabajaban en la rueda de actividad (C-AL, C-CD, C-CN).

De igual manera, las ratas T-AL y T-CD, que comen predominantemente de día presentaron su acrofase durante la fase de luz, en ZT6, que corresponde a 4 horas después del comienzo de la actividad en la rueda de actividad forzada y posiblemente de su etapa de alimentación (Fig.40). En contraste el grupo T-CN mostró un ritmo diario de TAG con el pico en la fase oscura, en ZT15, que también correspondió a 3 hrs. después del inicio de la fase de oscuridad de la rata (Fig.40).

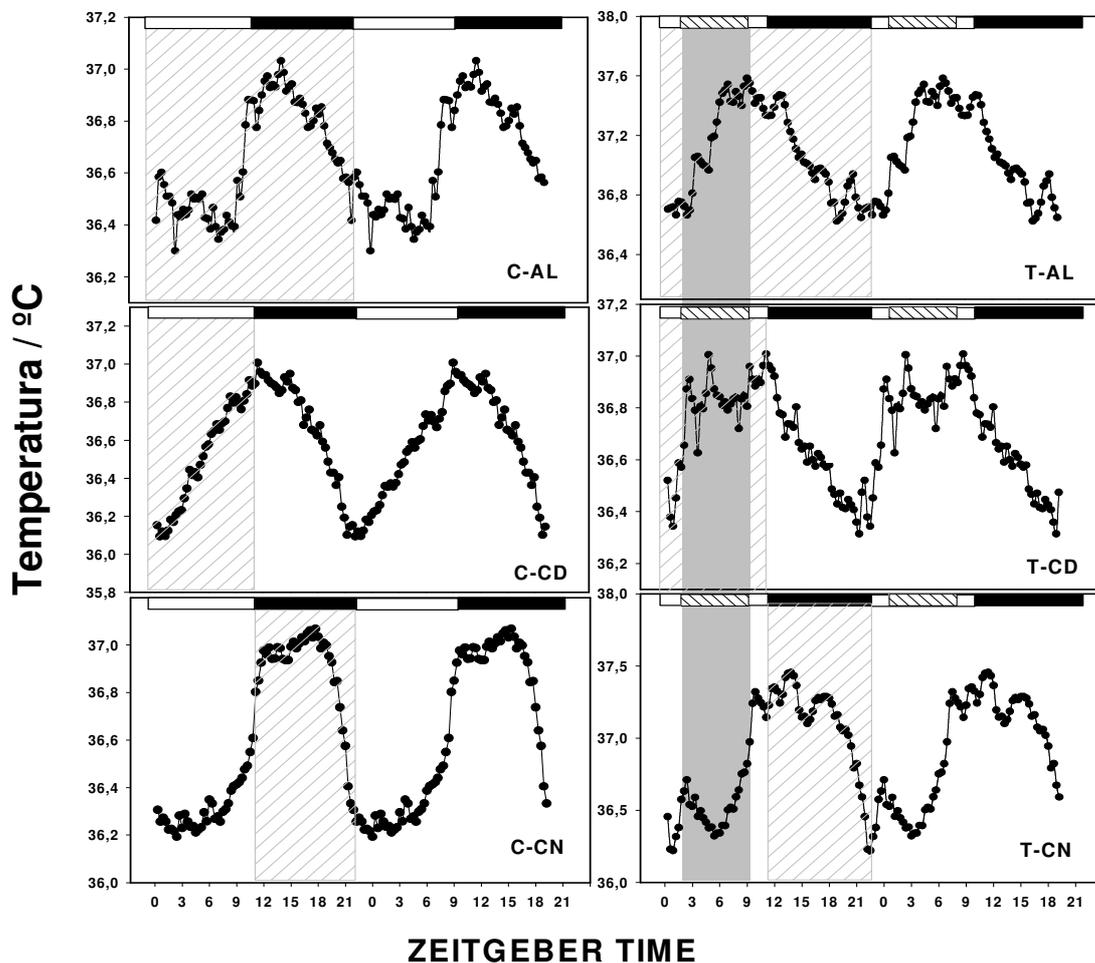
Para el caso de los grupos que trabajaban en la rueda de actividad en su etapa de descanso (T-AL, T-CD y T-CN), el ANOVA de dos vías, indicó una diferencia significativa entre grupos ( $F_{(2,140)}=19.08$ ;  $P<0.001$ ), además de una diferencia en el tiempo ( $F_{(7,140)}=3.78$ ;  $P<0.001$ ) y en la interacción de ambos factores. ( $F_{(14,140)}=5.65$ ;  $P<0.0001$ ).



**Figura 40.** Perfil temporal (medias  $\pm$  SEM), para TAG de los grupos que no trabajan y presentan diferentes tiempos de alimentación (A), y para los grupos con trabajo y tienen diferentes tiempos de alimentación (B). Las barras blancas y negras representan el ciclo L/O, las barras con rayas diagonales en la grafica B representan el tiempo de actividad en la rueda. Asteriscos indican diferencia estadística entre los valores altos y bajos del mismo grupo ( $P<0.001$ ).

#### TEMPERATURA CORPORAL

Las ratas control (C-AL), presentaron un ritmo diario muy claro de temperatura. Durante la fase de luz (descanso), se presentó el nadir del ritmo, elevándose rápidamente aproximadamente dos horas antes del inicio la fase de oscuridad. La acrofase del ritmo, se presenta en la primera mitad de la fase de oscuridad (fase de actividad), con un descenso gradual hasta llegar nuevamente al nadir del ritmo, en la fase de luz del día siguiente. (Fig.41 izquierda arriba).



**Figura 41.** Perfiles temporales (medias  $\pm$  SEM), de la Temperatura de los grupos que no trabajan y presentan diferentes tiempos de alimentación (Columna izquierda), y para los grupos con trabajo y diferentes tiempos de alimentación (Columna Derecho). Las barras blancas y negras representan el ciclo L/O, las barras con rayas diagonales en la columna derecha representan el tiempo de actividad en la rueda.

Las ratas control con alimento solo en el día presenta un ritmo muy claro solo que a diferencia del control ad libitum su nadir se presenta al final de la fase de oscuridad, comenzando su elevación de la temperatura momentos después de iniciar la fase de luz, incrementándose durante todo el ciclo de luz, teniendo su acrofase justo en ZT12. Por otro lado las ratas control con alimento solo en la noche mostraron su nadir durante la fase de luz, incrementándose rápidamente al inicio de la fase de oscuridad presentándose su acrofase a la mitad de la noche, en ZT18.

Las ratas T-AL presentaron su ritmo de temperatura muy claro, pero ahora con un avance de fase de aproximadamente 6 horas, asociado al inicio de la actividad en la rueda y a los tiempos cuando voluntariamente la rata se alimenta (Fig.41). La acrofase de temperatura se observó durante la etapa de luz, y contrario con las ratas C-AL, su nadir se observó en la fase de oscuridad (Fig.41).

El ritmo de temperatura de las ratas T-CD fue similar al de las ratas T-AL, pero con un avance de fase de 9 hrs. aproximadamente, con una elevación relacionada al inicio de su actividad y alimentación en la rueda, comenzando a disminuir poco tiempo después de que el animal sale de trabajar. (Fig.41). Por otro lado las ratas que trabajaron de día y comieron de noche T-CN mostraron un ritmo casi idéntico al que se observó en las ratas control C-AL, con una elevación de temperatura momentos antes del inicio de la fase de oscuridad, momento en que las ratas se alimentan, mostrando su acrofase al igual que el control; en la primera parte de la fase de oscuridad (Fig.41).

