



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**CORRELATOS ANATÓMICOS Y MOLECULARES DE LA SINCRONIZACIÓN POR  
SEÑALES QUÍMICAS VOLÁTILES MATERNAS EN CONEJOS NEONATOS**

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

**BIÓL. LUCERO ANABEL TREJO MUÑOZ**

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. IVETTE CALDELAS SÁNCHEZ

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DR. MAURICIO DÍAZ MUÑOZ

DR. RAÚL AGUILAR ROBLERO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

INSTITUTO DE FISIOLOGÍA CELULAR

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX AGOSTO 2018



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.

# ON THE SHOULDERS OF GIANTS



ON THE SHOULDERS OF GIANTS YOU CAN SEE FURTHER THAN EVER BEFORE.



(JUST DON'T LOOK IN THEIR EARS)

ON THE NOSES OF GIANTS YOU MAY LOOK DOWN ON EVERYONE



OR GAZE UP AMONG THE CLOUDS.



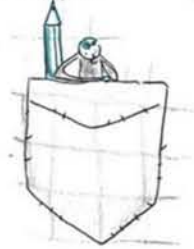
ON THE FINGERTIPS OF GIANTS



YOU REALIZE HOW EASILY A GIANT COULD CRUSH YOU.



ON THE KNEES OF GIANTS YOU WILL READ SOME FANTASTIC GIANT BOOKS.



IN THE POCKETS OF GIANTS YOU MAY HEAR A NERVOUSLY BEATING HEART.



ON THE HEELS OF GIANTS YOU CAN SEE THE DESTRUCTION GIANTS UNINTENTIONALLY CAUSE.

BUT IF YOU LOOK DEEP INTO THE EYES OF A GIANT



YOU WILL SEE A TRUE REFLECTION OF YOURSELF.

GRANT SNIDER

## *Agradecimientos Académicos*

Agradezco enormemente a la directora de esta tesis la Dra. Ivette Caldelas Sánchez por la confianza que deposito en mi para desarrollar este proyecto, por el tiempo y la dedicación que invirtió en formarme como científica, por su constante y paciente guía, por las lecciones de vida que siempre estuvo dispuesta a compartir. Pero más que nada por su calidad humana, por no permitir que me rindiera y siempre exigir lo mejor de mí, por ser una excelente mentora tanto académica como personalmente.

A los integrantes de mi comité tutor; el Dr. Mauricio Díaz Muñoz y el Dr. Raúl Aguilar Roblero, cuyas observaciones, comentarios y cuestionamientos enriquecieron enormemente este trabajo.

A cada uno de los miembros del Jurado: el Dr. Manuel Miranda Anaya, la Dra. Margarita Martínez Gómez, la Dra. Carolina Escobar Briones y la Dra. Robyn E. Hudson, por sus valiosas aportaciones en la revisión final de este escrito.

Al Dr. Rodrigo Montúfar Chaveznava, por la elaboración de los algoritmos con los que fueron analizadas las series de tiempo del presente trabajo.

A la M en C. Erika Navarrete Monroy mi más sincero agradecimiento por su excepcional apoyo técnico, sus invaluable comentarios, así como por su sencillez y calidez humana. Por siempre tratar de transmitirme un poco de su alegría y mucho de su experiencia. Gracias por las tantas comidas, viajes y vivencias que compartimos, por todo lo que me diste oportunidad de aprender de ti. Por ser mi segunda mentora.

A los compañeros del laboratorio con los que tuve la oportunidad de convivir a lo largo de la realización de esta tesis y que hicieron mucho más amena la estancia en el laboratorio, Juan Roberto, Nancy, Miguel, Marisol, Oscar, Alma, Rodrigo, Diana, Laura y Estrella. En particular y con cariño a Pamela y Yosette por brindarme su amistad sincera y compartir conmigo momentos tristes y alegres, por apoyarme siempre, hacerme sonreír, motivarme y enseñarme mucho más de lo que se imaginan.

A la MVZ. Georgina Díaz del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas por el óptimo cuidado y mantenimiento de la colonia de conejos.

Al laboratorista Marco Antonio Meza y a la auxiliar del laboratorio Juanita Álvarez Hernández por complementar nuestro trabajo en la investigación y siempre tener la mejor disposición para colaborar en lo necesario.

Al Sr. Pedro Medina por su disposición y tiempo para enseñarme las bases de la inmunohistoquímica.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas y al Doctorado en Ciencias Biomédicas por darme la oportunidad de superarme académicamente, y en particular a la Lic. Azucena Ayala Pichardo por su apoyo en la realización de todos los tramites desde mi admisión, candidatura y hasta mi titulación y al Ing. Omar Rangel por su apoyo técnico en la realización de las videoconferencias semestrales.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al pueblo de México por permitir que los estudiantes de bajos recursos accedan a educación de excelente calidad de forma gratuita.

## *Financiamiento*

La realización de esta tesis fue financiada con parte de los recursos de los proyectos:

**IN212516** e **IN208513** del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

**No. 398** del Programa Fronteras de la Ciencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)

Agradezco al CONACyT por otorgarme la beca con numero de registro **229357** para la realización de mis estudios doctorales.

## *Agradecimientos Personales*

A mi familia por ser el pilar más importante en mi vida, por compartir juntos los momentos difíciles y las alegrías.

Con mucho amor, a mis padres María Estela Muñoz Delgado y Jorge Trejo García, es casi imposible expresar con palabras el orgullo y gratitud que siento de ser su hija. Les agradezco infinitamente por amarme incondicionalmente y por el sacrificio que han hecho en sus vidas para poderme dar una educación universitaria. Gracias también por inculcarme el valor de la humildad, el orgullo de la superación, la semilla de la curiosidad y la sed por conocimiento desde que era una niña pequeña, así como también, por permitirme elegir libremente mi camino. Reconozco el esfuerzo y la dedicación con la que siempre me apoyaron y sin los que no me hubiera sido posible concluir esta tesis.

A mis hermanos y mejores amigos Brenda, Cynthia y Osvaldo mis más grandes tesoros, ustedes me han enseñado las mayores lecciones de vida, me mostraron que no hay amor más grande que el de tus seres queridos, son el mejor ejemplo que poseo de la superación de la adversidad. Desde siempre han sido mi ejemplo a seguir, los amo y los admiro. Gracias también por permitirme ver la mejor versión de mi a través de sus ojos.

A mi maravillosa sobrina Erin que sin saberlo ha sido la luz que ilumina nuestros días y nuestra motivación.

A A. Elbakyan, O. Teco-Alonso y J. M. Mager-Hois quienes amablemente aportaron valiosas herramientas para la realización de esta tesis.

Respetuosamente agradezco a las vidas de los animales que forman parte de esta tesis.

Finalmente, gracias por la segunda oportunidad tengo.

# ÍNDICE

<b>Resumen</b> .....	<b>1</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>3</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>5</b>
<i>Los ritmos biológicos: origen y diversidad</i> .....	5
Parámetros descriptivos de los ritmos biológicos .....	6
<i>Ritmos circadianos: Características</i> .....	7
<i>El sistema circadiano</i> .....	8
Bases Teóricas .....	10
Osciladores y marcapasos .....	13
El Núcleo Supraquiasmático: marcapasos de mamíferos.....	14
Mecanismos moleculares de la generación de la ritmicidad: los genes reloj.....	17
Aferencias y eferencias del sistema circadiano de mamíferos .....	19
<i>Los osciladores periféricos en mamíferos</i> .....	23
El BO como un posible oscilador independiente en mamíferos.....	25
<i>Desarrollo de los ritmos circadianos</i> .....	27
Neurogénesis del NSQ .....	27
Ritmos circadianos prenatales.....	28
Sincronización materna en etapas tempranas del desarrollo .....	29
Sincronización materna posnatal .....	30
<i>El conejo europeo: modelo para el estudio de la sincronización materna durante el desarrollo</i> .....	31
La importancia del sistema olfativo para los conejos neonatos y la feromona 2MB2 .....	33
La influencia de las señales olfativas maternas sobre el sistema circadiano del conejo neonato .....	36
<b>Planteamiento del problema</b> .....	<b>38</b>
<b>Hipótesis</b> .....	<b>39</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>40</b>
<i>Objetivos particulares:</i> .....	40
<b>Respuesta de la maquinaria molecular del reloj circadiano de conejos neonatos ante la exposición aguda a 2MB2</b> .....	<b>41</b>

<i>Método</i> .....	41
Bioética .....	41
Alojamiento de los sujetos experimentales.....	41
Obtención de las crías de conejo europeo .....	42
Grupos experimentales .....	42
Amamantamiento.....	43
Estimulación olfativa .....	43
Inmunohistoquímica.....	44
<i>Resultados</i> .....	46
<b>Respuesta del sistema circadiano a la exposición diaria a la feromona 2MB2</b> .....	<b>47</b>
<i>Método</i> .....	47
Cambio de Fase de la estimulación olfativa .....	48
Monitoreo y análisis de la temperatura corporal y la actividad locomotora .....	49
Hibridación <i>in situ</i> y análisis de la expresión de los genes reloj .....	51
<b>Resultados</b> .....	<b>56</b>
<i>Temperatura Corporal</i> .....	56
Misma Fase.....	56
Cambio de Fase.....	63
<i>Actividad Locomotora</i> .....	70
Misma Fase.....	70
Cambio de Fase.....	76
<i>Genes Reloj</i> .....	82
Per1 .....	82
Bmal1.....	96
<b>Discusión general</b> .....	<b>108</b>
<b>Conclusiones</b> .....	<b>118</b>
<b>Bibliografía</b> .....	<b>119</b>
<b>Anexo</b> .....	<b>132</b>
<i>Índice de tablas</i> .....	132
<i>Índice de figuras</i> .....	133



# RESUMEN

---

En mamíferos altriciales como el conejo europeo *Oryctolagus cuniculus*, existe evidencia que desde los primeros días de vida, las crías poseen un sistema circadiano funcional. Recientemente se comprobó que el sistema circadiano de las crías es sensible y responde a las señales olfativas maternas como la feromona 2MB2 (2-metilbut-2-enal), por lo que se ha propuesto que la feromona actúa como un posible sincronizador no-fótico durante las primeras semanas de vida. Con el objetivo de determinar si la feromona actúa como un sincronizador para el sistema circadiano de las crías de conejo, primeramente analizamos el efecto de la estimulación con pulsos de la feromona 2MB2 sobre las proteínas del reloj molecular en el NSQ y BO de conejos neonatos. Durante el día posnatal 7, grupos de animales fueron estimulados ya sea con agua destilada, etilisobutirato o 2MB2 en distintos momentos del ciclo, una hora después de la estimulación olfativa los animales fueron sacrificados. Posteriormente mediante inmunohistoquímica se detectó la expresión del marcador de actividad neuronal C-FOS, y de las proteínas reloj PER1, CRY1 y BMAL1 en el NSQ y en el BO. Encontramos que la proteína C-FOS en el NSQ y BO fue modulada por la exposición a 2MB2 y etilisobutirato cuando estos odorantes se presentaron en ZT00 y ZT18. La expresión de las proteínas reloj, únicamente fue modulada por 2MB2 cuando se presentó en ZT00 y ZT06. PER1 y CRY1 también exhibieron respuestas diferenciales a la estimulación olfativa en las tres capas del BO. Por lo que reportamos la modulación temporal de la feromona materna 2MB2 sobre la expresión de las proteínas reloj en el NSQ y en el BO de conejos neonatos.

Adicionalmente caracterizamos el efecto de la exposición diaria a la feromona 2MB2, así como a un cambio de fase de 6 horas, sobre la expresión del ritmo de la temperatura corporal, la actividad locomotora, y los genes reloj. Desde el nacimiento las crías fueron asignadas aleatoriamente a una de las siguientes condiciones: amamantados diariamente por una hembra lactante (NAT); o diariamente estimulados durante 5 min con un pulso de agua destilada (H<sub>2</sub>O), etilisobutirato (ETIL) o feromona (2MB2). Estos tres grupos fueron alimentados de forma enteral para evitar la influencia materna. La manipulación experimental se realizó en el mismo horario desde el día posnatal 1 (P1) y hasta P7. En cuatro grupos adicionales se realizó un retraso de 6 horas en la manipulación experimental a partir de P4 y hasta P7. Se registró la temperatura y actividad locomotora de los animales. En P8 el cerebro los animales se extrajo y se realizó la detección del RNAm de los genes *Per1* y *Bmal1* en el NSQ y BO por medio de hibridación *in situ*. En el patrón de temperatura corporal encontramos similitudes entre los animales de los grupos NAT y 2MB2, debido a que ambos grupos exhiben un incremento anticipatorio horas antes de que ocurriera la estimulación olfativa. Después del cambio de fase, el patrón en los grupos NAT y 2MB2 se ajustó al nuevo horario de estimulación olfativa. En contraste los grupos H<sub>2</sub>O y ETIL exhibieron un patrón atípico, en el que la temperatura disminuye horas antes de que estimulación olfativa ocurra. Por lo que consideramos que la presentación

diaria de odorantes o la sola alimentación enteral no son suficientes para mantener la estabilidad y el control de fase en el patrón temporal de la temperatura corporal. En cuanto la actividad locomotora los cuatro grupos mostraron similitud entre sí, y en respuesta al cambio de horario todos ajustaron su fase al nuevo horario de manipulación. Sin embargo, después del cambio de horario observamos que el componente anticipatorio de la actividad es de menor magnitud en aquellas crías que no recibieron estimulación olfativa. Por lo que proponemos que las señales maternas olfativas influyen en la expresión de los ritmos circadianos de los conejos neonatos a través de la modulación del componente anticipatorio de las crías. Los genes reloj *Per1* y *Bmal1* en el NSQ y en las tres capas del BO exhibieron un patrón de expresión similar en los grupos de animales en los que la manipulación experimental se realizó en el mismo horario. Después del cambio de horario, en general, los grupos NAT y 2MB2 mantuvieron el ritmo de 24 horas y mostraron un retraso en la acrofase del ritmo. En contraste en los grupos H<sub>2</sub>O y ETIL observamos la pérdida de la ritmicidad en el patrón de expresión de dichos genes reloj.

Dadas las evidencias encontradas en este trabajo, concluimos que la feromona actúa como una señal sincronizadora para el sistema circadiano de las crías de conejo europeo.

## ABSTRACT

---

*Previous studies performed in European newborn rabbits have suggested that during pre-visual stages of development, the circadian system of the pups is sensitive to maternal olfactory cues stating that these cues act as non-photoc entrainment signals mainly for temperature and behavior. Nevertheless, the mechanisms underlying this non-photoc synchronization remain unclear.*

*To assess the level of influence of maternal olfactory cues (mainly the pheromone 2-methylbut-2-enal 2MB2) on the molecular clockwork and over rhythmicity of newborn rabbits. First, we determine the effect of the olfactory stimulation with 2MB2 on the expression of the activity marker C-FOS and the clock proteins PER1, CRY1 and BMAL1, the SCN and the MOB. Hence, 7-day-old rabbits were stimulated with distilled water (CON), ethyl isobutyrate (ETHYL) or the pheromone (2MB2) at different times during the cycle, and, the expression of C-FOS, PER1, CRY1 and BMAL1 was evaluated in the SCN and in the three layers of the MOB. The clock proteins showed diurnal rhythmicity only in the MOB, confirming that central pacemakers exhibit a hetero-chronical development of the molecular clockwork. C-FOS expression in the SCN and in the MOB was modulated by exposure to ETHYL and to 2MB2 only when these stimulants were presented at ZT00 and at ZT18. In contrast, the clock proteins were essentially modulated by 2MB2 at ZT00 and at ZT06 in both structures. In addition, the PER1 and CRY1 proteins exhibited differential responses to stimulation in the three layers of the MOB. This data demonstrated that the mammary pheromone exposure has time-dependent effects on clock protein expression in the SCN and in the MOB in newborn rabbits.*

*Afterwards, we evaluate the effect of once-daily exposure to olfactory stimulation with 2MB2 on the temporal pattern of core body temperature, gross locomotor activity and clock gene expression (Per1 and Bmal1) on SCN and MOB in newborn rabbits. For this purpose, rabbit pups were randomly assigned to one of the following conditions: From postnatal day 1 (P1) to P7, nursed by a lactating doe (NAT MF); exposed to a 5-min pulse of distilled water (H<sub>2</sub>O MF), ethyl isobutyrate (ETIL MF) or pheromone (2MB2 MF). To eliminate maternal stimulation, the pups of the last three groups were artificially fed once every 24 h. To test whether if the above-mentioned rhythms can be entrained by 2MB2 daily exposure, in four additional groups (NAT CF, H<sub>2</sub>O CF, ETIL CF y 2MB2 CF) from P4-P7, we introduced a 6-h delay in the handling procedures schedule. Continuous recordings from core body temperature and gross locomotor activity were performed throughout the entire protocol. On P8, the rabbits were sacrificed, their brains were removed and processed. Sections of the hypothalamus containing SCN and MOB were obtained, and in situ hybridization for the detection of RNAm of clock genes Per1 and Bmal1 was performed. Consistent with previous reports, we found that the NAT MF and 2MB2 MF groups exhibited clear diurnal rhythmicity in core body temperature with conspicuous anticipatory rise hours prior to nursing. In contrast, H<sub>2</sub>O MF and ETIL MF exhibited atypical rhythmicity, lacking the anticipatory component. In the groups in which the handling procedures*

*schedule was delay by 6 h, only the animals that received daily olfactory maternal stimulation NAT CF and 2MB2 CF, exhibited a clear shift in the pattern of temperature. Therefore, we suggest that daily olfactory stimulation with ethyl isobutyrate or the sole feeding are not sufficient to maintain stable phase control of the pattern of core body temperature. In the locomotor activity, the four groups showed clear similitude in their activity patterns, and after the delay in the handling procedures schedule, all showed a corresponding shift in the pattern of activity. Nevertheless, we observed that in the anticipatory component of the temperature and activity, both the intensity and the duration were similar between the NAT and 2MB2 groups, while in H2O and ETIL groups, were lower. This effect was maintained even after the 6-h delay. Therefore, we propose that olfactory maternal signals influence the expression of the circadian rhythms of neonatal rabbits through the modulation of the anticipatory component of the offspring. In the SCN and OB the clock genes *Per1* and *Bmal1* exhibited a similar 24h pattern of expression in the four groups. After the delay in the handling procedures schedule, in general, the NAT and 2MB2 groups maintained the 24-hour rhythm and showed a delay in the acrophase of the rhythm. In contrast, we observed loss of rhythmicity in the expression pattern of the clock genes in the H2O and ETIL groups.*

*Based on the evidence found in this work, we conclude that the 2MB2 pheromone acts as a non-photic synchronizing signal for the circadian system of European rabbit pups.*

# INTRODUCCIÓN

---

## Los ritmos biológicos: origen y diversidad

Prácticamente todos los ecosistemas del planeta tierra se encuentran bajo la influencia de fluctuaciones ambientales rítmicas, como la alternancia entre el día y la noche, variaciones de temperatura, mareas, cambios estacionales, disponibilidad de alimento, riesgo de depredación, entre otros. Dada la presión de selección que estas variaciones han impuesto a lo largo del tiempo, los organismos vivos han desarrollado la capacidad intrínseca para la regulación temporal de sus procesos fisiológicos. La adquisición de esta propiedad trajo consigo el surgimiento de la ritmicidad biológica (Pittendrigh, 1981a).

Un ritmo se define como una secuencia de eventos repetitivos o cambios de estado, con periodos regulares y típicamente controlados por un mecanismo oscilatorio (Webb & Oates, 2016). Por lo tanto, cuando se habla de ritmos biológicos nos referimos a la recurrencia de cualquier evento en un sistema biológico, en intervalos regulares de tiempo (Aschoff, 1981).

En la naturaleza podemos encontrar una amplia variedad de ritmos biológicos. En general la frecuencia de estos ha sido vinculada a diferentes ciclos geofísicos, de esta manera podemos encontrar 4 principales ritmos biológicos (Helm & Stevenson, 2014):

a) Ritmos anuales: Aquellos que ocurren aproximadamente cada 365 días como la migración, la reproducción o la hibernación en aves y en mamíferos, estos ritmos están ligados al movimiento de translación de la tierra.

b) Ritmos lunares: Son ciclos cercanos a los 29.5 días, como la reproducción en especies marinas, estos ciclos se relaciona con la translación de la luna.

c) Ritmos mareales: Son aquellos con intervalos de aproximadamente 12.4 horas, como los periodos de actividad de algunas especies litorales. Los ritmos mareales

guardan una estrecha relación con el movimiento de rotación de la luna y las consecuentes transiciones entre marea alta y baja.

d) Ritmos circadianos: Se trata de ciclos como el sueño-vigilia de los seres humanos o la eclosión de las larvas de *Drosophila melanogaster*, que tienen una duración aproximada de 24 horas y están íntimamente ligados al movimiento de rotación de la tierra, y a la alternancia entre el día y la noche.

El presente trabajo se enfocará en estos últimos.

### **Parámetros descriptivos de los ritmos biológicos**

El estudio de los ritmos biológicos nos lleva al análisis de variables que presentan fluctuaciones cíclicas, dichas fluctuaciones se repiten en intervalos regulares de tiempo, existen una serie de parámetros descriptivos que deben ser tomados en cuenta y que a continuación se definen (Moore-Ede *et al.*, 1982):

**Fase ( $\phi$ ).** Estado de la variable en un momento determinado de la oscilación en relación a un punto de referencia.

**Periodo ( $T$  o  $\tau$ ).** Es el intervalo de tiempo entre dos fases de referencia iguales. Por consenso  $T$  representa el periodo del sincronizador y  $\tau$  el periodo del oscilador.

**Acrofase.** Fase de la oscilación en el que la variable tiene su valor máximo.

**Nadir.** Fase de la oscilación en el que la variable alcanza su valor mínimo.

**Amplitud.** Diferencia entre el valor máximo y el valor mínimo de la variable.

**Mesor.** El valor promedio de la variable que oscila.

## Ritmos circadianos: Características

Los primeros trabajos que abordan la temática de la fisiología circadiana datan del siglo XVIII, en el año de 1729 Jean Jacques d'Órtous de Mairan describió en un sencillo experimento lo que ahora se conoce como control nictinástico en la planta *Mimosa pudica*. En la época era sabido que además del plegamiento repentino de los folíolos al ser tocados, por el que es nombrada la *Mimosa pudica*, esta planta también posee plegamientos dependientes de la hora del día, ya que sus hojas se mantienen abiertas durante el día y se pliegan durante la noche. De Mairan mantuvo dichas plantas en oscuridad constante mientras registró los movimientos de las hojas y reportó que en ausencia del ciclo luz - oscuridad, el plegamiento y apertura de las hojas sigue ocurriendo con un periodo cercano a las 24 horas. Aunque De'Mairan no realizó conjeturas sobre el origen de dichas variaciones diarias, su trabajo dejó ver que los ritmos de apertura y cierre de las hojas de la *Mimosa pudica* son independientes de los cambios de iluminación y por tanto no se tratan de un simple reflejo pasivo a las variaciones ambientales (Schwartz & Daan, 2017).

Posteriormente en 1832, el renombrado botánico Augustin Pyramus de Candolle siguiendo una línea de trabajos posteriores a los de De Mairan, planteó por primera vez la hipótesis del origen endógeno de los ritmos circadianos. De Candolle estudió el control nictinástico de la *Mimosa pudica* en luz constante, reportó que bajo estas condiciones el periodo de los plegamientos es menor a las 24hrs y que varía entre individuos. A partir de estas observaciones de Candolle concluyó que los movimientos cíclicos de la planta son inherentes a esta (Moore-Ede *et al.*, 1982).

Ya entrados en el siglo XX, un cúmulo de trabajos posteriores entre los que se encuentran los de Erwin Büning, Hans Kalmus, Curt Richter, Sutherland Simpson, Nathaniel Kleitman, Bruce Richardson y Jürgen Aschoff demostraron que la naturaleza de los ritmos circadianos es endógena, ya que persiste en condiciones ambientales constantes, al mismo tiempo descartaron el papel de las variables geofísicas rítmicas como el origen de los ritmos circadianos. Adicionalmente, demostraron que los ritmos circadianos tienen orígenes genéticos pues se mantienen por generaciones en ausencia de señales cíclicas,

y están extendidos en todos los niveles de organización biológica, desde organismos unicelulares, plantas, animales hasta el ser humano (Schwartz & Daan, 2017).

El fisiólogo Franz Halberg acuñó por primera vez el término circadiano, el cual deriva de los vocablos latinos *circa*-cerca *diem*-día, para describir los ciclos generados por los seres vivos que se aproximan a un periodo de 24 horas (Halberg *et al.*, 1959). Con base en este criterio se ha propuesto la subdivisión de los ritmos circadianos en, los ritmos ultradianos aquellos con periodos menores a 24 horas y los ritmos infradianos los cuales presentan periodos mayores a 24 horas (Aschoff, 1981).

Una de las características más importantes de los ritmos circadianos es la compensación de la temperatura. A diferencia de lo que ocurre en la mayoría de los procesos biológicos, en los que el aumento de la temperatura acelera los procesos bioquímicos, mientras que la disminución los desacelera, en los ritmos circadianos los cambios de temperatura no afectan el periodo y ni la fase del ritmo (Pittendrigh & Caldarola, 1973). Lo anterior es una evidencia adicional que señala el origen endógeno de las oscilaciones circadianas. Sin embargo, cabe aclarar que los cambios de temperatura pueden sincronizar la actividad de los osciladores (Buhr *et al.*, 2010).

Historicamente se propone que la ritmicidad circadiana es generada de forma autónoma por los organismos, como parte de los procesos intrínsecos de regulación fisiológica, y tiene como finalidad estimar el paso del tiempo y acoplar la fisiología del organismo a los cambios cíclicos ambientales (Moore-Ede *et al.*, 1982; Aguilar-Roblero, 1993; Pittendrigh, 1993).

## El sistema circadiano

En un principio se describió al sistema circadiano en un sencillo modelo lineal conformado por tres componentes esenciales:

**Osciladores:** Células o grupos de células capaces de generar oscilaciones autónomas y auto sostenidas en su fisiología. Un grupo de osciladores puede acoplarse y formar un marcapasos, es decir, sincronizar sus oscilaciones entre sí, generando oscilaciones más robustas para regular la fisiología de otras células (Herzog, 2007).



**Aferencias:** Se trata de las vías de entrada sensorial de la información cíclica ambiental, a través de estas se transmite la información de las señales temporales externas hacia los osciladores (Kuhlman *et al.*, 2007).

**Eferencias:** Son las vías de salida de la información rítmica generada por los osciladores, dicha información se transmite a múltiples efectores para ser expresada a nivel conductual, fisiológico o molecular (Korf & von Gall, 2013).

Cabe mencionarse que, aunque la conceptualización del sistema circadiano se divide en tres entidades discretas, la conformación de estas entidades varía dependiendo de los organismos. Por ejemplo, en el caso de los seres unicelulares los tres componentes residen en la misma célula (Korf & von Gall, 2013).

En la actualidad este primer modelo ha sido rebasado por los descubrimientos recientes, ya que se sabe que existen múltiples osciladores en el organismo que interactúan para producir los diversos ritmos circadianos, a su vez los marcapaso y osciladores se retroalimentan y son regulados por los diversos procesos rítmicos dentro del organismo. Sin embargo, este modelo ha sido sumamente útil para conceptualizar las partes que integran al sistema circadiano y poco a poco a través de las aportaciones de la investigación integrar los componentes y funciones nuevos para crear un modelo más actual y complejo (Figura 1).



**Figura 1.** Esquema representativo de la organización del sistema circadiano en mamíferos. La información temporal de las señales ambientales es comunicada a través de las vías de entrada, esta información incide sobre la actividad del marcapasos (NSQ) y de los diversos osciladores periféricos (OP) en el organismo. El marcapasos es el encargado de coordinar la actividad de los osciladores, sincronizando así la ritmicidad

del organismo a la ocurrencia de las señales ambientales. La ritmicidad se expresa en el organismo a nivel conductual, fisiológico y molecular. A su vez está información rítmica incide sobre la actividad del marcapasos (NSQ) y los diversos osciladores (OP), mismos que se encuentran modulando la sensibilidad a las señales rítmicas.

## Bases Teóricas

Uno de los procesos más relevantes para el sistema circadiano es la sincronización, pues a través de este los osciladores internos ajustan su funcionamiento (fase y periodo) a la ocurrencia de las señales cíclicas ambientales. Dichas señales se denominan sincronizadores o *zeitgeber* (termino de origen alemán que se traduce literalmente como “dador de tiempo”) y fungen como guías para que un organismo se pueda orientar respecto al tiempo geofísico (Aschoff, 1981; Pittendrigh, 1981a, 1993). Para que la sincronización se lleve a cabo se deben cumplir tres condiciones: a) La señal ambiental sincronizadora debe ser regular y predecible, b) Los osciladores internos deben ser sensibles a esta señal, y c) La señal sincronizadora debe producir una corrección diaria de la fase del oscilador (Pittendrigh, 1981b).

En ausencia señales sincronizadoras, el ritmo exhibirá el periodo endógeno; a este fenómeno se le conoce como oscilación espontánea o libre corrimiento (Pittendrigh, 1960; Klein, 2004).

La luz actúa como la principal señal sincronizadora para los seres vivos, consecuentemente la gran mayoría de la literatura se ha enfocado al estudio de esta señal. Sin embargo, existen una amplia variedad de señales cíclicas no relacionadas con la luz llamadas señales no-fóticas, cuya eficacia y relevancia para el organismo depende de las características fisiológicas y los nichos ecológicos que este ocupe. Entre algunas de las señales no-fóticas capaces de modular los ritmos circadianos reportadas en la literatura, se encuentran la disponibilidad de alimento, las interacciones sociales conspecíficas e interespecíficas, la temperatura, la luna, la presión hidrostática y señales químicas volátiles entre otras (Bloch *et al.*, 2013).

La teoría sobre el sistema circadiano propone que a fin de que la sincronización se lleve a cabo la señal sincronizadora debe ajustar la fase y el periodo endógeno del oscilador haciendo una corrección diaria, para igualar el periodo del oscilador interno con el de la

señal externa ( $T \approx \tau$ ) (Pittendrigh, 1981b). Históricamente se han propuesto dos modelos teóricos para explicar los mecanismos a través de los cuales se lleva a cabo la sincronización.

El primero es conocido como Modelo de Sincronización Paramétrica también llamado continuo o tónico, establece que el sincronizador ejerce control sobre la fase y el periodo del marcapasos modificando su velocidad angular, la cual será proporcional a la intensidad de la señal sincronizadora. De modo que continuamente se ejercerá efecto sobre el oscilador acelerándolo en algunas fases del ciclo y desacelerándolo en otras (Daan & Aschoff, 2001; Roenneberg *et al.*, 2003).

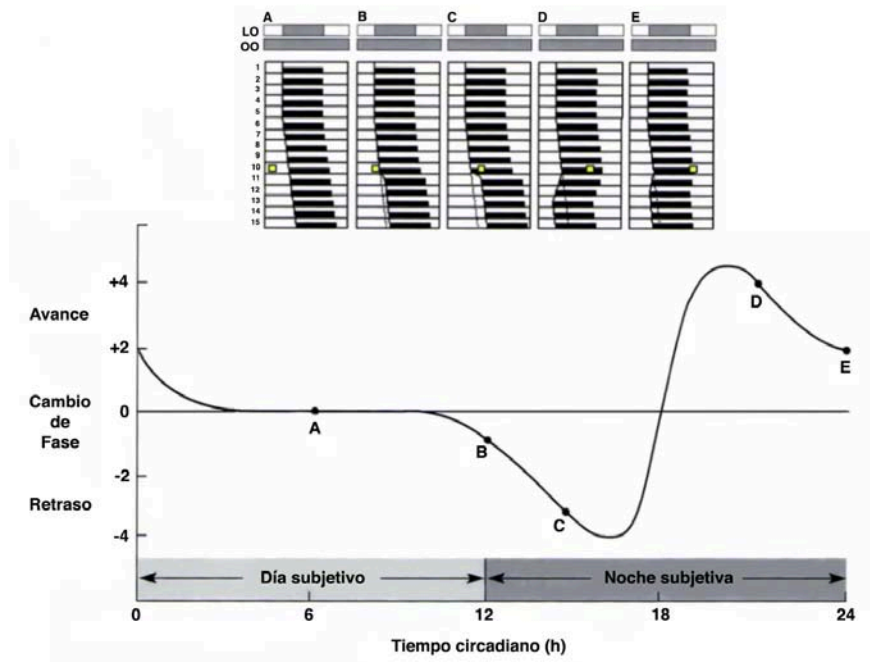
El segundo modelo llamado no Paramétrico, discreto, o fásico, plantea que el marcapasos será sensible al sincronizador solo en ciertas fases del ciclo. Por lo que de acuerdo a este modelo, la sincronización ocurre a través de un reinicio diario del oscilador, con avances o retrasos de fase (Daan & Aschoff, 2001; Roenneberg *et al.*, 2003).