## **DISCUSION**

En esta etapa del estudio proporcionamos pruebas de que la combinación de la alimentación y actividad forzada durante las horas de descanso altera no sólo los ritmos conductuales sino también los ritmos metabólicos y el control del peso corporal.

En las ratas forzadas a trabajar en su fase de descanso y con alimento durante el día (T-CD) se mostró una disminución progresiva en la actividad nocturna, similar a la mostrada previamente en el grupo T-AL, que preferente se alimenta también de día durante el trabajo (Salgado y col. 2008). Este efecto no se debió al agotamiento físico, ya que este patrón de actividad se observó durante los fines de semana, cuando las ratas permanecieron inalteradas en sus cajas y este comportamiento no fue observado en las ratas obligadas a moverse durante su fase de actividad (Salgado y col. 2008). El efecto parece ser el resultado de una combinación entre el trabajo en la fase de reposo y el alimento, ya que esta disminución en la actividad no se observó cuando el alimento se restringió a la noche (grupo T-CN). La interacción entre ambos factores se hizo evidente con los controles que no fueron expuestos al trabajo ya que los grupos comen solo de

día (C-CD) o solo de noche (C-CN), no mostraron modificación en la distribución temporal de su conducta.

En otras manipulaciones, en las que los animales son forzados a estar activos durante el día, como el acceso restringido de alimento, o un acceso restringido a una rueda de actividad durante el día, se ha observado también una reducción de la actividad nocturna (Mrosovsky, 1996; Hut y col., 1999; Mistlberger, 1994), semejante al efecto descrito en las ratas T-AL y T-CD.

La persistencia de este efecto durante los fines de semana confirmó que los efectores están desacoplados de la transmisión de señales horarias por el SNC y que un fin de semana no es suficiente para recuperar y reajustar su ritmicidad. Esa perturbación confirma lo que sucede en seres humanos, ya que los trabajadores nocturnos no pueden reajustar su actividad a las señales horarias del ciclo LD en tan solo 2 días. Diversos estudios muestran que el tiempo de resincronización en trabajadores nocturnos o en horarios rotatorios tarda de 4-a 9 días (Sack, 2007).

Los datos de este estudio indican que aquellas ratas que se alimentaron durante el día, con trabajo o sin trabajo presentaron una ganancia de peso mayor que aquellas que se alimentaron durante la noche. El mismo patrón se observó al medir la acumulación de grasa abdominal y retroperitoneal.

Es importante resaltar que la ingesta total diaria de alimento fue similar en todos los grupos, y que las ratas que se alimentaban durante el día, independientemente de que trabajaran o no en su fase de descanso (C-CD, T-CD, T-AL), presentaron un aumento en su peso corporal en mayor proporción que aquellos que se alimentaron únicamente de noche. (C-AL, T-CN, C-CN). Las posibles causas de este comportamiento en el aumento de peso se explicó en la discusión de la etapa 1, aquí solo es importante notar que los datos de peso de estos grupos confirman las alteraciones metabólicas y la predisposición a la obesidad resultantes de la ingestión de alimento durante la fase de reposo (Penev 2007, Mühlhans y col 2008, Colles y col 2007).

Al igual que lo reportado en humanos; las ratas (C-AL, C-CD, T-CD) mostraron una ganancia de peso mayor que aquellas que se alimentaron únicamente de noche,

observándose claramente que la grasa total acumulada, fue mayor en los grupos que se alimentaban durante su etapa descanso (Fig.37) (Salgado-Delgado y col 2008)

Además se observó que la grasa retroperitoneal y abdominal se acumularon en mayor cantidad en los grupos que se alimentaron durante su fase de descanso con respecto a los que comían en su fase de actividad. (Fig.41 y 42). Esto concuerda con lo descrito para humanos, en el cual se relaciona un mayor volumen de grasa abdominal y con un aumento en la incidencia de problemas cardiovasculares (Pearson 2006, Després 2007, Mathieu 2008, Poirier 2008) y un mayor riesgo de cáncer de colon. (Pischon y col . 2006, Lee y col. 2007, Frezza y col. 2006).

El ritmo de glucosa mostró un pico asociado al inicio de la noche en los tres grupos control, independientemente de su hora de alimentación, aunque el alimento durante la noche tuvo un efecto reforzante sobre este ritmo predominantemente nocturno. En las ratas trabajadoras y con alimentación diurna T-CD, T-AL se presentó una pérdida del ritmo de glucosa. Este ritmo fue restablecido al propiciar la alimentación durante la noche.

Un cambio similar se observó en el ritmo de triacilglicéridos y de temperatura de las ratas T-AL y T-CD, presentando ahora su acrofase asociado con la hora de actividad y alimentación. Por el contrario, las ratas que se alimentaron en la noche (C-CN y T-CN), mostraron un ritmo de triacilglicéridos y temperatura similar al control (C-AL).

Aunque se sabe muy bien que el ritmo de glucosa en la sangre está regulado por el NSQ (La Fleur y col., 2001), este puede ser alterado por una privación de sueño aguda (Knutsson y col., 2007; Simon y col., 2000; Van Cauter y col., 2007) y modificado por los horarios de alimentación (Escobar y col., 1998). Dado que una alteración en la ritmicidad se observó en las ratas T-CD y T-AL, podemos asumir que el cambio de actividad esta asociada con una redistribución o perturbación de los patrones de sueño y todas las alteraciones hormonales que están involucrados. (Brandenberger y Weibel, 2004). (Ver más detalles en artículo 1 del anexo y discusión de la etapa 1). Además, se ha reportado que la privación de sueño suprime la ritmicidad y disminuye los niveles de diversas hormonas como las pancreáticas (Schmid y col., 2007), de leptina, prolactina y hormona de crecimiento (Everson y Crowley, 2004); lo cual afecta directamente el ritmo diario de la glucosa. Por lo tanto, la pérdida de ritmicidad de glucosa en las ratas

que comen y trabajan en su fase de descanso tiene una perspectiva multifactorial, causa que debe ser estudiado más a fondo.

En cuanto a los triacilglicéridos (TAG), se observó en todos los grupos una relación de su ritmo con la hora de alimentación. En las ratas que se alimentan durante su fase de actividad independientemente si trabaja o no, los valores máximos de TAG se presentaron en la noche, poco tiempo después del inicio de la fase de oscuridad. Similarmente en los tres grupos que se alimentaron durante su fase de descanso (C-CD, T-CD, T-AL) el pico de TAG se observó durante el día, aproximadamente 6 horas después del inicio de la fase de luz y del inicio de la conducta de alimentación. Estas observaciones son similares a las ya descritas en la discusión de la etapa 1 para trabajadores humanos, en donde se observan picos posprandiales de TAG 3-4 hrs. después de una comida (Ribeiro y col. 1998). Para mas detalles ver discusión etapa 1.

A diferencia del ritmo de triacilglicéridos en donde el alimento tuvo una influencia primordial, en el ritmo de temperatura, se observó una influencia de la rutina de trabajo. En las ratas T-AL se observó un gran avance de fase de aproximadamente 6 hrs., al igual que en los grupo C-CD y T-CD, en el cual además la alimentación durante el día propició mayor avance de fase con un incremento de la temperatura 2 horas después del encendido de la luz, justo al inicio de la actividad en la rueda en el T-CD y al inicio de la alimentación en el grupo C-CD. Aunque es claro que solo el alimento durante su fase de descanso provoca un adelanto de fase en el ritmo de temperatura, este adelanto se intensifica cuando se combina con la actividad en la rueda.