Una de las herramientas más útiles para el estudio de los mecanismos de sincronización es la curva de respuesta de fase (CRF). La CRF es una representación gráfica de la dinámica de cierta variable bajo el control del oscilador circadiano, cuando un organismo es sometido a la estimulación con una posible señal sincronizadora en horas del día específicas. Si es una verdadera señal sincronizadora para el sistema circadiano del organismo, se producirán cambios de fase ( $\Delta\Phi$ ) en el ritmo de la variable en cuestión, los cuales dependerán del momento del ciclo en el que se haya presentado la señal (Decoursey, 1960; Golombek & Rosenstein, 2010).

En la Figura 2 se ejemplifica el proceso de construcción de una CRF, donde los bloques superiores representan actogramas de la actividad locomotora de varios individuos de una especie nocturna (A, B, C, D, E) los cuales después de estar en un ciclo luz oscuridad (LO), son sometidos a condiciones de oscuridad constante (OO). Varios ciclos después en cuanto el periodo endógeno de los individuos es evidente, los animales son estimulados con pulsos de luz (cuadro amarillo) en diferentes fases del ciclo. La fase en la que se aplica el estímulo se expresa en la escala de tiempo circadiano (TC), el día subjetivo se define entre TC0 y TC12 mientras que la noche subjetiva entre TC12 y TC24.

Para evaluar el cambio de fase en respuesta al estímulo, se toma como referencia el inicio de la actividad locomotora y se resta la fase inicial (antes del pulso) de la fase final (después del pulso) (Floessner & Hut, 2017).

Posteriormente se elabora un gráfico para representar la dirección y la magnitud de los cambios de fase en el que en el eje de las  $x$  se representa las fases del tiempo circadiano en horas en las que los pulsos de luz fueron administrados, mientras que en el eje de las  $y$  se representa los cambios de fase, graficándose como números negativos los retrasos y positivos los avances.



**Figura 2.** Construcción de una curva de respuesta de fase. (Descripción en el texto). (Modificada de (Dunlap *et al.*, 2003)).

Con base en la gráfica anterior, se pueden identificar tres zonas de respuesta, la zona muerta durante el día subjetivo donde no se generan cambios de fase, la zona de retrasos durante la primera mitad de la noche subjetiva y la zona de avances en la segunda mitad de la noche subjetiva. Este patrón es típico de las señales fóticas. También se ha descrito

un segundo patrón caracterizado por cambios de fase durante el día subjetivo y se ha asociado a señales no-fóticas (Golombek & Rosenstein, 2010).

Alternativamente los cambios de fase producidos por el estímulo presentado en las distintas fases circadianas se pueden representar en una curva de transición de fase en la que se grafica la fase anterior al estímulo vs la fase posterior al estímulo. La pendiente de esta grafica nos habla de la sensibilidad del oscilador al estímulo (Floessner & Hut, 2017).

### **Osciladores y marcapasos**

En organismos unicelulares se reconoce que cada célula actúa como un oscilador circadiano independiente, esto queda de manifiesto en especies como el dinoflagelado marino *Gonyaulax polyedra* o el hongo filamentoso *Neurospora crassa*, en las que se han registrado ritmos circadianos en la expresión genética, la división celular o la conidación en células aisladas (Lakin-Thomas & Brody, 2004; Bell-Pedersen *et al.*, 2005).

En organismos multicelulares con diferenciación de tejidos, se sabe que las funciones oscilatorias autónomas se han concentrado en un tipo particular de células acopladas entre sí, conocidas como marcapasos. Los marcapasos son los encargados de coordinar la ritmicidad específica de los tejidos, mantener la precisión y la coherencia rítmica en el organismo (Bell-Pedersen *et al.*, 2005).

La primera evidencia de la existencia de marcapasos circadianos autónomos se detectó en *Bulla gouldiana*. En este caracol marino las neuronas basales de la retina (NBR) son fotosensibles, se activan durante el día y permanecen en reposo durante la noche. Si el tejido es mantenido en cultivo, la actividad de las neuronas se sigue sincronizando con la luz del día y aún en oscuridad constante continúa siendo rítmica con un periodo de 23.74 horas en promedio. Cuando las neuronas son aisladas entre sí, estas presentan cambios rítmicos en la conductancia iónica. De manera que las NBR constituyen en si un sistema circadiano, las aferencias el oscilador y las eferencias estarían dentro de las mismas células ya que reciben la información temporal directamente de la luz al ser fotosensibles, sincronizan su actividad con el ciclo luz oscuridad y regulan la fisiología del resto de las células del caracol (Vansteensel *et al.*, 2008).

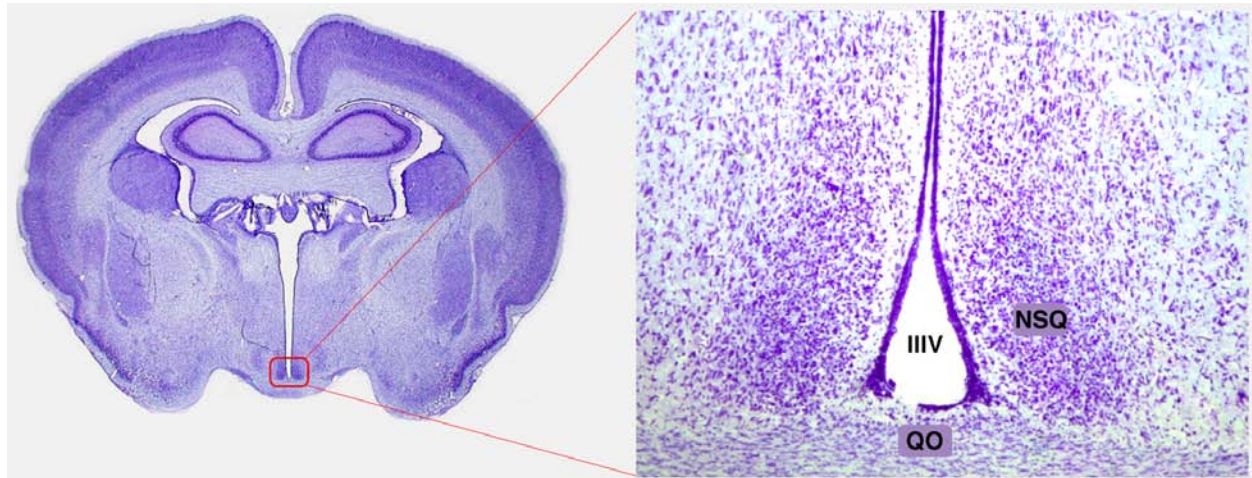
Entre los marcapasos ya identificados se encuentran las neuronas ventrolaterales del cerebro de *Drosophila melanogaster*, células de la retina de anfibios y aves, así como la glándula pineal de aves, peces y reptiles (Bell-Pedersen *et al.*, 2005).

### **El Núcleo Supraquiasmático: marcapasos de mamíferos**

En el caso de los mamíferos hay una estructura especializada alojada en el hipotálamo, que actúa como marcapasos en el sistema circadiano, regulando y coordinando la actividad de todos los osciladores internos, el Núcleo Supraquiasmático (NSQ).

La localización, tamaño relativo y la organización estructural del NSQ se encuentran altamente conservados entre los mamíferos. El NSQ es una estructura bilateral, situada dorsal al quiasma óptico y lateral al tercer ventrículo, en la zona peri-ventricular del hipotálamo anterior (Figura 3). Está constituido por una alta densidad celular, en murinos adultos se estima que está conformado por alrededor de 20,000 células (neuronas y astrogía). Su morfología varía a largo del eje rostrocaudal (Welsh *et al.*, 2010).

Anatómica y funcionalmente las poblaciones neuronales del NSQ se dividen en dos áreas: la región ventrolateral (NSQvl) también llamada marginal se encuentra adyacente al quiasma óptico y recibe la inervación de la retina, el principal neurotransmisor presente en las neuronas de esta región es el polipéptido vasoactivo intestinal (VIP), aunque también se puede encontrar en menor medida células que expresan calretinina, neurotensina, y el péptido liberador de la gastrina (GRP). La región dorsomedial (NSQdm) o interna envuelve parcialmente a la región ventral y está densamente inervada por esta, mientras que las proyecciones de la región dorsal hacia la ventral son más escasas. Se ha detectado abundante presencia de arginina vasopresina (AVP) en esta región, así como en menor medida angiotensina II y met-enkefalina. En la mayoría de las células del NSQ al mismo tiempo se expresa el ácido gama-aminobutírico (GABA), aunque también se presentan algunas neuronas glutamatérgicas. Cabe mencionar que la morfología del NSQ, la presencia y ausencia de neuropéptidos varía considerablemente entre especies (Moore *et al.*, 2002; Morin, 2007; Welsh *et al.*, 2010; Moore, 2013).



**Figura 3.** Microfotografía de un corte coronal del cerebro de un lagomorfo adulto con una tinción de Nissl mostrando la ubicación del NSQ. La imagen izquierda muestra un acercamiento al hipotálamo, QO: quiasma óptico, IIV: Tercer ventrículo, NSQ: Núcleo supraquiasmático.

La identidad del NSQ como principal marcapasos de mamíferos, fue revelada gracias a los trabajos realizados durante la década de los 70s por Robert Y Moore, Fred Stephan e Irvin Zucker. Moore fue el primero en describir una vía de comunicación no visual proveniente de la retina que inerva directamente al NSQ, conocida como tracto retino hipotalámico (TRH) (Moore & Lenn, 1972). Posteriormente tanto el grupo de Moore como el de Stephan y Zucker, publicaron los dos primeros fundamentos para la localización del principal marcapasos en mamíferos, demostrando a través de lesiones electrolíticas la participación del NSQ en la generación de los ritmos circadianos, pues su eliminación completa abate los ritmos de la secreción de corticosterona adrenal, actividad locomotora e ingesta de agua en roedores (Moore & Eichler, 1972; Stephan & Zucker, 1972). A partir de este momento, los estudios se enfocaron en la identificación de las propiedades de las células que conforman al NSQ. Los primeros estudios revelaron que las neuronas de este núcleo exhiben actividad metabólica diferencial a lo largo del día, presentando una mayor actividad a mitad de la fase luminosa, y una posterior disminución durante la fase oscura (Schwartz & Gainer, 1977).

Una de las primeras evidencias sobre la autonomía en el funcionamiento circadiano de las células que conforman el NSQ, se obtuvo aislando una isla de tejido hipotalámico, en animales previamente enucleados. Al medir la actividad eléctrica de áreas circundantes



al hipotálamo se observó la pérdida de la ritmicidad, mientras que la isla hipotalámica que contenía al NSQ fue capaz de sostener la ritmicidad aún sin la presencia de las conexiones neurales con el resto del cerebro (Inouye & Kawamura, 1979). De forma similar en estudios donde se monitoreó la actividad eléctrica de rebanadas hipotalámicas que contenían NSQ, se observaron oscilaciones sostenidas hasta por tres días (Green & Gillette, 1982). En conjunto estos trabajos indican que las neuronas del NSQ constituyen un marcapasos circadiano autónomo.

En uno de los trabajos pioneros que identificó al NSQ como el marcapasos circadiano en mamíferos publicado en 1984, ratas que recibieron una lesión electrolítica en el NSQ y que perdieron la función rítmica en la ingesta de agua, recibieron un trasplante de un bloque de tejido fetal de hipotálamo anterior que contenía NSQ, después de 4 semanas el ritmo diurno fue recuperado (Drucker-Colín *et al.*, 1984). Por otro lado, haciendo uso de la mutación autosómica tau, descubierta en el hámster dorado *Mesocricetus auratus*, la cuál acorta el periodo de actividad del animal en oscilación espontánea ( $\tau=20$ ), se llevó a cabo un elegante estudio donde hámsters con una lesión completa del NSQ y por ende arrítmicos, recibieron un trasplante de hipotálamo fetal. Dicho trasplante fue capaz de restaurar los ritmos circadianos de actividad locomotora del animal hospedero, con el periodo endógeno y la fase del ritmo del donador (Ralph *et al.*, 1990). Estudios posteriores demostraron que inclusive si se utilizaban células del NSQ en suspensión, la ritmicidad en la actividad locomotora era restaurada (Silver *et al.*, 1990). Lo cual indica que, para ritmos como la actividad locomotora, no es necesaria la integridad estructural del NSQ.

A nivel celular, se sabe que las células del NSQ aisladas exhiben oscilaciones circadianas en su actividad eléctrica, esto significa que cada célula es capaz de oscilar de forma independiente (Welsh *et al.*, 1995). Sin embargo, mientras que las células disociadas exhiben grandes variaciones en el periodo y fase, en los explantes de tejido de NSQ la distribución del periodo y las fases son más estables. Por lo que se plantea que la sincronización entre las células del NSQ se lleva a cabo a través de uniones comunicantes, la comunicación con la glía, la liberación de neurotransmisores locales dependientes de fase, la señalización paracrina y la comunicación glutamatérgica



ipsilateral. (Colwell, 2011; Tso *et al.*, 2017). Lo anterior sugiere que el intrincado acoplamiento que se da entre las células del NSQ no solo depende de las oscilaciones independientes de cada célula si no de la comunicación entre ellas, a su vez, de este depende el acoplamiento con los diversos osciladores presentes en el cuerpo y finalmente la expresión coherente de la ritmicidad en el organismo (Aton & Herzog, 2005; Liu *et al.*, 2007).

Estas, y otras numerosas evidencias constataron que el NSQ funciona como una entidad anatómica encargada de generar y mantener el acoplamiento entre la ritmicidad circadiana de los numerosos osciladores del cuerpo.

### **Mecanismos moleculares de la generación de la ritmicidad: los genes reloj**

Los primeros trabajos para dilucidar los mecanismos de generación de la ritmicidad circadiana utilizaron como modelo insectos, debido a la practicidad de trabajar con organismos menos complejos en cuanto a la manipulación genética. Durante la década de los 70s se identificó la mutación de un gen en el cromosoma X de la mosca de la fruta, *D. melanogaster*, una de las variantes modificaba la duración del periodo del ritmo de actividad y de eclosión mientras que la otra hacia al organismo arrítmico, el gen fue llamado Periodo (*Per*) (Konopka & Benzer, 1971). A partir del descubrimiento del gen *Per* en moscas y su participación en la generación de la ritmicidad circadiana, se fueron agregando componentes al reloj mediante manipulaciones genéticas y análisis de fenotipos conductuales, aunado al estudio de los componentes moleculares que interactuaban con el gen *Per* (Ko & Takahashi, 2006; Takahashi *et al.*, 2008).

Actualmente se sabe que a nivel molecular los mecanismos del reloj circadiano comparten homología entre especies, son altamente conservados, ya que en todos los taxa coincide con la formación asas de transcripción/traducción autoreguladas negativa y positivamente a través de las cuales, se lleva a cabo la producción rítmica del RNA y de las proteínas involucradas en el reloj circadiano (Bell-Pedersen *et al.*, 2005; Ko & Takahashi, 2006; Webb & Oates, 2016).

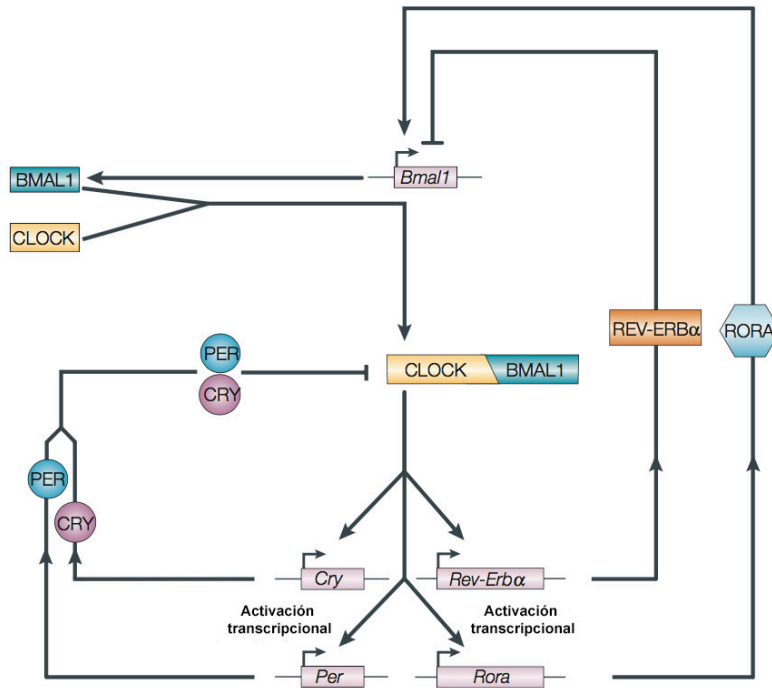
En mamíferos se propone que, en la parte central del asa molecular, se encuentran cuatro factores transcripcionales, dos activadores *Circadian Locomotor Output Cycles Kaput*

(CLOCK, por sus siglas en inglés) y *Brain and Muscle Aryl hydrocarbon receptor translocator-like protein 1* (BMAL1, por sus siglas en inglés) y dos represores *Period* (PER, por sus siglas en inglés) y *Cryptochrome* (CRY, por sus siglas en inglés).

Al inicio del día en citoplasma de cada célula, se da la formación del heterodímero CLOCK-BMAL1 el cual se transloca al núcleo y activa la transcripción al unirse a las cajas E en el dominio (CACGTG) de los promotores de tres genes *Per1*, *Per2* y *Per3* y dos genes *Cry1* y *Cry2*. En el transcurso del día *Per* y *Cry* son traducidos, al final del día el nivel de sus respectivas proteínas aumenta, propiciando la formación del heterodímero PER-CRY que se transloca del citoplasma al núcleo de la célula para inhibir la actividad de CLOCK-BMAL1 y por tanto su propia transcripción. El balance en los niveles de las proteínas PER y CRY y por consecuencia el tiempo de la entrada al núcleo es regulado por las cinasas CKI (casein cinasa I) o CK (casein cinasa) que fosforilan a PER para estimular su degradación proteosomal, mientras que el complejo FbxL3 de ubiquitina E3 ligasa regula la degradación de CRY (Figura 4) (Mohawk *et al.*, 2012).

Existen asas adicionales que se entrelazan con el asa central, en estas se encuentran involucrados los receptores nucleares huérfanos relacionados con retinoides *Rev-erb*  $\alpha, \gamma$  y *Ror* a, b y g. El heterodímero CLOCK-BMAL1 activa la transcripción de *Rev-erb* y *Ror*. A su vez los productos proteicos REV-ERB y ROR regulan la transcripción del *Bmal1* al competir por la unión con elementos de respuesta a los receptores huérfanos relacionados con retinoides (ROREs) presentes en el promotor de *Bmal1*. Mientras que REV-ERB actúa regulando negativamente, ROR activa la transcripción de *Bmal1* (Panda *et al.*, 2002; Reppert & Weaver, 2002; Ko & Takahashi, 2006; Mohawk *et al.*, 2012; Zheng & Sehgal, 2012).

Toma cerca de 24h para completar un ciclo de esta asa autoregulada de retroalimentación, por lo cual se dice que constituye un reloj molecular, el cuál genera la ritmicidad en cada una de las células que lo expresan.



**Figura 4.** Mecanismo molecular propuesto para la generación de la ritmicidad circadiana en mamíferos: Asa de retroalimentación transcripcional y traduccional que involucra al activador transcripcional CLOCK-BMAL1 y a sus genes blanco *Per*, *Cry* cuyos productos regulan negativamente la acción del dímero, y a los genes *Rev-Erbα* y *Rora* cuyos productos ejercen una regulación negativa y positiva respectivamente sobre *Bmal1*, regulando así su propia transcripción. (Modificado de Bell-pedersen et al., 2005).

### Aferencias y eferencias del sistema circadiano de mamíferos

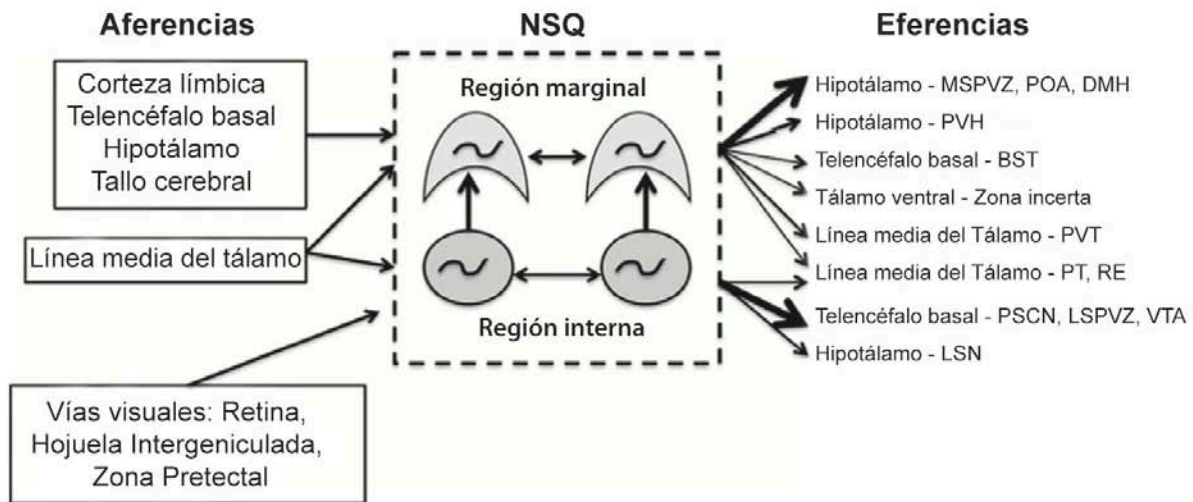
Como se mencionó anteriormente las aferencias y eferencias son las vías de comunicación de la información rítmica al marcapasos (Figura 5). En el caso de las aferencias se han caracterizado tres vías importantes:

**Tracto retinohipolámico (TRH).** En mamíferos es la única vía directa de entrada de la información temporal luminosa hacia el marcapasos circadiano. Es una vía monosináptica que se forma de los axones de las células ganglionares de la retina y converge en el NSQ (Moore & Lenn, 1972).

A diferencia de otros vertebrados que poseen fotorreceptores extraoculares, en mamíferos las únicas células fotosensibles se encuentran en la retina, las células ganglionares de la retina intrínsecamente fotosensibles o por sus siglas en inglés ipRGs, dichas células expresan el fotorreceptor melanopsina (Berson, 2003).

La vía de señalización que activa a las neuronas del NSQ en respuesta a estímulos fóticos, comienza cuando las ipRGs al ser estimuladas con un pulso de luz, liberan glutamato y polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria (PACAP) en los contactos sinápticos de las células del NSQ. El glutamato actúa en los receptores NMDA y AMPA despolarizando la membrana de las células del NSQ, lo que conlleva de forma directa e indirecta a la entrada de iones de calcio, los cuales activan una compleja red de transducción de señales a través de cinasas, entre las que participan la cinasa dependiente de calcio-calmodulinas (CaMK), la cinasa activada por mitógenos (MAPK) y la cinasa A (PKA). La activación de las cinasas promueve la fosforilación del elemento de unión en respuesta a AMPc (CREB), la activación de CREB induce la transcripción de genes al unirse a los elementos de respuesta a calcio/AMPc (CREs). Los promotores de los genes *Per1* y *Per2* poseen sitios de unión CREs para CREB, por tanto, la transcripción de estos genes reloj puede ser inducida por pulsos de luz durante la noche subjetiva. Pulsos de luz durante la noche también son capaces de inducir la transcripción de genes de expresión temprana como *c-Fos*, *fos B*, y *junB*, ya que los promotores de estos genes poseen secuencias CRE que probablemente emulen el mecanismo de inducción luminosa de los genes *Per1* y *Per2*. De esta manera la respuesta del NSQ a las señales luminosas está modulada de forma temporal (Caldelas *et al.*, 1998; Hirota & Fukada, 2004; Carlezon *et al.*, 2005; Michel *et al.*, 2006; Dibner *et al.*, 2010; Welsh *et al.*, 2010).

**El tracto genículo hipotalámico (TGH).** Este tracto se origina de neuronas de la hojuela intergeniculada (IGL), una región del cuerpo geniculado lateral del tálamo a la que el TRH también proyecta bilateralmente. El TGH en roedores mayormente inerva la región marginal del NSQ y representa una vía indirecta de la entrada de la información fótica. Las fibras del TGH liberan neuropéptido Y (NPY), que predominantemente inhibe las células del NSQ, adicionalmente también se libera GABA para reforzar la naturaleza inhibitoria de la proyección (Moore, 2013; Morin, 2013).



**Figura 5.** Resumen de las principales conexiones del NSQ. BST, núcleo del lecho de la estra terminal; DMH, núcleo dorsomedial del hipotálamo; LSN, núcleo septal lateral; POA, área preóptica; PT, núcleo paratenial; PSCN, núcleo perisupraquiasmático; PVH, núcleo paraventricular del hipotálamo; PVT, núcleo paraventricular del tálamo; RE, núcleo reuniens; LSPVZ, área subparaventricular lateral; MSPVZ, área subparaventricular medial; VTA, área tuberal ventral; ZI, zona incerta. (Modificado de Moore, 2013).

**El núcleo medial del Rafé (MR).** Inerva la zona ventrolateral del NSQ y libera serotonina en sus contactos sinápticos. Ambas aferencias (TGH y MR) en animales nocturnos, participan en ajustar el inicio de la actividad con el comienzo de la fase oscura. Se ha propuesto estas aferencias pueden transmitir información no-fótica hacia el NSQ, como la temperatura o el movimiento. A través de estas vías diversos estímulos también pueden ejercer influencia como sincronizador de los ritmos circadianos (Mikkelsen & Vrang, 1994; Moore *et al.*, 2002; Aguilar-Roblero *et al.*, 2004; Morin & Allen, 2006).

Además de estas tres vías también se han encontrado otras aferencias al supraquiasmático que se originan de estructuras hipotalámicas, por ejemplo, las neuronas orexigénicas del hipotálamo lateral inervan densamente al NSQ, la orexina altera la actividad neuronal del NSQ y actúa para acentuar la acción del NPY, lo cual implica que esta conexión también comunica información no-fótica (Burt *et al.*, 2011). El PVT también participa como modulador de la respuesta del NSQ a la luz, principalmente

durante el final de la noche; además de ser una vía de entrada de información visceral y de modalidades sensoriales no-fólicas hacia el NSQ (Salazar-Juárez *et al.*, 2002).

Las inervaciones del TRH, TGH y del MR convergen particularmente en la zona ventral del NSQ. Por lo que se piensa que las neuronas del NSQ estarán integrando la información fólica y no-fólica para adaptar la fase del reloj molecular y conseguir la sincronización del sistema circadiano a las señales ambientales externas (Moore, 2013; Morin, 2013).

### ***Vías eferentes***

Como marcapasos circadiano el NSQ debe sincronizar al resto de los osciladores presentes en el organismo, este proceso se logra gracias a la comunicación de las señales rítmicas a otras áreas cerebrales encargadas del control de los procesos fisiológicos, metabólicos y conductuales de los mamíferos (Buijs & Kalsbeek, 2001; Saper, 2013). A través de marcajes anterógrado y retrogrado de las neuronas del NSQ se ha demostrado que existen conexiones sinápticas directas e indirectas con varias regiones cerebrales, como son el hipotálamo, el telencéfalo basal, el tálamo ventral y la región medial del tálamo, el sistema olfativo, límbico y los órganos circumventriculares (Krout *et al.*, 2002; Moore, 2013).

Se ha demostrado que muchos núcleos hipotalámicos, proyectan recíprocamente al NSQ y están implicados en la regulación circadiana de distintas funciones fisiológicas entre estos se encuentran: el área preóptica (POA), el núcleo paraventricular (PVN), el núcleo subparaventricular dorsal (SPZd) relacionado con el control de la temperatura corporal, el núcleo subparaventricular ventral (SPZv) implicado en el control de niveles de actividad locomotora, el ciclo de sueño-vigilia, y el núcleo dorsomedial (DMH) implicado en el control de la actividad locomotora, el sueño, la alimentación y niveles de secreción de hormonas relacionadas con el estrés (Watts *et al.*, 1987; Chou *et al.*, 2003; Saper *et al.*, 2005; Abrahamson & Moore, 2006; Morin, 2007, 2013). Por lo que se plantea que algunas de las conexiones directas del NSQ con áreas cerebrales específicas son el primer relevo de las vías de sincronización más complejas, que eventualmente regulan la ritmicidad del organismo entero.

Existe también una especialización en la organización de las aferencias y eferencias en la anatomía del NSQ. El cerebro basal, la corteza límbica, el área septal y el tallo cerebral proyectan principalmente a la zona interna del NSQ, mientras que las proyecciones de la IGL, el MR y la retina se dirigen a la región marginal. Las proyecciones eferentes al MSPVZ, POA, DMH, PVH, BST, ZI, PVT, PT y RE provienen de la zona interna, mientras que las que inervan al PSCN, LSPVZ, VTA y LSN provienen de la región marginal (Abrahamson & Moore, 2001; Vrang *et al.*, 2003; Kriegsfeld *et al.*, 2004; Deurveilher & Semba, 2005; Morin & Allen, 2006; Morin, 2007).

Se considera que diversos núcleos cerebrales, principalmente el hipotálamo adyacente y los osciladores periféricos, comunican señales temporales internas al NSQ que influyen en su actividad. En dicha comunicación pueden estar implicadas diversas señales intracelulares como, desfosforilación, acetilación, metilación, cambios de pH, o el estado de oxidación, señales extracelulares como neurotransmisores, intercambios iónicos transmembranales, melatonina, el alimento, presión sanguínea, y la actividad locomotora, entre otros (Dibner *et al.*, 2010; Mohawk *et al.*, 2012; Saper, 2013). Finalmente, todas las señales rítmicas entrantes y salientes interactúan, estas son integradas para regular el estado fisiológico del organismo formando así una compleja red de regulación homeostática (Buijs & Kalsbeek, 2001; Buijs *et al.*, 2016).

## **Los osciladores periféricos en mamíferos**

La naturaleza autónoma de los ritmos circadianos establece que en los organismos multicelulares cada célula puede funcionar como un oscilador, por lo que teóricamente en un mismo organismo existen múltiples osciladores. Gracias al descubrimiento de la maquinaria molecular necesaria para la generación de los ritmos circadianos, ha sido posible comprobar que la expresión rítmica de los genes reloj no es exclusiva del NSQ, ya que los genes reloj se expresan con ubiquidad en las células de mamífero (Takahashi, 2016).

Utilizando la técnica de la bioluminiscencia<sup>1</sup> en las últimas décadas se ha demostrado que un número importante de tejidos exhiben oscilaciones de los componentes centrales del asa circadiana. A nivel de sistema nervioso central (SNC) se han registrado oscilaciones rítmicas de genes reloj en diversos núcleos del tálamo y del hipotálamo tales como el núcleo paraventricular, el núcleo arcuato, la amígdala, el cerebelo, la retina y el bulbo olfativo (BO) (Abe *et al.*, 2002; Granados-Fuentes *et al.*, 2004a; Guilding & Piggins, 2007). Explantes de otros tejidos del cuerpo como hígado, riñón, vaso, páncreas, corazón, estómago, músculo esquelético, pulmones, cornea, glándula tiroidea, glándula adrenal e inclusive fibroblastos en cultivo, exhiben oscilaciones circadianas en la expresión de los genes reloj (Balsalobre *et al.*, 1998; Reppert & Weaver, 2002; Nagoshi *et al.*, 2004; Guilding & Piggins, 2007; Dibner *et al.*, 2010). La evidencia anterior indica que los osciladores periféricos en términos de maquinaria molecular son similares al NSQ.