Interesantemente, la influencia del alimento se observó en los grupos que comen de noche, independientemente si tienen actividad de día (T-CN) o no (C-AL, C-CN). Ya que el ritmo nocturno de temperatura se mantuvo fuertemente asociado al horario de alimentación nocturno.

Resultados similares se han reportado; avances de fase de varios ritmos como la melatonina y un avance de fase de hasta 7 horas en el ritmo de temperatura y de actividad en ratas bajo restricción calórica en el día. (Challet y col. 1996, 1997; Weinert y col. 2007, Wu 2004, Satvinder y col. 2008). Otro grupo encontró que el ritmo de temperatura cambiaba, por 3 horas de acceso al alimento en la fase de luz (Boulamery-Velly y col., 2005). Además el estrés agudo que podría estar relacionado con la entrada

a la rueda podría estar generando algunos cambios en el ritmo de temperatura corporal de la ratas que trabajan y se alimenta de día. (Merlo 1997).

No podemos descartar el cambio del ritmo diurno de temperatura hacia el día, por la actividad locomotora a la que esta sujeto el animal, ya que a pesar de ser un ejercicio muy ligero se a reportado que es suficiente para causar un ligero cambio en la temperatura corporal en roedores (Weinert D. 1998; O'connor P. y col. 1998; Miyazaki, y col. 2001). En trabajadores nocturnos se han reportado cambios de fase similares en el ritmo de temperatura asociados con el nuevo horario de actividad del individuo. (Eastman C y col. 1995). Aunado a este efecto, también en el trabajador nocturno el alimento podría estar implicado en el aumento diurno de la temperatura, ya que se sabe que el alimento puede alterar la temperatura corporal (Driver H. y col. 1999).

En conclusión, estos resultados indican que en los animales sometidos a un régimen de trabajo y alimentación durante su período de descanso, se induce una desincronización interna a nivel conductual y metabólico. Estas alteraciones se evitan si el alimento es entregado únicamente durante la noche que es su etapa de actividad y sugieren la relevancia del alimento como agente de acoplamiento y desacoplamiento del mensaje que genera el reloj biológico hacia el organismo.

Estos resultados indican que las señales metabólicas ocasionadas por el alimento a deshoras, combinado con la actividad es un potente agente que ocasiona un cambio de fase en los ritmos conductuales y metabólicos, aun bajo la influencia del ciclo L/O. Este estímulo no-fótico, puede ocasionar grandes cambios en los ritmos de temperatura, TAG, glucosa y ritmos de actividad, sugiriendo un cambio en la sincronización interna del sistema circadiano.

La evidencia de que el alimento durante la noche puede fortalecer el ritmo de glucosa, así como evitar el cambio del ritmo de triacilglicéridos y temperatura sugiere que se deben considerar los horarios de alimentación diseñar una estrategia que permita restablecer la ritmicidad en los individuos sometidos a trabajo nocturno o jet lag. De igual manera indica que la combinación de la actividad con la alimentación durante la

fase de reposo son dos factores que propician la desincronización interna que se observa en el trabajador nocturno.

## **DISCUSION GENERAL.**

La vida moderna provoca situaciones que producen alteraciones en la sincronización como los cambios bruscos en el ambiente (vuelos de larga duración, turnos de trabajo rotatorios, trabajo nocturno, etc.) que causan alteraciones sobre el reloj biológico y la expresión de los ritmos circadianos.

Estas alteraciones, desajustan el orden temporal interno y dejan secuelas crónicas en la salud, siendo una de las principales la ganancia de peso, con una mayor acumulación de grasa en la región abdominal (obesidad central o androide), las alteraciones gastrointestinales, comprendiendo a las gastritis en todas sus variantes y a la úlcera gastroduodenal; en segundo término, las alteraciones cardiovasculares y cáncer de mama en mujeres, entre otras.

Este trabajo nos proporciona una sólida base para entender como se da el desajuste temporal interno característico de un trabajador nocturno, ya que mostramos que en los animales sometidos a un régimen de trabajo durante su período de descanso, se induce una desincronización interna a nivel conductual y metabólico.

Nuestros resultados indican que las señales metabólicas ocasionadas por el alimento a deshoras, combinado con la actividad es un potente agente que ocasiona un cambio de fase en los ritmos conductuales y metabólicos, aun bajo la influencia del ciclo L/O (Fig. 42-43). Estos estímulos no-fóticos, pueden ocasionar grandes cambios en los ritmos de temperatura, TAG, glucosa y ritmos de actividad, sugiriendo un cambio en la sincronización interna del sistema circadiano (Fig. 43).

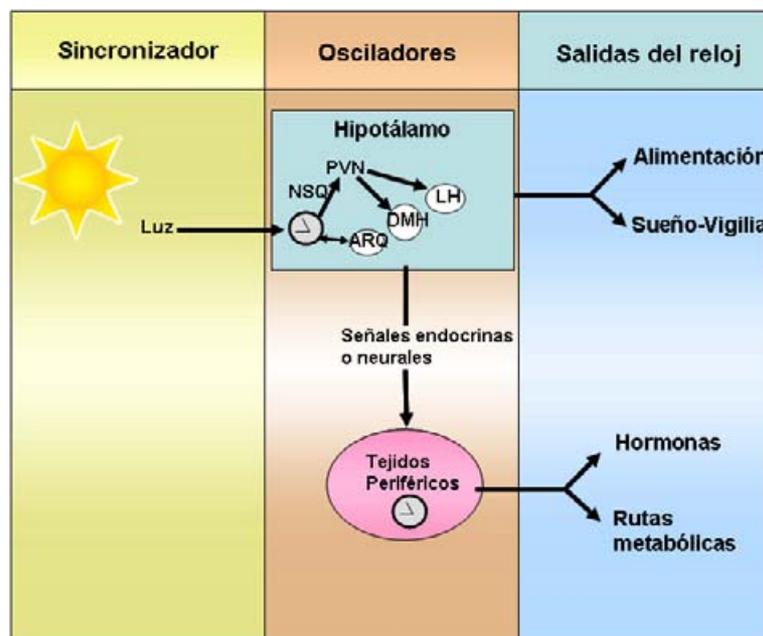
Además mostramos que la actividad de algunas estructuras hipotalámicas relacionadas con la actividad y el metabolismo cambian su fase, presentándose ahora con relación a el trabajo nocturno, desacoplándose de las señales del NSQ. Por lo tanto podemos sugerir que la causa probable de la desincronización interna bajo el régimen de trabajo nocturno puede comenzar con alteraciones tempranas del sistema hipotalámico regulatorio, lo cual posteriormente genera otras alteraciones en el resto del organismo lo cual puede provocar alguna enfermedad.