Una disparidad que se detectó entre los osciladores periféricos y el NSQ en los primeros trabajos con ratones *Per1-luc*, fue la robustez de las oscilaciones de algunos genes reloj. Cuando explantes de tejido periférico eran mantenidos en cultivo por varios días presentaban una disminución progresiva en la amplitud del ritmo de expresión de *Per1*, en contraste con los explantes de NSQ que seguían oscilando después de semanas (Yamazaki *et al.*, 2000; Yamamoto *et al.*, 2004). Posteriormente, se demostró utilizando el promotor de *mPer2* como reportero, que las oscilaciones de los genes reloj en los osciladores periféricos también eran auto-sostenidas (Yoo *et al.*, 2004).

Sin embargo, a pesar de que los mecanismos moleculares y las oscilaciones a nivel celular sean similares, existe una diferencia fundamental entre el NSQ y los osciladores periféricos: Las interacciones intercelulares especializadas que ocurren en el NSQ y que le otorgan la identidad de marcapasos circadiano. En un estudio realizado por Liu y colaboradores (2007) examinaron la persistencia y dinámica de las oscilaciones del asa de retroalimentación del reloj circadiano en ratones y concluyeron que en ausencia de

---

<sup>1</sup> Técnica de manipulación genética en la que se hace uso de las enzimas luciferasas y su sustrato las luciferinas, que al ser oxidadas liberan energía en forma de luz. En ella se emplea un roedor transgénico, que expresa el gen de la luciferasa, bajo el control del promotor de un gen de interés por ejemplo *mPer1* (*Per1-luc*). Cuando *Per1* se expresa en el roedor *Per-luc*, hay una consecuente emisión de luz que proporciona un reporte en tiempo real de la expresión del gen (Welsh *et al.*, 2005).



algunos componentes individuales del asa del reloj molecular, la ritmicidad del NSQ es rescatada gracias al acoplamiento de sus células, en comparación con los tejidos periféricos en los que el acoplamiento parece ser débil, pues la pérdida de los componentes del asa molecular compromete la generación de la ritmicidad (Liu *et al.*, 2007; Evans *et al.*, 2012). Por lo que se considera que la existencia de un acoplamiento débil entre las células de los osciladores periféricos es una propiedad adaptativa, ya que les permitiría responder de forma más rápida y flexible, no solo a las señales sincronizadoras provenientes del NSQ, sino también a otras señales que fuesen relevantes como las metabólicas o conductuales (Hastings & Herzog, 2004; Buhr *et al.*, 2010).

### **El BO como un posible oscilador independiente en mamíferos**

El hallazgo de la expresión de la maquinaria molecular del reloj en casi todos los tipos celulares de mamíferos, puso de manifiesto la posibilidad de que otros tejidos pudieran regular los cambios circadianos en su fisiología específica de forma independiente al NSQ, por ejemplo, el caso de la retina, explantes de este tejido exhiben ritmos circadianos en la síntesis de melatonina hasta por 5 días, a su vez estos ritmos son capaces de sincronizarse a ciclos de luz oscuridad (Tosini & Menaker, 1996).

El BO es otra de las estructuras candidatas a regular su fisiología de forma independiente. En condiciones *in vitro* el BO ha mostrado oscilaciones robustas por varios ciclos, en la expresión de *Per1* y en la tasa de disparo de sus neuronas, además dichos ritmos mostraron ser sincronizables por rangos de temperatura fisiológicos, pero al mismo tiempo compensar la temperatura en su periodo. Las oscilaciones producidas por las neuronas del BO aparecen muy temprano en el desarrollo de roedores alrededor de día embrionario 17 (Granados-Fuentes *et al.*, 2004a). Adicionalmente, cuando las oscilaciones de los genes reloj en el NSQ, el ritmo de ingesta de alimentos y el de actividad locomotora son perturbados por condiciones de luz constante, el BO sigue expresando oscilaciones robustas de *Per1*. Aun en ausencia de un NSQ funcional y con la pérdida de la ritmicidad conductual, los ritmos de expresión *in vitro* de *Per1* en el BO siguen sin ser afectados (Granados-Fuentes *et al.*, 2004b). Estas evidencias indican que la ritmicidad del BO no depende de las señales rítmicas del NSQ para sostenerse.

El BO es el encargado de generar ritmos diarios en la sensibilidad olfativa, que persisten en condiciones de oscuridad continua y controlan la actividad rítmica de las células de la corteza piriforme. La ritmicidad que los roedores exhiben en la discriminación olfativa, se mantiene en animales con lesión de NSQ y deficientes del gen *Npas2*, pero es dependiente de la expresión de los genes canónicos del reloj molecular y de la presencia de VIP y su receptor VPAC2R pues el ritmo de la discriminación olfativa se pierde en mutantes de *Bmal1*, *Per1-Per2* y VIP-VPAC2R (Granados-Fuentes *et al.*, 2006, 2011; Miller *et al.*, 2014).

Antes de que se señalará al BO como un oscilador independiente ya existía evidencia indirecta de su participación en el sistema circadiano, se sabe que su eliminación en roedores y hámsters produce alargamiento del periodo de actividad locomotora en oscilación espontánea (Possidente *et al.*, 1990), de igual forma su eliminación en machos de *Octodon degus* retrasa el proceso de resincronización fótica (Goel *et al.*, 1998). Adicionalmente, se sabe que estimulación olfatoria aplicada a ciertas horas del día, incrementa la magnitud de los cambios de fase producidos por pulsos de luz, en la actividad locomotora y la expresión de la proteína c-Fos en el NSQ, además de alargar el periodo del ritmo de actividad locomotora (Amir *et al.*, 1999). En animales con una lesión completa del NSQ la estimulación olfativa diaria es capaz de provocar la recuperación parcial del ritmo de actividad locomotora, sin embargo cuando se trata de un mutante *cry1<sup>-/-</sup>/cry2<sup>-/-</sup>*, este efecto se pierde lo que indica que la modulación circadiana que ocurre por las señales olfativas, depende de la existencia de un reloj molecular funcional (Abraham *et al.*, 2013).

Todas estas evidencias indican que el BO es una estructura particular dentro del sistema circadiano de mamíferos, ya que posee características propias de un oscilador periférico, sin embargo, también emula algunas de las características intrínsecas del NSQ.

## Desarrollo de los ritmos circadianos

### Neurogénesis del NSQ

En los mamíferos, la primera exposición a un ambiente rítmico ocurre in útero, en donde los fetos se encuentran bajo la influencia de señales rítmicas no-fólicas provenientes de la madre, tales como fluctuaciones en los niveles de hormonas, oxígeno, nutrientes, motilidad uterina, temperatura, así como su actividad general. Se cree que dichas señales juegan un papel importante en el desarrollo del incipiente sistema circadiano de las crías, pues es durante dichas etapas que la conformación del hipotálamo y la diferenciación de las células del NSQ tienen lugar.

Pese a que se pueden hacer algunas generalizaciones, existen diferencias importantes entre especies, sobre el momento preciso en el que ocurren ciertos eventos en el desarrollo del sistema circadiano, como el inicio y final de la citogénesis del NSQ o la maduración completa del TRH. En el caso de seres humanos, primates no humanos y ovejas estos eventos ocurren antes del nacimiento, mientras que, en roedores como ratas, ratones o hámster ocurren entre el último tercio de la gestación y las primeras semanas posnatales (Serón-Ferré *et al.*, 2012; Bedont & Blackshaw, 2015).

La formación del hipotálamo anterior (AH) comienza como una unidad que posteriormente se dividirá en dos zonas distintas, una división ventral que da lugar al NSQ y otras regiones encargadas de la homeostasis del sueño, y una división dorsal que da lugar a los núcleos del sistema neuroendocrino (Shimogori *et al.*, 2010; Bedont *et al.*, 2015). El NSQ se origina de células del neuroepitelio del diencefalo ventral anterior, al igual que en muchas áreas cerebrales el desarrollo del NSQ es heterocrónico, se ha observado que en general, existen dos gradientes de neurogénesis, en el primero se forman las células de la región ventrolateral y posteriormente las células de la región dorsomedial. La generación más importante de glía ocurre durante la última parte de este periodo de neurogénesis, posteriormente la formación de glía es limitada (Davis *et al.*, 1990; Munekawa *et al.*, 2000; Antle *et al.*, 2005; Kabrita & Davis, 2008).

Aunque muy pocas células aparecen en el NSQ posnatalmente, todo el proceso de maduración de la morfología de neuronas y glía termina pocas semanas después del nacimiento. En roedores las mediciones del volumen del núcleo indican que posnatalmente existe un aumento de más del 50%, debido a que la producción de células nuevas es nula, la gran mayoría de este crecimiento se debe a la formación de sinapsis, pues representa el desarrollo de los neuropilos (Antle *et al.*, 2005).

### **Ritmos circadianos prenatales**

Los mecanismos neuroanatómicos encargados de la generación de los ritmos circadianos se desarrollan y son funcionales desde etapas prenatales. Las evidencias experimentales indican que basta la presencia de las neuronas del NSQ para que roedores comiencen a exhibir ritmicidad, por ejemplo, el ritmo de metabolismo de glucosa detectado en el día embrionario 19 (E19) en ratas (Reppert & Schwartz, 1984), la oscilación en los niveles de ARNm de vasopresina en E21, y el ritmo en la actividad eléctrica en E22 (Shibata & Moore, 1987). La situación en primates es similar, se alcanza a detectar un ritmo de metabolismo de glucosa en el último tercio de la gestación (Rivkees *et al.*, 1988; Rivkees, 2003).

En general en mamíferos la mayor parte de los componentes centrales del asa molecular del reloj circadiano están presentes al llegar al 90% del avance en la gestación, y la gran mayoría son rítmicos en la primera semana posnatal (Sládek *et al.*, 2004; Li & Davis, 2005; Kováčiková *et al.*, 2006; Seron-Ferre *et al.*, 2007). Existen diferencias atribuidas a las especies y la aproximación metodológica. En el NSQ fetal de monos capuchinos el ARNm de *Bmal1* y *Per2* se expresan y oscilan en antifase, con una amplitud menor comparada con el NSQ de adultos (Torres-Farfan *et al.*, 2006). Mientras que estudios *in vivo* de la ritmicidad del NSQ fetal de ratas muestran que la expresión de los transcritos de los genes reloj es baja y es hasta la etapa posnatal que exhibe características similares a las observadas en adultos (Sládek *et al.*, 2004; Sumová *et al.*, 2008). En contraste con lo anterior estudios *in vitro* en ratones utilizando el reportero *Per1* y *Per2:luc* encontraron oscilaciones del ARNm de *Per 2* desde E13.5, E15 y E17 y *Per1* en E21 (Ohta *et al.*, 2008; Wreschnig *et al.*, 2014; Landgraf *et al.*, 2015). El desarrollo de estos ritmos implica que las neuronas del NSQ nacen como osciladores circadianos aislados.

## Sincronización materna en etapas tempranas del desarrollo

Una vez que la función rítmica se desarrolla en la etapa prenatal, el sistema circadiano del feto es sincronizado por señales no-fólicas provenientes de la madre. Se ha demostrado que lesiones del NSQ en hembras gestantes generan desincronización entre crías de la misma camada, por ejemplo en los ritmos de síntesis de melatonina de ratas y los ritmos de actividad reposo de hámsteres en etapas posnatales (Reppert & Schwartz, 1986a; Davis & Gorski, 1988). Por lo que con la pérdida de la ritmicidad conductual en la madre, se pierden las posibles señales que sincronizan el sistema circadiano de las crías.

La identidad de las posibles señales sincronizadoras no es del todo clara, entre las posibles candidatas están hormonas como la melatonina, prolactina y corticosterona capaces de traspasar la placenta. Inyecciones en momentos específicos del día de melatonina en el NSQ de hámsters gestantes, previamente lesionados, fue capaz de restaurar la sincronía en la camada (Davis & Mannion, 1988), a su vez, cuando la melatonina es administrada directamente en las crías de la camada, también es capaz de sincronizarlas, sin embargo el efecto es dependiente del desarrollo ya que se pierde a partir del día posnatal 6 (P6) (Grosse *et al.*, 2005). No obstante, lesiones en la pineal, las adrenales, la tiroides y paratiroides, la pituitaria o los ovarios no fueron capaces de eliminar el efecto de la sincronización materna (Reppert & Schwartz, 1986b). Por otro lado, en el NSQ fetal hay una marcada expresión de receptores dopaminérgicos D1, la cual se modifica durante el desarrollo (Weaver *et al.*, 1992). La administración de agonistas de la dopamina tal como la cocaína, es capaz de inducir la expresión de c-Fos en el NSQ fetal (Viswanathan & Davis, 1997), además de que la administración periódica del agonista de la dopamina SKF38393 en hembras gestantes con lesión en el NSQ, es capaz de sincronizar a las crías (Viswanathan *et al.*, 1994), por lo que se considera que el sistema dopaminérgico también está implicado en la sincronización materna fetal.

Ciclos de restricción de alimento en hembras gestantes, también han demostrado tener efectos sobre la expresión de *Per1* en el NSQ e hígado fetal. A pesar de que el ciclo de restricción de alimento no es capaz de sincronizar la expresión de *Per1* en el NSQ materno, el hígado y el NSQ de la cría presenta un importante cambio de fase en la expresión *Per1* asociado a la restricción de alimento (Ohta *et al.*, 2008).

Todas estas evidencias indican que la sincronización maternal fetal se logra por la participación de una o varias de las señales antes mencionadas y serían diversos los mecanismos que estarían involucrados.

### **Sincronización materna posnatal**

En especies altriciales la influencia materna durante los primeros días de vida sigue siendo importante, debido al estado de inmadurez, los neonatos dependen totalmente del cuidado materno para sobrevivir. En el caso del sistema circadiano de roedores, el desarrollo de las inervaciones de las células IpRGC al NSQVI es gradual y en gran parte ocurre posnatalmente, es hasta P10-15 que la densidad de las proyecciones son similares a lo observado en adultos (Moore & Bernstein, 1989; Sekaran *et al.*, 2005), además la maduración de las aferencias es necesaria para ciertos eventos en la diferenciación de las neuronas y en la maduración de los astrocitos del NSQ (Munekawa *et al.*, 2000).

Debido a que las vías de entrada de la información fótica maduran posnatalmente, en esta etapa las señales no-fóticas provenientes de la madre, como los estímulos somatosensoriales, el alimento, o la temperatura representan señales relevantes para la sincronización del sistema circadiano de las crías. La influencia materna sobre la ritmicidad circadiana de los neonatos se ha estudiado utilizando modelos de madres nodrizas con fases opuestas del ritmo de actividad, así como crías enucleadas al momento de nacimiento para eliminar la influencia de las señales fóticas, y se ha reportado que el ritmo de actividad locomotora de las crías se sincroniza a la fase de la hembra nodriza (Davis & Gorski, 1985; Reppert & Schwartz, 1986b). En este sentido Ohta y colaboradores (2003) encontraron que en ratas neonatas ciegas por enucleación la privación materna funciona como una señal no-fótica mucho más eficaz para sincronizar la maquinaria molecular del NSQ, en comparación con la presentación continua de hembras nodrizas (Ohta *et al.*, 2003). Sin embargo, aún se desconoce cuál es la contribución de las señales provenientes de la hembra en la sincronización del sistema circadiano de las crías, puesto que en estos estudios resulta difícil discernir el efecto de cada señal.

## El conejo europeo: modelo para el estudio de la sincronización materna durante el desarrollo

La particular conducta madre-cría adaptada a la alta depredación del conejo europeo *Oryctolagus cuniculus*, nos ofrece un excelente modelo natural de sincronización no-fótica durante etapas tempranas del desarrollo. Después de alrededor de 31 días de gestación la hembra construye una madriguera subterránea, la que abandona minutos después de parir y a la que regresa una vez al día. Al nacer los conejos permanecen, bajo condiciones de oscuridad continua, aislados de señales ambientales. La única señal cíclica proviene de la hembra lactante, la cual todos los días acude brevemente y permanece de 3-5 minutos en el nido para alimentar y acicalar a los conejos, los cuales pueden ingerir entre el 20-30% de su peso corporal en cada evento de amamantamiento (Zarrow *et al.*, 1965).

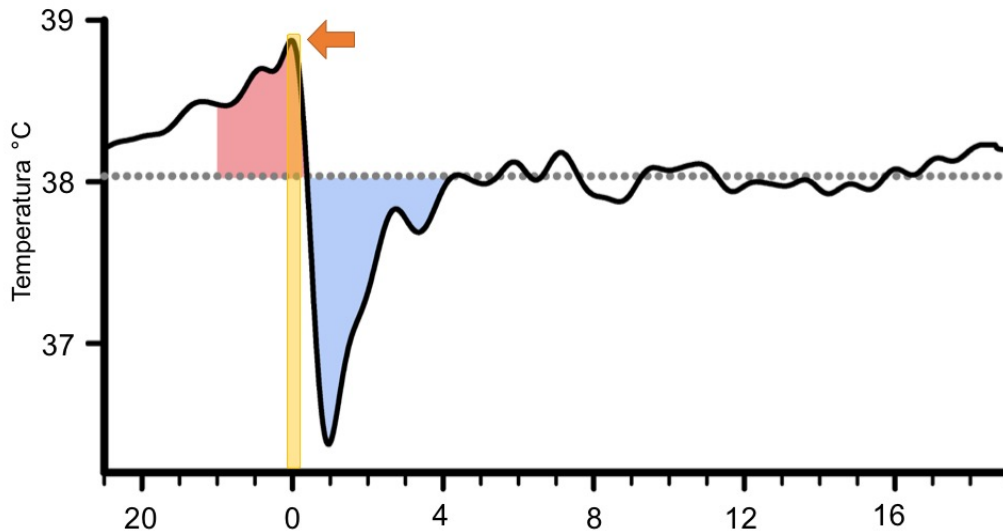
A nivel conductual y fisiológico, los conejos neonatos presentan un patrón de ritmicidad diurna en su temperatura corporal y actividad dentro del nido (Figura 6), el cual tiene una estrecha relación con el evento diario del amamantamiento. Dentro de este patrón se ha caracterizado tres etapas importantes (Hudson & Distel, 1982; Jilge, 1995; Trejo-Muñoz *et al.*, 2012):

**1) La anticipación al amamantamiento:** En donde aproximadamente dos horas previas al evento de amamantamiento, las crías exhiben un notorio incremento en su actividad locomotora hasta del 50% con relación a la media del día y en su temperatura corporal de 0.27°C en promedio por encima de la media diaria, en preparación a la llegada de la madre.

**2) El amamantamiento:** Con una duración aproximada de 3-5 minutos, en el que los animales reciben la leche materna y con el fin de saciarse, cambian constantemente de pezón, por lo cual durante este momento ocurre el pico máximo de actividad locomotora y temperatura corporal en el día.

**3) Pos-prandio:** momento subsecuente al amamantamiento en el que después de ingerir la leche materna las crías disminuyen drásticamente su actividad locomotora y

temperatura corporal. Durante el resto del ciclo las crías siguen un patrón de recambios en la posición del nido, con pequeños movimientos con el fin de buscar zonas térmicamente más favorables (Pacheco-Cobos *et al.*, 2003).



**Figura 6.** Patrón temporal característico de la temperatura corporal de un conejo neonato de 7 días de edad. El área roja representa el incremento anticipatorio que ocurre aproximadamente 2 horas previas a la llegada de la madre al nido. Durante el evento de amamantamiento, representado por la barra vertical amarilla, se presenta el valor máximo de temperatura, señalado por la flecha naranja. Posteriormente la temperatura corporal desciende súbitamente por debajo de la media diaria, representada por la línea punteada gris y permanece así por aproximadamente 4 horas, a este evento se le conoce como pos-prandio, representado por el área azul. El resto del ciclo la temperatura permanece cercana a la media diaria.

Es importante señalar que en el caso en el que la hembra no se presente en el nido durante al menos dos ciclos y por tanto el evento de amamantamiento no ocurra, los neonatos de P16-17 continúan exhibiendo este patrón rítmico. La persistencia de esta conducta anticipatoria sugiere que éste se encuentra regulado temporalmente de forma endógena por el sistema circadiano (Jilge *et al.*, 2001; Trejo-Muñoz *et al.*, 2012). También se ha encontrado que las crías de conejo son capaces de anticipar la llegada de la hembra a nivel metabólico, ya que exhiben un aumento en los niveles de corticoesterona



plasmática que anteceden al amamantamiento, cambios que persisten aun cuando las crías son privadas al acceso a la hembra durante 72 horas (Rovirosa *et al.*, 2005). Por lo que se afirma que las crías de esta especie tienen la capacidad de predecir temporalmente y anticiparse al momento que ocurre la alimentación. Este programa temporal de amamantamiento en conejos se mantiene aún bajo condiciones de cautiverio (Hudson & Distel, 1982; Jilge *et al.*, 2000; Trejo-Muñoz *et al.*, 2012).

Estudios realizados en esta especie indican que el amamantamiento actúa como un potente agente sincronizador no-fótico en etapas tempranas del desarrollo. Se ha reportado que los conejos neonatos exhiben ritmos claramente sincronizados al ciclo impuesto de amamantamiento en su actividad locomotora, temperatura corporal, secreción de corticoesteroides, metabolitos séricos y glicógeno (Escobar *et al.*, 2000; Jilge & Hudson, 2001; Caldelas *et al.*, 2005; Rovirosa *et al.*, 2005; Caba & González-Mariscal, 2009). Adicionalmente, se ha caracterizado el patrón rítmico en la expresión de los genes reloj *Per1*, *Per2* y *Bmal1* en el NSQ de conejos neonatos de siete días de edad sincronizados por amamantamiento, tanto el ritmo de la expresión de estos genes, como el ritmo de la temperatura corporal, se encuentran en fase al horario de amamantamiento impuesto. Estos datos sugieren que el amamantamiento tiene la capacidad de controlar la fase de la maquinaria molecular del NSQ y de la temperatura corporal (Caldelas *et al.*, 2007, 2009).

### **La importancia del sistema olfativo para los conejos neonatos y la feromona 2MB2**

Desde los primeros instantes de vida de las crías de mamíferos resulta vital poder localizar adecuadamente su fuente de alimentación, la leche materna. En este sentido, evolutivamente han sido generados mecanismos de comunicación de tipo sensorial química tanto en las madres, como en las crías. Por su parte las hembras lactantes han desarrollado señales que ayudan a las crías a orientarse y ubicar los pezones maternos para poderse alimentar, a su vez las crías están provistas de los mecanismos neurológicos necesarios para la detección de estas señales desde el nacimiento (Schaal *et al.*, 2003, 2009; Coureaud *et al.*, 2010).

Los conejos son una especie altricial, esto significa que nacen con sistemas sensoriales inmaduros, la visión, audición y las habilidades motoras están poco desarrolladas. No obstante, el sistema somato sensorial y el sistema olfativo son funcionales en etapas prenatales. Una evidencia de esto es la habilidad que desde el nacimiento poseen las crías de orientarse a través de gradientes termo táctiles, (Pacheco-Cobos *et al.*, 2003), así como la capacidad de aprendizaje y asociación de olores que muestran los conejos incluso desde etapas prenatales (Coureaud & Schaal, 2000; Coureaud *et al.*, 2001), lo cual nos habla del impresionante grado de madurez de los mencionados sistemas sensoriales, que desde etapas tempranas posee esta especie.

En la actualidad se sabe que en los pezones de hembras lactantes de *O. cuniculus* se emite una molécula, conocida como feromona materna, la cual en las crías dispara patrones conductuales estereotipados, relacionados con la localización de los pezones maternos y la succión (Keil *et al.*, 1990; Moncomble *et al.*, 2005). Cuando la hembra se posa sobre el nido, los neonatos inmediatamente despliegan intensa activación motora acompañada de movimientos orocefálicos de orientación hacia los pezones, con esta conducta son capaces de encontrar y asirse al pezón materno, segundos después de que la hembra se posa sobre el nido (Hudson & Distel, 1983). Los mecanismos neurológicos que subyacen esta respuesta conductual parecen estar instaurados desde el vientre materno, ya que esta respuesta se presenta desde el día de nacimiento (Coureaud *et al.*, 2001).

La feromona materna fue identificada través de un estudio de cromatografía de gases, en el que, al mismo tiempo que se identificaron y separaron los compuestos volátiles contenidos en la leche materna de conejo, cada compuesto fue utilizado para estimular olfativamente a los conejos neonatos y evaluar su activación conductual. De entre todos los compuestos volátiles presentes en la leche, únicamente el 2-metilbut-2-enal (2MB2) disparó un patrón conductual muy similar al que ocurre durante el evento de amamantamiento, en la mayor proporción de los animales bajo estudio (Schaal *et al.*, 2003). Aunado a lo anterior, cuando el 2MB2 se presentó en su forma sintética, fue el único odorante capaz de producir una respuesta conductual en las crías de entre todos los compuestos volátiles probados (Coureaud *et al.*, 2003). El 2MB2 cumple entonces con los 5 criterios para ser considerado como una feromona (Wyatt, 2003, 2010):

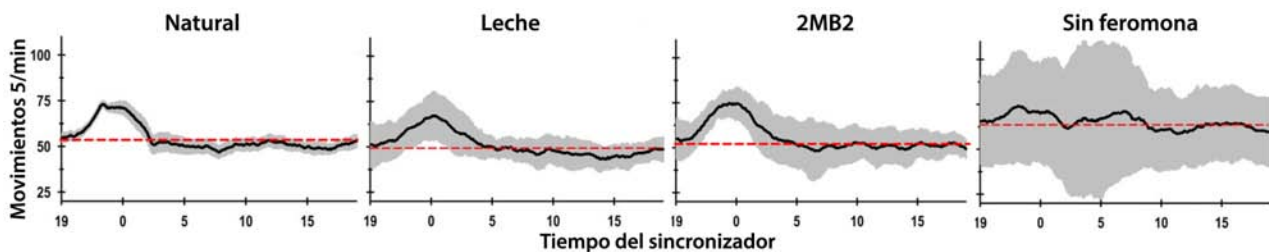
1. Es un compuesto mono-molecular que dispara respuesta conductual similar a la que ocurre durante el amamantamiento.
2. Genera un patrón conductual estereotipado, de atracción que involucra movimientos orocefálicos de búsqueda y asimiento al pezón.
3. Es el único compuesto hasta el momento que es capaz de evocar dicho patrón conductual.
4. Se considera especie específico, ya que se ha probado que, entre varios lagomorfos, felinos y murinos, *Oryctolagus cuniculus* es la única especie que responde ante la presentación de este compuesto.
5. No depende del aprendizaje previo para desencadenar la respuesta conductual en conejos neonatos.

En mamíferos existen dos estructuras anatómicas encargadas del procesamiento primario de las señales olfativas: el bulbo olfativo (BO) y el órgano vomeronasal (OV). Un estudio efectuado por Hudson y Distel (1986) demostró que el OV no participa en el procesamiento de dichas señales, ya que con la ablación de esta estructura no son eliminadas las respuestas conductuales que las crías presentan ante hembras lactantes, ni se ve comprometida la ingesta de leche. En contraste cuando las cavidades nasales de otro grupo de crías fueron irrigadas con ZnSO<sub>4</sub>, dicha manipulación abolió por completo la respuesta conductual (Hudson & Distel, 1986).

Existen evidencias que indican que el BO es el encargado del procesamiento de la feromona materna 2MB2, ya que la exposición a esta produce un incremento generalizado en la expresión de la proteína C-FOS en el BO de conejos de 4 días de edad, en comparación con la exposición a un olor neutral o la sola manipulación de los animales. Mientras que otras estructuras como el bulbo accesorio o el OV no mostraron incrementos en la expresión de C-FOS. La exposición a la feromona también provocó la expresión de C-FOS en otras áreas cerebrales como la corteza piriforme, el órgano vascular de la lámina terminal y la habénula, regiones involucradas en osmoregulación, control hídrico, respuestas motoras y motivación (Charra *et al.*, 2012, 2013).

## La influencia de las señales olfativas maternas sobre el sistema circadiano del conejo neonato

Tomando en cuenta la importancia funcional de la feromona 2MB2 para los conejos durante etapas tempranas del desarrollo, un estudio realizado por nuestro grupo de investigación probó la influencia de las señales olfativas maternas sobre el funcionamiento sistema circadiano de conejos neonatos. Con este fin, se analizaron los ritmos de actividad locomotora y temperatura corporal desde el día P2 y hasta el día P7, de grupos de conejos, estimulados con 2MB2, leche materna, agua, o amamantados por una hembra lactante en un horario fijo. Los neonatos amamantados por una hembra lactante y aquellos que fueron estimulados con 2MB2 o leche materna, exhibieron un patrón diurno similar tanto en la actividad locomotora, como en la temperatura corporal, estos tres grupos presentaban en ambos parámetros, actividad anticipatoria característica, previa al horario de estimulación. En contraste los animales que no recibieron estimulación olfativa exhibieron un patrón temporal atípico tanto en el ritmo de temperatura corporal, como en el de actividad locomotora (Figura 7). Cabe destacar que, a nivel metabólico las señales olfativas maternas parecen no tener influencia marcada, ya que los patrones temporales de glucosa sérica, ácidos grasos libres, triglicéridos y colecistoquinina fueron similares para todos los grupos de animales. Estos datos indican que las señales olfativas maternas influyen sobre el sistema circadiano en particular sobre la expresión del ritmo de actividad locomotora y de temperatura corporal de conejos neonatos (Montúfar-Chaveznava *et al.*, 2013).



**Figura 7.** Patrón promedio de la actividad locomotora de conejos (n=7) en el día P7, alimentados diariamente en un horario fijo, por una hembra lactante (Natural) o estimulados olfativamente con leche de coneja (Leche), 2-metilbut-2-enal (2MB2) o agua destilada (Sin feromona). Los tres grupos que recibieron estimulación olfativa presentan un patrón similar. Modificado de (Montúfar-Chaveznava *et al.*, 2013).

Como se mencionó previamente el BO es la estructura encargada del procesamiento de las señales olfativas en mamíferos. En el caso particular del conejo europeo la expresión de los componentes de la maquinaria molecular del reloj circadiano maduran primero en el BO en comparación del NSQ, ya que se ha demostrado que en el día P7 el ARNm de los genes *Per1*, *Bmal1* y *Cry1* presenta un patrón de expresión cercano a las 24 horas y similar a la fase presente en los adultos, mientras que en el NSQ la maduración de los componentes es más tardía, pues se encontró que en día P7 la oscilación del gen *Cry1* es bimodal, además de diferencias importantes en el periodo la fase y la amplitud de *Bmal1* y *Per1* con respecto a la edad adulta. (Montúfar-Chaveznava *et al.*, 2012). Esta evidencia pone de manifiesto la importancia del BO en el sistema circadiano del conejo neonato.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

---

El hecho de que la maquinaria molecular del reloj circadiano madure antes en un oscilador central como el BO, el cual está recibiendo el estímulo sensorial de la feromona materna, de forma circadiana, nos puede hablar de su relevancia funcional para la sincronización del conejo neonato.

Con base en la información anterior el presente proyecto está encaminado a evidenciar la influencia de la feromona 2MB2 sobre el sistema circadiano de los conejos neonatos, analizando específicamente el funcionamiento a nivel de genes reloj en el marcapasos NSQ y en el oscilador central BO, siendo este último crítico en el procesamiento de dicha señal olfatoria. Así mismo se analizará la expresión de la ritmicidad a nivel conductual en la actividad locomotora y a nivel fisiológico en la temperatura corporal.