Nuestras evidencias de que el alimento durante la noche puede fortalecer el ritmo de glucosa, así como evitar el cambio del ritmo de triacilglicéridos y temperatura sugiere que se deben considerar los horarios de alimentación para diseñar una estrategia que

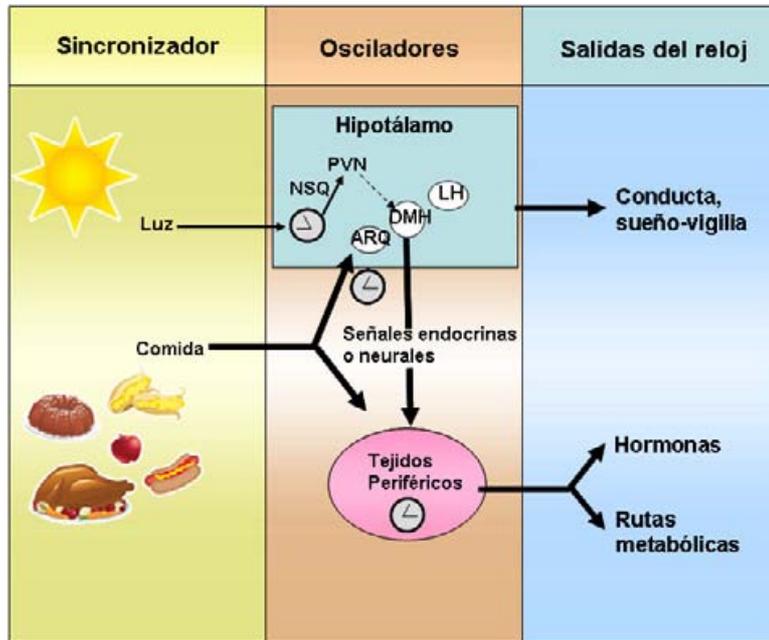
permita restablecer la ritmicidad en los individuos sometidos a trabajo nocturno o jet lag. Ya que en la mayoría de los casos es imposible cambiar el horario de trabajo, sugerimos mantener un patrón diurno de alimentación para aminorar los efectos dañinos que presenta el trabajador nocturno.

En conclusión, los resultados obtenidos en este estudio indican que el factor principal que promueve la desincronización interna en nuestro modelo del trabajo nocturno es el desacoplamiento de osciladores generado por la combinación de la actividad locomotora durante la fase de reposo y el nuevo horario de alimentación, lo que genera una enorme predisposición a enfermedades en aquellas personas con desincronización interna como los trabajadores en turnos, nocturnos y jet lag.

Aunque este trabajo nos proporciona información que nos permite entender muchas de las alteraciones metabólicas a nivel central y periférico en un trabajador nocturno, aún falta mucho por hacer.



**Figura 42.** El sistema de medición temporal consta de una serie de elementos entre ellos un reloj biológico, que en los mamíferos se localiza en el núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo y que se sincroniza principalmente al ciclo luz/oscuridad. El reloj maestro a su vez transmite señales de ritmicidad a los osciladores periféricos encargados de regular la fisiología y la conducta; por ejemplo indicando el ritmo circadiano del ciclo sueño/vigilia, del sistema endocrino, de la temperatura corporal, de la actividad renal, así como de la fisiología del tracto gastrointestinal, del metabolismo hepático, etc., manteniendo estas oscilaciones sincronizadas con el tiempo externo.



**Figura 43.** La alteración en la sincronización circadiana (desincronización) resulta en un desequilibrio en las señales temporales que recibe el NSQ. En este caso, la combinación de la actividad y la ingesta de alimento en horas de descanso, se convierte en un sincronizador muy poderoso para relojes periféricos, pero no para el NSQ, especialmente se sincronizan al alimento aquellos osciladores y procesos fisiológicos asociados con el metabolismo, el balance energético, la digestión y la conducta (Sueño-Vigilia).

## **CONCLUSIONES**

**1.-** La exposición diaria por 8 horas a la rueda de actividad forzada provoca una desincronización interna en roedores, semejante a las que se observan en un trabajador nocturno.

**2.-** La actividad forzada durante la fase de descanso, provocó que el NSQ pierda su relación de fase con sus efectores.

**3.-** El “trabajo nocturno” en ratas ocasionó una desincronización en la expresión de c-Fos y PER1 en núcleos hipotálamicos relacionados con el metabolismo y la vigilia.

**4.-** La actividad forzada durante la fase de descanso, ocasiono que el NSQ pierda su relación de fase con sus efectores.

**5.-** La desincronización interna que se observa en los trabajadores nocturnos se debe a la alimentación durante la fase de descanso, que es cuando también están trabajando.

**6.-** El alimento durante la fase de reposo desacopla los osciladores periféricos del reloj biológico principal.

**7.-** El alimento durante la fase de reposo promueve el aumento de peso en el trabajador nocturno.

**8.-** El horario de alimentación restringido a la fase nocturna (etapa de actividad) es una buena estrategia para evitar el desacoplamiento de los osciladores periféricos en el modelo de trabajo nocturno en ratas.

## REFERENCIAS

Aguilar-Roblero R, García-Hernández, Aguilar R, Arankowsky-Sandoval G, Drucker-Colín R. (1986). Suprachiasmatic nucleus transplants function as an endogenous oscillator only in constant darkness. *Neuroscience Letters*; 69:47-52.

Aguilar-Roblero R, Morin L, Moore R. (1994). Morphological correlates of circadian rhythm restoration induced by transplantation of the suprachiasmatic nucleus in hamsters. *Exp Neurol*. Dec;130(2):250-60.

Akerstedt T, Kecklund G, y Johansson S. (2004). Shift work and mortality. *Chronobiol Int.*; 21(6):1055-61.

Amir S, Cain S, Sullivan J, Robinson B, Stewart J. (1999a). In rats, odor-induced Fos in the olfactory pathways depends on the phase of the circadian clock. *Neurosci Lett*. 17; 272(3):175-8.

Amir S, Cain S, Sullivan J, Robinson B, Stewart J. (1999b). Olfactory stimulation enhances light-induced phase shifts in free-running activity rhythms and Fos expression in the suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience.*; 92(4):1165-70.

Angeles-Castellanos M, Mendoza J, Escobar C. (2007) Restricted feeding schedules phase shift daily rhythms of c-Fos and protein Per1 immunoreactivity in corticolimbic regions in rats. *Neuroscience*. Jan 5;144(1):344-55.

Angeles-Castellanos M, Salgado-Delgado R, Rodríguez K, Buijs RM, Escobar C. (2008). Expectancy for food or expectancy for chocolate reveals timing systems for metabolism and reward. *Neuroscience*. Jul 31;155:297-307.

Antle MC, Mistlberger RE. (2000). Circadian clock resetting by sleep deprivation without exercise in the Syrian hamster.. *J Neurosci*. Dec 15;20(24):9326-32.

Aschoff J. (1965). Circadian Rhythms in Man. *Science*. Jun 11; 148:1427-32.

Aschoff Jürgen..(1981). A Survey on biological Rhythms. *Biological Rhythms*; Vol. 4 of Handbook of Behavioral Neurobiology, edited by Aschoff Jürgen. Plenum Press, New York: 3-11.

Báez-Ruiz A, Escobar C, Aguilar-Roblero R, Vázquez-Martínez O, Díaz-Muñoz M. (2005). Metabolic adaptations of liver mitochondria during restricted feeding schedules. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 289(6):1015-23.

Barger LK, Ayas NT, Cade BE, Cronin JW, Rosner B, Speizer FE, Czeisler CA. (2006) Impact of extended-duration shifts on medical errors, adverse events, and attentional failures. *PLoS Med*. Dec;3:487.

Bartol-Munier, Gourmelen S, Pevet P, Challet E. (2006). Combined effects of high-fat feeding and circadian desynchronization. *Int J Obes* ; 30(1):60-7.