Primeramente, se evaluará la respuesta aguda del NSQ y del BO ante la estimulación con la feromona 2MB2 en distintas fases del ciclo, lo cual nos indicará si la feromona 2MB2 es capaz de influir sobre la expresión de la maquinaria molecular del reloj circadiano y si esta respuesta está modulada temporalmente. Posteriormente, se determinará la respuesta del sistema circadiano ante la estimulación diaria con la feromona 2MB2 y ante un cambio de fase de 6 horas, tanto en la expresión de los genes reloj en NSQ y BO como en los patrones diarios de actividad locomotora y de temperatura corporal, con lo cual se comprobará si la feromona es capaz establecer una relación de fase con la expresión de los genes reloj, la temperatura corporal y la actividad locomotora y por lo tanto actuar como un sincronizador del sistema circadiano de conejos neonatos.

## HIPÓTESIS

---

Si la feromona materna 2MB2 actúa como un sincronizador para el sistema circadiano de conejos neonatos, la exposición diaria a la misma ejercerá control de fase a nivel fisiológico de la temperatura corporal y la actividad locomotora, así como sobre la actividad de la maquinaria molecular del marcapasos central NSQ y del oscilador BO.

## OBJETIVOS

---

Determinar el efecto de la exposición a la feromona 2MB2 sobre el funcionamiento del sistema circadiano de conejos neonatos.

### Objetivos particulares:

Caracterizar las respuestas ante la estimulación inmediata con la feromona 2MB2 a diferentes horas del día en la expresión de las proteínas PER1, CRY1, BMAL1 y C-FOS en el BO y NSQ de conejos neonatos.

Caracterizar el ritmo de temperatura y actividad locomotora de conejos neonatos alimentados y expuestos diariamente a la feromona 2MB2 a la misma hora del ciclo.

Caracterizar el ritmo de expresión de los genes reloj *Per1* y *Bmal1* en BO y NSQ de conejos neonatos alimentados y expuestos diariamente a la feromona 2MB2 a la misma hora del ciclo.

Caracterizar el ritmo de temperatura y actividad locomotora y el ritmo de expresión de los genes reloj *Per1* y *Bmal1* en el BO y NSQ, conejos neonatos, después de un cambio de fase (retraso de 6 horas) en el horario de alimentación y estimulación con la feromona materna 2MB2.



# RESPUESTA DE LA MAQUINARIA MOLECULAR DEL RELOJ CIRCADIANO DE CONEJOS NEONATOS ANTE LA EXPOSICIÓN AGUDA A 2MB2

---

## Método

### Bioética

El presente proyecto se llevó a cabo de acuerdo a los lineamientos establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, sobre las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, así como los lineamientos para el cuidado y uso de animales de laboratorio contenidos en el código ético para el personal académico del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. El protocolo fue previamente revisado y aprobado por la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto de Investigaciones Biomédicas (permiso número 098).

### Alojamiento de los sujetos experimentales

Para el presente estudio se emplearon conejos europeos (*Oryctolagus cuniculus*) raza Chinchilla, los cuales fueron obtenidos de la colonia ubicada en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Cada individuo de la colonia se encontraba alojado en jaulas individuales de acero inoxidable (120 cm de largo x 60 cm de ancho x 45 cm de alto) en condiciones de alimentación e ingesta de agua ad libitum (Conejo Ganador, Malta Cleyton, México) bajo un fotoperiodo 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad (16:8). La temperatura ambiental se mantuvo en  $20 \pm 2$  °C y la humedad relativa entre 40-60%.

Para evitar la influencia de señales maternas a lo largo del día, los conejos neonatos fueron alojados en una sala independiente a la de la colonia, bajo las condiciones

ambientales mencionadas previamente, con excepción del fotoperiodo el cuál se substituyó por luz continua (737 luxes medidos sobre las cajas, YK-10LX luxómetro, Lutron, Electronic Enterprise Co, Taiwan). La iluminación fue proporcionada por lámparas de luz halógena (Philips® 32 Watts Alto, USA). Los neonatos se alojaron en grupos de 4 individuos en cajas de acrílico traslucido (20 cm de largo x 10 cm de ancho x 15 cm de alto) con papel absorbente en tiras, y granulina como cama para remplazar el material del nido.

### **Obtención de las crías de conejo europeo**

Las hembras de la colonia fueron apareadas con un mes de anticipación a la realización de los experimentos. A los 28 días pos-coito se colocó dentro de cada jaula y una caja nido, la cuál fue construida con una caja de PVC opaco, con orificio circular de 14 cm de diámetro en una de sus caras a modo de entrada. Adicionalmente, se colocó paja estéril dentro de la jaula para la construcción del nido.

Con la finalidad de coordinar el nacimiento de las camadas en el mismo día, a los 31 días pos-coito, se indujo el parto las hembras gestantes con una inyección de oxitocina vía intra-muscular, en una dosis de 1-2UI/kg. Seis horas después del nacimiento las crías fueron aisladas de la madre y trasladadas una sala independiente, donde cada una fue identificada con una marca específica en las orejas, posteriormente se registró su peso. El día de nacimiento fue definido como día posnatal 0 (P0).

### **Grupos experimentales**

En el estudio, fueron utilizadas 72 crías provenientes de 13 camadas, de cada condición experimental únicamente dos crías de cada camada fueron incluidas. Los animales fueron asignados aleatoriamente a una de tres condiciones experimentales: CON, ETIL o 2MB2. Una vez asignados se procedió a formar grupos de 4 individuos pertenecientes a la misma condición para alojarlos en las cajas de acrílico previamente mencionadas.

## **Amamantamiento**

A partir de P1 y hasta P6 las crías fueron trasladadas al cuarto de la colonia a las 11:30 horas del tiempo local (ZT00), se registró su peso corporal, posteriormente se colocaron dentro de las cajas nido y se permitió la entrada de las hembras lactantes al nido para el amamantamiento de las crías. Una vez concluido el amamantamiento (aproximadamente 5 minutos después) se sacó a las crías del nido y nuevamente se registró su peso para asegurar que hubieran sido alimentadas. Inmediatamente después, las crías fueron trasladadas a su sala, donde permanecieron el resto del día.

## **Estimulación olfativa**

En P7 la estimulación olfativa se efectuó en cuatro horarios distintos 0, 6, 12 y 18 h después del episodio de amamantamiento. Con este propósito los animales fueron trasladados a la sala de estimulación, los individuos del mismo grupo se colocaron dentro de una caja de acrílico translucido específicamente diseñada para la estimulación de cada grupo, que contenía papel absorbente en tiras y granulina como cama, la cual fue sanitizada todos los días. Estas cajas a su vez fueron puestas dentro de una caja de acrílico (19 cm ancho x 22 cm de largo x 29 cm de alto) con tapa, con el propósito de mantener la volatilización de los odorantes dentro de un área delimitada. Esta caja contaba con una perforación circular de 1 cm de diámetro en la parte superior por donde fue introducido un hisopo de 15 cm de largo, humedecido con 100 $\mu$ L de odorante, H<sub>2</sub>O destilada para el grupo CON, etil isobutirato (P98%, Aldrich, EU) para el grupo ETIL y 2-methylbut-2-enal (P96% Aldrich, EU) para el grupo 2MB2, el hisopo se mantuvo aproximadamente a 10 cm de distancia de la cabeza de los neonatos. La estimulación olfativa tuvo una duración de 5 minutos. Cada animal fue estimulado con un solo odorante.

Para evitar la contaminación con olores la estimulación olfativa se llevó a cabo en una sala independiente de la sala de los neonatos, y a la sala de la colonia. Adicionalmente, los animales fueron estimulados en el siguiente orden: grupo CON, grupo ETIL y por último el grupo 2MB2, aunado a esto, la estimulación del grupo ETIL y del grupo 2MB2 se llevó a cabo en dos cuartos diferentes.

La elección del odorante etil isobutirato como un control positivo se basó en 3 puntos: 1) La composición química difiere del 2-methylbut-2-enal; 2) No forma parte de los compuestos volátiles presentes en la leche materna de las conejas; 3) La estimulación olfativa con este compuesto no dispara respuestas conductuales estereotipadas de búsqueda de pezón en los conejos neonatos cuando es presentado como un estímulo novedoso (Schaal et al., 2003; Sinding et al., 2011).

Transcurridos 60 minutos de la estimulación olfativa, los neonatos fueron eutanizados con una sobredosis de pentobarbital sódico (PiSA, México, dosis 60mg/kg v.i). Inmediatamente los animales fueron perfundidos con 250ml de solución lavadora preparada con NaHCO<sub>3</sub> 6mM, KCl 3mM, NaCl 10mM diluidos en buffer de fosfatos 10mM con 5000 UI/L de heparina (pH 7.4), seguido de 250ml de para formaldehído al 4% en buffer de fosfatos 0.1 M (pH 7.4).

Al finalizar la perfusión los animales fueron decapitados, su cerebro fue extraído y fijado durante 24 h en paraformaldehído 4%, seguido de la criopreservación del tejido mediante concentraciones crecientes de sacarosa (20% y 30%). Finalmente, 5 series de secciones coronales de 40µm del hipotálamo que incluía NSQ y del BO fueron obtenidas con un criostato (Microm HM520, EU) y montadas en laminillas pretratadas (Superfrost, Fisherbrand, Waltham, EU). Las secciones se mantuvieron a -20 °C hasta la realización de la inmunohistoquímica.

### **Inmunohistoquímica**

Las proteínas C-FOS, PER1, CRY1 y BMAL1 fueron detectadas en las secciones cerebrales a través de inmunohistoquímica, para tal efecto, las secciones fueron lavadas con PBS 0.1M y Tween 100 al 0.1% pH 7.4 (PBS-T) por 10 minutos posteriormente fueron incubadas con una solución de albumina bovina al 5% durante 2 h, a continuación, se efectuaron 3 lavados en PBS-T. Las secciones fueron incubadas por 48 h a temperatura ambiente con el anticuerpo para C-FOS (Anti C-FOS, Millipore, EU) en una dilución de 1:500, PER1 (Anti-PER 1 Purified Max Pab, Abnova, Taiwan) 1:200, BMAL1 (Purified ARNTL mouse mAb, clone 1D1, Origene, EU) en una concentración 1:200 o CRY1 (Ms. mAb to Cryptochrome I, Abcam, EU) 1:1000. Para la detección de las células

inmunoreactivas, se empleó el método avidina-biotina peroxidasa, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS, a continuación las secciones fueron incubadas con el anticuerpo biotinilado (Vectastain Biotinylated Pan-specific antibody, Vector Lab, EU) durante 2 horas a temperatura ambiente, las secciones fueron lavadas nuevamente con PBS en 3 ocasiones por 10 minutos para continuar con la incubación con el complejo Avidina-Biotina (Vectastain Elite ABC kit, Vector lab, EU) durante 2 horas. Para finalizar la reacción se reveló con Diaminobenzidina (Liquid DAB + Substrate Chromogen System, DAKO, EU). Las secciones fueron lavadas con PBS 1x, deshidratadas mediante un tren de concentraciones crecientes de Etanol (70%, 90%, 95% y 100%), aclaradas con xilol 100%, finalmente se cubrieron usando una resina (Mounting Medium Richard-Allan Scientific, Walldorf, Alemania).

Para la realización del conteo de las células inmunoreactivas (CIR) las secciones fueron digitalizadas con un microscopio (Olympus BX51) equipado con una cámara CCD (Evolution VF cooled color camera, Media Cybernetics, Warrendale, PA, EU). En el caso de las secciones de NSQ se utilizó una magnificación de 10x mientras que para las secciones de BO se utilizó 20x. Tres secciones unilaterales de NSQ y BO centrales fueron fotografiadas por animal. Secciones adicionales fueron teñidas con Nissl para la delimitación citoarquitectónica del NSQ y las capas periglomerular, mitral y granular del BO. Para establecer la ubicación del NSQ se utilizaron como puntos de referencia el quiasma óptico y el tercer ventrículo. El número de CIR en el NSQ fue cuantificado manualmente usando un software de análisis de imágenes (Image J 1.41 NIH, USA). En el caso del BO una fotografía fue obtenida por cada capa del BO. El área total contada en la capa periglomerular fue de  $1,410\mu\text{m}^2$ ; para la capa mitral de  $235\mu\text{m}^2$ ; y para la capa granular de  $2,961\mu\text{m}^2$ . La suma total del área de las tres capas fue de  $4,606\mu\text{m}^2$ , esta área fue considerada como BO total. Las CIR fueron cuantificadas en cada área de la forma previamente descrita.

### **Análisis estadístico**

Para cada grupo (CON, ETIL, 2MB2) y hora del día (00, 06, 12, 18) la media y el error estándar fueron calculados para el número de CIR por cada proteína (C-FOS, PER1, CRY1, BMAL1). Se realizó una ANOVA de una vía, seguida de una prueba pos-hoc

Bunferroni-Dun para determinar las diferencias asociadas a la hora del día en cada una de las cuatro proteínas bajo estudio. Con la finalidad de evaluar si la expresión de las proteínas era rítmica y obtener la acrofase, el nadir y el porcentaje de ritmicidad, se realizó un análisis COSINOR. Finalmente se realizaron ANOVAS de dos vías, seguidas de pruebas pos-hoc Bonferroni-Dun para determinar el efecto de la estimulación olfativa sobre la expresión en cada proteína (número del CIR) aunado a la hora del día.

## Resultados

Los resultados de este trabajo fueron publicados en el artículo:

Trejo-Muñoz L, Navarrete E, Montúfar-Chaveznava R, Caldelas I (2014) Temporal modulation of the canonical clockwork in the suprachiasmatic nucleus and olfactory bulb by the mammary pheromone 2MB2 in pre-visual rabbits. *Neuroscience*, **275**, 170–183.

# RESPUESTA DEL SISTEMA CIRCADIANO A LA EXPOSICIÓN DIARIA A LA FEROMONA 2MB2

---

## Método

Durante el evento de amamantamiento están presentes diversos estímulos somatosensoriales, además de los estímulos olfativos. Por lo tanto, para determinar el efecto de la estimulación diaria con la feromona 2MB2 sobre el sistema circadiano de los conejos neonatos, fue necesaria la implementación de estrategias que nos permitieran limitar la presencia de la mayor parte de los estímulos provenientes de la hembra lactante, por lo que se decidió emplear dos estrategias de alimentación: amamantamiento con una hembra lactante y alimentación enteral.

Las condiciones de alojamiento de los animales de la colonia, la obtención de las crías y el manejo una vez nacidas, se llevaron a cabo conforme a lo mencionado en las secciones anteriores. Un total de 120 crías provenientes de 30 camadas fueron asignadas aleatoriamente a uno de cuatro grupos experimentales: NAT MF, H<sub>2</sub>O MF y 2MB2 MF.

Todos los días (P1-P8), a las 9:00 horas, los animales del grupo NAT MF fueron alimentados por una hembra lactante de la forma que se menciona en el apartado *Amamantamiento*. Las crías de los grupos H<sub>2</sub>O MF, ETIL MF y 2MB2 MF fueron estimuladas olfativamente todos los días a las 9:00 horas de la forma que se menciona en el apartado *Estimulación olfativa*. Al término de la estimulación olfativa, los animales fueron devueltos a las cajas donde previamente se alojaban y se trasladaron inmediatamente a otra sala para ser alimentados. Se indujo la micción de cada cría al estimular el área urogenital del animal, con un hisopo humedecido con agua tibia, posteriormente fue obtenido el peso corporal de cada uno. Para alimentar a las crías, se utilizó una fórmula láctea cuyos componentes fueron previamente estandarizados (Chávez Martín del Campo, 2009; Montúfar-Chaveznavá *et al.*, 2013; Navarrete *et al.*,

2016; Ortega-Bernal, 2016), esta fue preparada al momento y mantenida entre 38.5-39 °C. Para realizar la alimentación enteral los sujetos fueron inmovilizados con ayuda de una toalla de papel absorbente colocándola alrededor del animal de tal manera que permitiera mantener la posición del tronco superior vertical y restringiera suavemente el movimiento de las extremidades. Una vez en posición se les introdujo cuidadosamente una sonda intragástrica vía oral, constituida por un tubo de silicona de grado médico de 8 cm de largo (Silastic laboratory tubing OD 1.47mm x 1.96mm, Down Corning, EU) acoplado a una jeringa de 20ml con una aguja calibre 16G, inmediatamente después la fórmula láctea fue administrada de forma pausada directamente en el estómago de los neonatos. La cantidad de leche suministrada se basó en estimaciones previas (Chávez Martín del Campo, 2009; Montúfar-Chaveznava *et al.*, 2013) y fue alrededor de 20% del peso del animal, en algunos casos podía ser modificada dependiendo de la distensión estomacal del sujeto. Una vez finalizado el procedimiento de alimentación, los animales fueron devueltos a la caja de alojamiento y trasladados nuevamente a la sala donde se alojaban los neonatos, donde permanecieron el resto del día. El tiempo de duración de todo el procedimiento de alimentación fue de aproximadamente 3-4 minutos por cada individuo.