Biello SM, Harrington ME, Mason R. (1991). Geniculo-hypothalamic tract lesions block chlordiazepoxide-induced phase advances in Syrian hamsters. *Brain Res.* Jun 21;552(1):47-52

Boggild H, Knutsson A. (1999). Shift work, risk factors and cardiovascular disease. *Scand J Work Environ Health*, 25(2):85-99.

Boulamery-Velly A., Simon N, Vidal J, Mouchet J, and Bruguerolle B. (2005). Effects of three-hour restricted food access during the light period on circadian rhythms of temperature, locomotor activity, and heart rate in rats. *Chronobiology International*, 22(3): 489–498

Brandenberger G. and Weibel L. (2004). The 24-h growth hormone rhythm in men: sleep and circadian influences questioned, *J. Sleep Res.*;13: 251–255.

Buijs RM, Kalsbeek A. (2001). Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nat Rev Neurosci.* 2(7):521-6.

Buijs RM, la Fleur SE, Wortel J, Van Heyningen C, Zuiddam L, Mettenleiter TC, Kalsbeek A, Nagai K, Nijima A. (2003). The suprachiasmatic nucleus balances sympathetic and parasympathetic output to peripheral organs through separate preautonomic neurons. *J Comp Neurol.* 464(1):36-48.

Cermakian N, Sassone-Corsi P. (2002). Environmental stimulus perception and control of circadian clocks. *Curr Opin Neurobiol.* Aug;12(4):359-65.

Colles S L, J B Dixon and P 'Brien. (2007). Night eating syndrome and nocturnal snacking: association with obesity, binge eating and psychological distress *Int J Obes (Lond)*. Nov;31(11):1722-30.

Cutrera RA, Ouarour A, Pévet P. (1994). Effects of the 5-HT<sub>1a</sub> receptor agonist 8-OH-DPAT and other non-photoc stimuli on the circadian rhythm of wheel-running activity in hamsters under different constant conditions. *Neurosci Lett.* May 19;172:27-30.

Challet E, Pévet P, Vivien-Roels B, Malan (1997). A Phase-advanced daily rhythms of melatonin, body temperature, and locomotor activity in food-restricted rats fed during daytime. *J Biol Rhythms.* Feb;12(1):65-79.

Challet E., Pevet, P, Malan A. (1996). Intergeniculate leaflet lesion and daily rhythms in food-restricted rats fed during daytime. *Neuroscience Letters*, 216; 214-218.

Challet E, Solberg LC, Turek FW. (1998). Entrainment in calorie-restricted mice: conflicting zeitgebers and free-running conditions. *Am J Physiol*; 274:1751-61.

Chiesa J., Golombek D. (1999). Fisiología de la Desincronización por Vuelos Transmeridianos de Larga Duración (Jet-Lag) *Actas de Fisiología*, 5: 21-38.

Dallmann R, Mrosovsky N. (2006). Scheduled wheel access during daytime: A method for studying conflicting zeitgebers. *Physiol Behav.* 88(4-5):459-65.

Damiola F, Le Minh N, Preitner N, Kornmann B, Fleury-Olela F, Schibler U. (2000). Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev.* 14(23):2950-61

Davis S, Mirick DK, Stevens RG. (2001). Night shift work, light at night, and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 93(20):1557-62.

Dawson D., Encel N., Lushington K. (1995). Improving adaptation to simulated night shift: timed exposure to bright light versus daytime melatonin administration. *Sleep* 18, 11-21.

Deacon S., Arendt J. (1996). Adapting to phase shifts, An experimental model for jet lag and shift work. *Physiol Behav*; 59,665-673.

Despres JP. (2007). Cardiovascular disease under the influence of excess visceral fat. *Crit Pathw Cardiol.* Jun;6(2):51-9

Driver H., Shulman I, Baker FH, Buffenstein R. (1999). Energy content of the evening meal alters nocturnal body temperature but not sleep. *Physiology & Behavior* 68 17–23

Dunlap J. (1999). Molecular Bases for Circadian Clocks. *Cell*, 96, 271–290, January 22.

Dunlap J C., Jennifer Loros, De Coursey P.J. (2004). *Chronobiology. Biological timekeeping.* Sinauer Associates, Inc Publishers. Sunderland Massachusetts, USA.

Eastman CI, Hoese EK, Youngstedt SD, Liu L. (1995). Phase-shifting human circadian rhythms with exercise during the night shift. *Physiol Behav.* Dec; 58(6):1287-91.

Emens JS, Lewy AJ, Lefler BJ, Sack RL. (2005). Relative coordination to unknown "weak zeitgebers" in free-running blind individuals. *J Biol Rhythms.* 20(2):159-167.

Escobar C, Díaz-Muñoz M, Encinas F, Aguilar-Roblero R. (1998). Persistence of metabolic rhythmicity during fasting and its entrainment by restricted feeding schedules in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*; 274: 1309-1316.

Everson CA, Crowley WR. (2004). Reductions in circulating anabolic hormones induced by sustained sleep deprivation in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 286(6):1060-70.

Folkard S., Arendt J., Clark M. (1993). Can melatonin improve shift workers' tolerance of the night shift? Some preliminary findings. *Chronobiol Int*; 10, 315-320.

Frezza EE, Wachtel MS, Chiriva-Internati M. (2006). Influence of obesity on the risk of developing colon cancer. *Gut.* 55(2):285-91.

Gander P.H., Kronauer R.E., Graeber R.C. (1985). Phase shifting two coupled circadian pacemakers: implications for jet lag. *Am J Physiol.* 1985; 249: R704-719.

Gangwisch JE, Malaspina D, Boden-Albala B, Heymsfield SB. (2005) Inadequate sleep as a risk factor for obesity: analyses of the NHANES. *Sleep.* 28(10):1289-96.

Girad I, Garland T, (2002). Plasma corticosterone response to acute and chronic voluntary exercise in female house mice. *J Appl Physiol.* 92: 1553-1561

Golombeck D. (2007). *Cronobiología humana; ritmos y relojes biológicos en la salud y en la enfermedad.* Editorial Universidad Nacional de Quilmes. Bernal, Buenos Aires, Argentina.

Golombek D. (2001). *Cronobiología Humana: en busca del tiempo perdido.* Ciencias, abril-junio 62:38-44.

Governale MM, Lee TM. (2001). Olfactory cues accelerate reentrainment following phase shifts and entrain free-running rhythms in female *Octodon degus* (Rodentia). *J Biol Rhythms.* 16(5):489-501.

Graeber, R.C. (1989). Jet lag and sleep disruption. En Kryger, M.H., Roth, T., Dement, W.C. (Eds ). *Principles and practice of sleep medicine.* Philadelphia: WB Saunders.

Granados-Fuentes D, Prolo LM, Abraham U, Herzog ED. (2004). The suprachiasmatic nucleus entrains, but does not sustain, circadian rhythmicity in the olfactory bulb. *J Neurosci.* Jan 21;24(3):615-9.

Gruart A, Delgado JM, Escobar C, Aguilar-Roblero R. (2002). Los relojes que gobiernan la vida. *La ciencia para todos.* Vol. 188. Fondo de Cultura Económica. México, D.F.

Hara R, Wan K, Wakamatsu H, Aida R, Moriya T, Akiyama M and Shibata S (2001). Restricted feeding entrains liver clock without participation of the suprachiasmatic nucleus. *Genes Cells,* 6:269–278.

Hastings M. (1998). The brain, circadian rhythms, and clock genes. *BMJ* Dec 19-26;317:1704-7.

Hastings MH, Mead SM, Vindlacheruvu RR, Ebling FJ, Maywood ES, Grosse J. (1992). Non-photoc phase shifting of the circadian activity rhythm of Syrian hamsters: the relative potency of arousal and melatonin. *Brain Res.* Sep 18; 591:20-6.

Hastings MH, Reddy AB, Maywood ES. (2003). A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease. *Nat Rev Neurosci.* 4(8):649-61.

Haus E, Smolensky M. (2006). Biological clocks and shift work: circadian dysregulation and potential long-term effects. *Cancer Causes Control.* 17:489–500.

Hayes K, Sprague S, Guo M, Davis W, Friedman A, Kumar A, Jimenez D, Ding Y. (2008). Forced, not voluntary, exercise effectively induces neuroprotection in stroke. *Acta Neuropathol.* Mar;115(3):289-96

Healy D, Waterhouse JM. (1995). The circadian system and the therapeutics of the affective disorders. *Pharmacol Ther.* 65(2):241-63.

Horikawa K, Yokota S, Fuji K, Akiyama M, Moriya T, Okamura H, Shibata S. (2000). Nonphotic entrainment by 5-HT<sub>1A/7</sub> receptor agonists accompanied by reduced Per1 and Per2 mRNA levels in the suprachiasmatic nuclei. *J Neurosci.* Aug 1;20(15):5867-73

Hut R. A, Mrosovsky N, Daan S.(1999). Nonphotic entrainment in a diurnal mammal, the European ground squirrel (*Spermophilus citellus*). *J Biol Rhythms.* 14(5):409-19.

Kalsbeek A, Fliers E, Romijn JA, La Fleur SE, Wortel J, Bakker O, Endert E, Buijs RM. (2001). The suprachiasmatic nucleus generates the diurnal changes in plasma leptin levels. *Endocrinology.* Jun;142(6):2677-85.

Kalsbeek A, La Fleur S, Van Heijningen C, Buijs RM. (2004). Suprachiasmatic GABAergic inputs to the paraventricular nucleus control plasma glucose concentrations in the rat via sympathetic innervation of the liver. *J Neurosci.* 24(35):7604-13.

Karlsson B, Knutsson A, Lindahl B. (2005). Population based study of 27485 people having a metabolic syndrome? Results from a Is there an association between shift work and nightwork. *Occup Environ Med.* 72:427–32.

Karlsson B, Knutsson A, Lindahl B. (2001). Is there an association between shift work and having a metabolic syndrome? Results from a population based study of 27,485 people. *Occup Environ Med.* 58(11):747-52.

Klein DC, Moore RY, Reppert SM. (1991). *The mind's clock.* NY: Oxford University Press.

Klerman EB, Rimmer DW, Dijk DJ, Kronauer RE, Rizzo JF, Czeisler CA. (1998). Non-photic entrainment of the human circadian pacemaker. *Am J Physiol.* 274:991-6.

Knutson KL, Spiegel K, Penev P, Van Cauter E. (2007). The metabolic consequences of sleep deprivation. *Sleep Med Rev.* 11(3):163-78.

Krieger DT and Herbert H. (1978). Comparison of synchronization of circadian corticosteroid rhythms by photoperiod and food *Proc Natl Acad Sci USA.* 75(3): 1577–1581.

Kudo T·Akiyama M·Kuriyama K. ·Sudo M·Moriya T. Shibata. (2004). Night-time restricted feeding normalises clock genes and Pai-1 gene expression in the db/db mouse liver. *Diabetologia.* 47:1425–1436

La Fleur SE, Kalsbeek A, Wortel J, Buijs RM. (1999). A suprachiasmatic nucleus generated rhythm in basal glucose concentrations. *J Neuroendocrinol.* Aug;11(8):643-52.

La Fleur SE, Kalsbeek A, Wortel J, Fekkes ML, Buijs RM. (2001). A daily rhythm in glucose tolerance: a role for the suprachiasmatic nucleus. *Diabetes.* 50:1237-43.

Lavie P. (2001). Sleep-wake as a biological rhythm. *Annu Rev Psychol.* 52,277–303.

Lee HL, Son BK, Lee OY, Jeon YC, Han DS, Sohn JH, Yoon BC, Choi HS, Hahm JS, Lee MH, Lee DH, Kee CS. (2007). Abdominal obesity, insulin resistance, and the risk of colonic adenoma. *Korean J Gastroenterol.* Mar, 49(3):147-51.

Mastorakos G, Pavlatou M, Diamanti-kandarakis M, Chrousos G. (2005). Exercise and the stress system. *Hormones*, 4(2):73-89.

Masubuchi S, Honma S, Abe H, Ishizaki K, Namihira M, Ikeda M, Honma K. (2000) Clock genes outside the suprachiasmatic nucleus involved in manifestation of locomotor activity rhythm in rats. *Eur J Neurosci.* 12:4206-14.

Mathieu P, Pibarot P, Larose E, Poirier P, Marette A, Després JP. (2008). Visceral obesity and the heart. *Int J Biochem Cell Biol.* 40(5):821-36.

Maywood ES, Mrosovsky N, Field MD, Hastings MH. (1999). Rapid down-regulation of mammalian period genes during behavioral resetting of the circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 21;96:15211-6.

Maywood ES, Mrosovsky N. (2001). A molecular explanation of interactions between photic and non-photoc circadian clock-resetting stimuli. *Brain Res Gene Expr Patterns.* Aug;1(1):27-31.

Maywood ES, Mrosovsky N. (2002). A molecular explanation of interactions between photic and non-photoc circadian clock-resetting stimuli.. *Brain Res Gene Expr Patterns.* Aug;1(1):27-31. in: *Brain Res Gene Expr Patterns.*

Maywood ES, Smith E, Hall SJ, Hastings MH. (1997). A thalamic contribution to arousal-induced, non-photoc entrainment of the circadian clock of the Syrian hamster. *Eur J Neurosci.* Aug; 9(8):1739-47.

Meijer JH. (2001). Photic Entrainment in Mammals. *Circadian Clocks*, Vol 12 of *Handbook of Behavioral Neurobiology*, edited by Stakahaschi, Turek, Moore. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York. Pp. 183-222.

Mellor E. F. (1996). Shift work and flexitime: How prevalent are they? *Monthly Labor Review* 109:14-21.

Mendoza J, Ángeles-Castellanos M and Escobar C. (2004). Differential role of the accumbens Shell and Core subterritories in food-entrained rhythms of rats. *Behavioural Brain Research*; 158: 133–142.

Mendoza J, Pévet P, Challet E. (2007). Circadian and photic regulation of clock and clock-controlled proteins in the suprachiasmatic nuclei of calorie-restricted mice. *Eur J Neurosci.* 2007 Jun;25(12):3691-701.

Meyer-Bernstein E, Morin L. (1996). Differential serotonergic innervation of the suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet and its rol. *J Neurosci.* Mar 15;16:2097-111

Minors DS, Waterhouse JM. (1981). Anchor sleep as a synchronizer of rhythms on abnormal routines. *Int J Chronobiol.*;7(3):165-88.

Mistlberger RE, Skene DJ. (2005). Nonphotic entrainment in humans? *J Biol Rhythms.*4:339-52.

Mistlberger RE. (1994). Circadian Food-Anticipatory Activity: Formal Models and Physiological Mechanisms. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.* 18(2): 171-195.

Miyazaki Toshihiko, Hashimoto Satoko, Masubuchi Satoru, Honma Sato, and Ken Ichi Honma. (2001). Phase-advance shifts of human circadian pacemaker are accelerated by daytime physical exercise. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol.* Jul;281(1):R197-205.

Moline M.L., Pollack, C.P., Monk, T.H. (1992). Age-related differences in recovery from simulated jet lag. *Sleep,* 15: 8-40.

Moller, N., P. C. Butler, M. A. Antsiferov, and K. G. M. M. Alberti. (1989) Effects of growth hormone on insulin sensitivity and forearm metabolism in normal man. *Diabetologia* 32: 105–110.

Moore R.Y, Eichler ME. (1972). Loss of circadian corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. 1972. *Brain Research,* 42:201-206.

Mrosovsky N. (1996). Locomotor activity and non-photic influences on circadian clocks. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 3:343-72.

Mrosovsky, N. (1995). Non-photic shifting in hamsters. *Circadian clocks and their adjustment.* Wiley, Chicester (Ciba Foundation Symposium 183). Pp: 54 – 171.

Mühlhans B, Olbrich K, de Zwaan M. (2008). Night Eating Syndrome and Nocturnal Eating - What is it All About? *JPsychother Psychosom Med Psychol.*

Nagano M, Adachi A, Nakahama K, Nakamura T, Tamada M, Meyer-Bernstein E, Sehgal A, Shigeyoshi Y. (2003). An abrupt shift in the day/night cycle causes desynchrony in the mammalian circadian center. *Journal of Neuroscience* 23(14):6141-51.

Neufeld H. Breen L and Hauger R. (1994). Extreme posture elevates corticosterone in a forced ambulation model of chronic stress in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior,* 47: 233-240.

O'connor P., Breus MJ and Youngstedt SD. (1998). Exercise-Induced Increase in Core Temperature Does Not Disrupt a Behavioral Measure of Sleep Physiology & Behavior, 64, (3), 213–217.

Pearson H. (2006). *Medicine: Sleep it off.* Nature 443 (7109): 245 - 370.

Penev PD, Zee PC, Wallen EP, Turek FW. (1995). Aging alters the phase-resetting properties of a serotonin agonist on hamster circadian rhythmicity. *Am J Physiol.* 1995 Jan; 268: 293-8.

Penev Plamen D. (2007). Sleep deprivation and energy metabolism: to sleep, perchance to eat? *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity.* 14(5):374-381.

Perreau-Lenz S, Pévet P, Buijs RM, Kalsbeek A. (2004). The biological clock: the bodyguard of temporal homeostasis. *Chronobiol Int.* Jan;21(1):1-25.

Pischon T, Lahmann PH, Boeing H, Friedenreich C, Norat T, Tjønneland A, Halkjaer J, Overvad K, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Guerne G, Bergmann MM, Linseisen J, Becker N, Trichopoulou A, Trichopoulos D, Sieri S, Palli D, Tumino R, Vineis P, Panico S, Peeters PH, Bueno-de-Mesquita HB, Boshuizen HC, Van Guelpen B, Palmqvist R, Berglund G, Gonzalez CA, Dorransoro M, Barricarte A, Navarro C, Martinez C, Quirós JR, Roddam A, Allen N, Bingham S, Khaw KT, Ferrari P, Kaaks R, Slimani N, Riboli E. (2006) Body size and risk of colon and rectal cancer in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC). *J Natl Cancer Inst.* Jul 5;98:9.

Pittendrigh C.S. (1981). Circadian Systems:Entrainment. *Biological Rhythms, Vol. 4 of Handbook of Behavioral Neurobiology*, edited by Aschoff J. Plenum Press, New York. Pp. 95-125.

Pittendrigh C S (1993) Temporal Organization: Reflections of a Darwinian Clock-Watcher. *Annual Review of Physiology* vol. 55: 17-54.

Poirier P. (2008). Targeting abdominal obesity in cardiology: can we be effective? *Can J Cardiol.* Sep; 24 :13-17.

Reddy A, Field M, Maywood E, Hastings M. (2002). Differential resynchronisation of circadian clock gene expression within the suprachiasmatic nuclei of mice subjected to experimental jet lag. *J Neuroscience*, 22(17):7326-30.

Reddy AB, Wong GK, O'Neill J, Maywood ES, Hastings MH. (2005). Circadian clocks: neural and peripheral pacemakers that impact upon the cell division cycle. *Mutat Res.* 1;574(1-2):76-91.

Reid K, Dawson D. (2001). Comparing performance on a simulated 12 hour shift rotation in young and older subjects *Occup Environ Med.* 58:58–62.

Reppert SM, Weaver DR. (2002). Coordination of circadian timing in mammals. *Nature.* Aug 29;418(6901):935-41. Review.

Reppert SM, Weaver DR. (2001). Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol.* 63:647-76. Review.

Ribeiro DC, Hampton SM, Morgan L, Deacon S, Arendt J. (1998). Altered postprandial hormone and metabolic responses in a simulated shift work environment. *J. Endocrinol*; 158 (3):305-10.

Russell Foster and Katharina Wulff. (2005). The rhythm of rest and excess *Nature reviews, Neuroscience*, 6 may.

Sack R, Auckley D, Auger R, Carskadon M, Kenneth P. Wright Jr, Vitiello M, Zhdanova V. (2007). Circadian Rhythm Sleep Disorders: Part I, Basic Principles, Shift Work and Jet Lag. *Sleep*. Nov 1;30(11):1460-83.

Salgado-Delgado R, Angeles-Castellanos M, Buijs R. and Escobar C. (2008). Internal desynchronization in a model of night-work by forced activity in rats. *Neuroscience*. 154 922–931

Satoh Y, Kawai H, Kudo N, Kawashima Y and Mitsumoto A (2006). Time-restricted feeding entrains daily rhythms of energy metabolism in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290(5):R1276-83.

Satvinder K, Thankachan S, Begum S, Blanco-Centurion C, Takeshi Sakurai, Masashi Yanagisawa, Priyattam J. Shiromani. (2008). Entrainment of temperature and activity rhythms to restricted feeding in orexin knock out mice. *Brain research*, 456; 47–54

Schmid SM, Hallschmid M, Jauch-Chara K, Bandorf N, Born J, Schultes B. (2007). Sleep loss alters basal metabolic hormone secretion and modulates the dynamic counterregulatory response to hypoglycemia. *J Clin Endocrinol Metab*. 92(8):3044-51.

Schwartz WJ, Gross RA, Morton MT. (1987). The suprachiasmatic nuclei contain a tetrodotoxin-resistant circadian pacemaker. *Proc Natl Acad Sci*; Mar; 84(6):1694-8.

Segall LA, Verwey M, Amir S. (2008). Timed restricted feeding restores the rhythms of expression of the clock protein, *Period2*, in the oval nucleus of the bed nucleus of the stria terminalis and central nucleus of the amygdala in adrenalectomized rats. *Neuroscience*. 11; 157 (1):52-6.

Shettleworth SJ. (1998). *Timing and Counting. Cognition, Evolution and Behavior*. Oxford. USA, New York. Pp: 333-378.

Simon, C., L. Weibel, And G. Brandenberger. (2000). Twentyfour- hour rhythms of plasma glucose and insulin secretion rate in regular night workers. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*. 278: 413–420.

Spiegel D., Sephton, S. (2002). Night shift work, light at night, and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 94,530-533.

Spiegel K, Weibel L, Gronfier C, Brandenberger G, Follenius M. (1996). Twenty-four-hour prolactin profiles in night workers. *Chronobiol Int*. 13(4):283-93.

Spitzer, R.L., Terman, M., Terman, J., Williams, J.B. (1997). *Columbia jet lag scale*. Biometrics Research, NY State Psychiatric Institute.

Stephan FK (2001) Food-entrainable oscillators in mammals. In *Circadian Clocks*, edited by Takahashi JS, Turek FW and Moore RY, Pp 223-246. Kluwer Academic/Plenum Publishers New York.

Stephan FK, Zucker I. (1972). Circadian rhythms in drinking and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc. Natl, Acad. Sci*; 69:1583-1586.

Stephan FK. (2002). The "other" circadian system: food as a Zeitgeber. *J. Biol. Rhythms*. 17(4):284-92.

Stokkan KA, Yamazaki S, Tei H, Sakaki Y, Menaker M. (2001). Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science*. 291(5503):490-3.

Tsai LL, Tsai YC, Hwang K, Huang YW, Tzeng JE. (2005). Repeated light-dark shifts speed up body weight gain in male F344 rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 289(2):212-7.

Tsai LL, Tsai YC. (2007). The effect of scheduled forced wheel activity on body weight in male F344 rats undergoing chronic circadian desynchronization. *Int J Obes (Lond)*. 31(9):1368-77.

Van Cauter E, Holmbäck U, Knutson K. (2007). Impact of Sleep and Sleep Loss on Neuroendocrine and Metabolic Function *Hormone Research*. 67 (Suppl. 1):2-9.

Van Cauter E, Shapiro ET, Tillil H, Polonsky KS. 1992. Circadian modulation of glucose and insulin responses to meals: relationship to cortisol rhythm. *Am J Physiol*. Apr;262:467-75.

Wakamatsu H, Yoshinobu Y, Aida R, Moriya T, Akiyama M, Shibata S. (2001) Restricted-feeding-induced anticipatory activity rhythm is associated with a phase-shift of the expression of mPer1 and mPer2 mRNA in the cerebral cortex and hippocampus but not in the suprachiasmatic nucleus of mice. *Eur J Neurosci*. 13(6):1190-6.

Weibel L, Brandenberger G. (1998). Disturbances in hormonal profiles of night workers during their usual sleep and work times. *J Biol Rhythms*. 13(3):202-8.

Weibel L, Spiegel K, Follenius M, Ehrhart J, Brandenberger G. (1996). Internal dissociation of the circadian markers of the cortisol rhythm in night workers. *Am J Physiol*. 270:608-13.

Weibel L, Spiegel K, Gronfier C, Follenius M, Brandenberger G. (1997). Twenty-four-hour melatonin and core body temperature rhythms: their adaptation in night workers. *Am J Physiol*. 272:948-54.

Weinert D, Waterhouse J. (1998). Diurnally changing effects of locomotor activity on body temperature in laboratory mice. *Physiol Behav*. 63(5):837-43.

Weinert D, Waterhouse J (2007). The circadian rhythm of core temperature: effects of physical activity and aging. *Physiol Behav*. 28;90:246-56. 2006.

Weitzman E. (1976). Biologic rhythms and hormone secretion patterns. *Hosp Pract.* 11(8):79-86.

Welsh DK, Logothetis DE, Meister M, Reppert SM. (1995). Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron*, 14(4):697-706.

Wickland C, Turek FW. (1994). Lesions of the thalamic intergeniculate leaflet block activity-induced phase shifts in the circadian activity rhythm of the golden hamster; *Brain Res.* Oct 17; 660(2):293-300.

Winget CM, DeRoshia CW, Markley CL, Holley DC. (1984). A review of human physiological and performance changes associated with desynchronization of biological rhythms. *Aviat Space Environ Med.* 1984 Dec;55(12):1085-96.

Wu M.W., Li X.M, Xian L.J., Levi F. (2004). Effects of meal timing on tumor progression in mice. *Life Sciences* 75, 1181–1193.

Yamaguchi S, Isejima H, Matsuo T, Okura R, Yagita K, Kobayashi M, Okamura H. (2003). Synchronization of cellular clocks in the suprachiasmatic nucleus. *Science*; 21; (302):1408-12.

Zwaan de M, Deborah B. Roerig, M Ross D. Crosby, Samy K, James E. Mitchell, M. (2006). Nighttimes Eating: A Descriptive Study. *Int J Eat Disord.* 39:224–232.

# ANEXOS

## ARTICULOS COMO PRIMER AUTOR RELACIONADOS CON ESTA TESIS:

- **Salgado-Delgado R**, Angeles-Castellanos M, Buijs R. and Escobar C. INTERNAL DESYNCHRONIZATION IN A MODEL OF NIGHT-WORK BY FORCED ACTIVITY IN RATS. *Neuroscience*. 2008; 154 922–931.
- 
- **Salgado-Delgado R**, Fuentes Pardo B and Escobar Carolina. LA DESINCRONIZACIÓN INTERNA COMO PROMOTORA DE ENFERMEDAD Y PROBLEMAS DE CONDUCTA. *Salud Mental*. Vol. 32, No 1, Ene-Feb 2009.

## ARTICULOS REALIZADOS EN COLABORACION CON MI GRUPO DE TRABAJO:

- Ángeles-Castellanos M. **Salgado-Delgado, R.** Rodríguez, K. Buijs Rm. and Escobar C. EXPECTANCY FOR FOOD OR EXPECTANCY FOR CHOCOLATE REVEALS TIMING SYSTEMS FOR METABOLISM AND REWARD *Neuroscience* 155 (2008) 297–307.
- Ángeles-Castellanos M. Rodríguez, K. **Salgado-Delgado R**, Buijs R M and Escobar C. THE SUPRACHIASMATIC NUCLEUS PLAYS AN ACTIVE ROLE DURING FOOD ENTREINMENT. *Neuroscience* 2008. *Enviado*.
- Ángeles-Castellanos M., Rodríguez K., **Salgado-Delgado R.**, Escobar C. Cronobiología médica. Fisiología y fisiopatología de los ritmos biológicos. *Rev Fac Med UNAM*. Vol.50 No.6 Noviembre-Diciembre, 2007.
- Ángeles-Castellanos, **Salgado Delgado R**, Rodríguez González, Escobar Carolina. Anatomía de un reloj (Anatomía del sistema circadiano), *Archivos Mexicanos de ANATOMIA. A.C.* vol 2 Num. 1 Junio 2007.
- Escobar Briones C., Ángeles-Castellanos M., Miñana M. C., **Salgado Delgado R.C.**, Rodríguez González K. Hedonismo y reforzadores primarios Capitulo 3 del libro; *Neurobiología del hedonismo*. Editor; Jorge Juárez Gonzáles, 2007, edit. Manual moderno pp. 37-51.
- Escobar Carolina, Ángeles-Castellanos Manuel, **Salgado Delgado R. C.**, Rodríguez González Katia and Buijs M. Rudd. Food Entrainment: A multioscillatory system. In *Comparative Aspects of Circadian Rhythms*, editors: María Luisa Fanjul-Moles and Raúl Aguilar Roblero, Kerala, India. 2008: 121-141