El registro de telemetría y todas las manipulaciones de los animales se realizaron bajo luz continua.

### **Cambio de Fase de la estimulación olfativa**

Con el propósito de establecer si la feromona 2MB2 puede actuar como un sincronizador circadiano y es capaz de establecer una relación de fase con los parámetros registrados, se incorporó un cambio de fase en la presentación del estímulo olfativo. Para tal efecto, un adicional de 120 crías fueron asignadas aleatoriamente a uno de cuatro grupos experimentales NAT CF, H<sub>2</sub>O CF, ETIL CF y 2MB2 CF. Inicialmente, del día P1-P3 la manipulación experimental se realizó a las 9:00 horas, a partir de P4-P8 la manipulación se realizó 6 horas después, a las 17:00 horas del tiempo local.



## Monitoreo y análisis de la temperatura corporal y la actividad locomotora

Tanto la temperatura corporal, como la actividad locomotora de los conejos neonatos, fue registrada de forma automatizada mediante un equipo de telemetría (VitalView System, MiniMitter Respironics Inc., EU). Para tal efecto, en P1, 7 sujetos de cada grupo se seleccionaron al azar para la implantación *i.p* de un transmisor de telemetría (G2 E- Mitter, MiniMitter Respironics Inc., EU). Los animales fueron colocados sobre un tapete térmico para aminorar el descenso de la temperatura y fueron anestesiados con sevoflurano (Sevorane, Abbott, Co. EU). Bajo el efecto del anestésico y en condiciones asépticas se realizó una incisión en el abdomen superior de forma horizontal de aproximadamente 1 cm de largo, en las capas dérmica y muscular para insertar el transmisor (1.55 x 0.65 cm, con un peso de 1.1 g) en el interior de la cavidad abdominal, posteriormente la incisión fue suturada y el área abdominal fue sanitizada. A los pocos minutos los animales se recuperaron del efecto del anestésico y fueron colocados en su respectiva caja de acrílico donde se alojaba el resto de los gazapos del grupo. Se permitió que los animales se recuperaran de la operación durante un día, por lo que el registro de telemetría comenzó en P2. Las cajas que alojaron a las crías a su vez se colocaron sobre receptores (ER-400 Energizer Receiver, MiniMitter Respironics Inc., EU), conectados a un ordenador que a través del software VitalView (MiniMitter Respironics Inc., EU) almacenó el promedio de la temperatura corporal y la sumatoria de la cantidad de movimientos registrados en intervalos de 2 minutos.

Para evaluar la ritmicidad (fases, periodo y componente anticipatorio) se utilizó el procedimiento reportado en Trejo-Muñoz et al. 2012, el cual se resume a continuación:

1. Para minimizar el efecto de la tendencia al incremento diario de la temperatura corporal, producto de la maduración de los procesos de termorregulación en estos animales artificiales, los datos fueron ajustados a una recta ( $y=mx+b$ ) mediante mínimos cuadrados, posteriormente la ecuación de la recta fue sustraída de los datos originales y se obtuvo una nueva serie de tiempo para cada segmento.
2. Sobre el nuevo conjunto de datos se aplicó el algoritmo Wave Shrink para eliminar los componentes irregulares o ruido. En este proceso se aplicó la transformada de

Ascombe para trasladar los datos de una distribución gaussiana a una de Poisson, de manera que los datos adquieren desviación estándar, enseguida se aplicó la transformada de ondeletas de Daubechies-8 que remueve los umbrales relacionados con ruido. Finalmente se aplicó la transformada de ondeletas inversa para la obtención de nuevas series de tiempo libres de ruido.

3. Los valores correspondientes a la acrofase y nadir fueron calculados construyendo una secuencia de pulsos positivos de amplitud  $w$  espaciados por 24 horas a partir de los máximos y una secuencia de pulsos negativos con las mismas características a partir de los valores mínimos. Los valores máximos y mínimos se obtuvieron a partir de la primer y segunda derivada, respectivamente. Las secuencias de pulsos fueron alineadas y desplazadas en las series de datos para determinar la acrofase y el nadir, que correspondían a la posición  $p$ , donde  $p = \arg \max_i |x_i y_i|$  donde  $x_i$  es el dato y  $y_i$  es el pulso en la secuencia.

Los datos de actividad locomotora también fueron procesados de la manera antes descrita, sin embargo, se omitió el ajuste inicial a la recta debido a que la actividad no muestra la misma tendencia de incremento en el desarrollo que la temperatura corporal. Adicionalmente, con el propósito de preservar detalles importantes dentro de los datos como los picos máximos y mínimos, el ruido fue eliminado con el filtro Savitzky-Golay.

4. Para el análisis del componente anticipatorio, la anticipación se definió como un cambio sostenido en un lapso de tiempo definido de temperatura o actividad locomotora, que cruza o está sobre cierto umbral previamente establecido. En este caso debido al incremento diario en la temperatura corporal y decremento de la actividad locomotora, se estableció como umbral la media de un segmento de 24 horas, que iniciaba 5 horas antes del amamantamiento o estimulación olfativa (ZT00) y terminaba 19 horas después. Estas 5 horas previas a ZT00 en las series de tiempo

fueron empleadas para cuantificar el componente anticipatorio, donde se determinó la posición dentro de la serie de tiempo en la cual el incremento iniciaba y finalizaba, obteniendo así la duración de la anticipación, mientras que la diferencia entre el valor mínimo y máximo fue considerada la intensidad de la anticipación. Fueron detectados cuatro casos dentro del análisis de acuerdo a la posición del incremento con respecto a la media de los datos: (a) cruzó la media, (b) está bajo la media, (c) está sobre la media, (d) no se presentó, únicamente los casos (a) y (c) fueron considerados como anticipación.

Se calculó la media, desviación estándar y error estándar de la temperatura corporal diaria, la actividad locomotora diaria, la intensidad y duración del componente anticipatorio, la acrofase y el nadir de ambos parámetros. Las diferencias asociadas al grupo, al día posnatal fueron probadas con una ANOVA de dos vías, seguida de una prueba pos-hoc de Fisher (nivel de significancia 5%).

### **Hibridación *in situ* y análisis de la expresión de los genes reloj**

Para obtener el perfil de expresión de los genes reloj *Per1* y *Bmal1*, en el día P8 fueron obtenidas muestras de tejido en intervalos de 4 horas, durante 24 horas, por lo que los muestreos se efectuaron a las 9:00, 13:00, 17:00, 21:00, 1:00 y 5:00 horas.

Los neonatos fueron eutanizados con una sobredosis de sevoflurano inhalado, los animales fueron perfundidos conforme se mencionó en el apartado 5.1.6. Se realizaron cortes coronales seriados de 30 $\mu$ m de grosor, del hipotálamo que incluía NSQ y del BO en un criostato (HM520, Microm International GmbH, Alemania), los cuales fueron montados en laminillas pretratadas. Las secciones se mantuvieron a -70° hasta el momento de la detección de los genes reloj.

La detección del ARNm de los genes *Per1* y *Bmal1* se realizó a través de la técnica de hibridación *in situ*. Brevemente, la obtención de los plásmidos modificados se realizó de bacterias *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , que previamente habían sido transformadas y poseían plásmidos incorporados (donados por el Dr. Steven M. Reppert), fueron descongeladas para ser sembradas en medio de crecimiento LB y posteriormente incubadas a 37°C por 15 horas. La extracción del ADN plasmático de las colonias de bacterias se realizó con

un kit de extracción (Plasmid Maxi Kit, Quiagen, Alemania). Una vez obtenidos los plásmidos se realizó la digestión de 50µg del ADN plasmático con enzimas de restricción para su linearización, de acuerdo al sentido deseado del plásmido en cuestión (Tabla 1), fueron utilizadas las enzimas: Eco RV (New England Biolabs, EU), Hind III (Promega Corporation, EU) y Not I (New England Biolabs, EU). Al término de la linearización se realizó una purificación de ácidos nucleicos por la técnica de fenol-cloroformo, la correcta linearización de los plásmidos fue corroborada por electroforesis.

Gen	Enzima de restricción		Polimerasa	
	Sentido	Antisentido	Sentido	Antisentido
<b><i>Per1</i></b>	Eco RV	Hind III	SP6	T7
<b><i>Bmal1</i></b>	Hind III	Not I	T7	SP6

**Tabla 1.** Enzimas de restricción y polimeras usadas con respecto al sentido del corte del plásmido y la transcripción del ARN mensajero deseado.

Para obtener las sondas ARNc-DIG se llevó a cabo una transcripción *in vitro* mediante un kit (Maxi Script in vitro transcription kit SP6/T7, Ambion, EU) utilizando uridina marcada con digoxigenina (Digoxigenin-11-UTP, Roche, Suiza), para síntesis de las ribosondas de los genes *Per1* y *Bmal1* se utilizó la polimerasa *SP6* y *T7* de acuerdo al sentido deseado del transcrito (Tabla 1). Al finalizar la reacción de transcripción nuevamente se realizó una purificación ácidos nucleicos por la técnica de fenol-cloroformo, finalmente se corroboró la integridad del transcrito por electroforesis y se procedió a cuantificarla en un espectrofotómetro (NanoDrop™ Lite 2000, Thermo-Fisher Scientific Inc., EU).

El protocolo de hibridación se dividió en tres etapas:

### ***Prehibridación e hibridación***

Basándonos en la técnica estandarizada por Sehaeren-Wiemers y Gerfin-Mosser (1993), el tejido se fijó con una solución de PAF al 4% en PB 0.1 M (pH 7.4) durante 4 horas,

seguido por dos lavados de un minuto con PBS 1x (pH 7.4), el tejido se incubó con Proteinasa K 2.5 µg/ml (Proteinase K, recombinant PCR grade, Roche Diagnostics GmbH, Alemania) en buffer PBS 1x durante 30 minutos a 37°C, para eliminar los restos de la proteinasa se realizó un lavado de 1 minuto con PBS 1x a 4°C, seguido de una fijación con PAF 4% a 4°C por 5 minutos, y dos lavados con PBS 1x de 10 minutos el primero a 4°C y el segundo a temperatura ambiente, posteriormente el tejido se acetiló con anhídrido acético (Baker Analyzed, JT Baker, México) al 0.003% en TEA 0.1M (pH 8.0) durante 20 minutos, esto fue seguido por un lavado de 10 minutos con PBS 1x y dos lavados con SSC 5% (pH 7.0) de 5 minutos. Para la hibridación, las laminillas fueron colocadas en posición horizontal y se permitió que se secaran al aire libre. La ribosonda fue desnaturalizada al calentar el ARNc-DIG a 85°C por 5 minutos en un termociclador (TC-300, Techne Inc., EU) posteriormente se colocó 2 minutos en hielo. En cada laminilla se colocó 80 µl de una mezcla de ribosonda con medio de hibridación en una concentración de 25 ng/µl. El medio de hibridación contenía 50% de formamida desionizada (Formamide Deionized minimum 99.5% (GC), Sigma, EU) , 4% de dextran sulfato (Dextran Sulfate Sodium Salt, Sigma, EU), 5% de SSC (pH 7.0), 10mM de DTT (Dithiothreitol minimum 99%, Sigma, EU), 1x de Solución Denharts (Denhardt's solution 50x concentrate, Sigma, EU), ARNt 0.5µg/ml (Ribonucleic Acid Transfer R-8759 tRNA type X-SA from bakers yeast lyophilized, Sigma, EU) y ADN de esperma de salmón 1µm/ml (Sheared Salmon Sperm DNA, Ambion, EU). Inmediatamente después se les colocó un cubreobjetos cubierto y estéril, para evitar la evaporación de la sonda. Finalmente, las laminillas se colocaron dentro de una cámara hermética humedecida con una solución de formamida 50% (Formamide ≥ 99.5% (GC), Sigma, EU) y SSC 5x, que se dejó reposar dentro de un horno (L-C oven mechanically convected, Barnstead International, EU) a 54-56°C durante aproximadamente 15 horas.

Se añadieron 5 controles hibridados con ribosonda sentido y 5 con solo medio de hibridación, por estructura.

### ***Poshibridación y astringencia***

Una vez concluida la hibridación se retiró la cámara hermética del horno y se permitió que las laminillas regresaran a temperatura ambiente, y el cubreobjetos de cada una fue

retirado cuidadosamente. Posteriormente el tejido fue sometido nuevamente a dos lavados de 5 minutos con SSC 2x, para eliminar los restos de ribosonda que no hibridó, se realizó una incubación con ARNsA A 3.5 ng/ml (RNase-A, Quiagen, Alemania) en SSC 2x por 30 minutos a 37°C, posteriormente se realizaron 4 lavados de astringencia con SSC 1x (pH 7.0) que contenía Tween al 0.01% (Tween 20, Sigma, EU) a 65°C. El tejido se equilibró con 2 lavados de 10 minutos con TBS 1x (pH 7.4) que contenía Tween al 0.01%, posteriormente cada laminilla fue bloqueada con 400 µl de suero de cabra al 1% (Normal Goat Serum, AVIVA Systems Biology, EU) en TBS 1x que contenía Tween al 0.01% por un lapso de una hora, seguido de una incubación con 400µl de anticuerpo anti-DIG 1:500 (Anti- Digoxigenin- AP Fab Fragments, Roche, Suiza) en TBS 1x que contenía Tween al 0.01%, durante aproximadamente 15 horas a temperatura ambiente.

### **Revelado**

Una vez retirado el anticuerpo de las laminillas, se realizaron 3 lavados con TBS 1x que contenía Tween al 0.01% de 10 minutos. Con la finalidad de bloquear la fosfatasa alcalina endógena se realizaron 6 lavados de 15 minutos con levamisol 2µM ((-) – Tetramisole hydro-choride minimum 99% GC, Sigma, Alemania) en TBS 1x que contenía Tween al 0.01%, posteriormente se realizaron 2 lavados equilibrantes de 5 minutos con NTM 1x (pH 7.5) que contenía Tween al 0.01%. Finalmente, se reveló la reacción incubando cada laminilla con 400 µl de BM Purple (BM Purple AP Substrate precipitating, Roche, Suiza), aproximadamente por 96 horas. Para finalizar la reacción las laminillas fueron enjuagadas rápidamente con agua destilada, se dejaron secar a temperatura ambiente y se cubrieron con resina para su conservación (Mounting Medium Richard Allan Scientific, Thermo Scientific, EU).

Las secciones cerebrales fueron digitalizadas con un microscopio de campo claro (Olympus BX51, Life Science Solutions, EU) acoplado una cámara fotográfica réflex (EOS Rebel T5i, Canon, EU), se utilizó una magnificación de 10x. Cuatro secciones unilaterales de NSQ y BO centrales fueron fotografiadas por animal. Para establecer la ubicación del NSQ se utilizaron como puntos de referencia el quiasma óptico y el tercer ventrículo. En el caso del BO dos fotografías por corte fueron obtenidas, la primera abarcó la capa glomerular y mitral, mientras que la segunda abarcó la capa granular. El área total

contada en la capa periglomerular fue de  $1410\mu\text{m}^2$ ; para la capa mitral de  $235\mu\text{m}^2$ ; y para la capa granular de  $2961\mu\text{m}^2$ . La suma total del área de las tres capas fue de  $4606\mu\text{m}^2$ .

Una vez obtenidas las imágenes estas se transformaron a escala de grises con el software Photoshop (Adobe Systems, EU). La señal de la hibridación en el NSQ y el BO fue cuantificada con un software para el procesamiento de imágenes (Image-Pro Plus V 6.3, Media Cybernetics, EU), los valores de la señal se expresan como Densidad Óptica Relativa (DOR).

Fue obtenida la media, la desviación estándar y el error estándar de la DOR para cada gen y cada estructura, en cada uno de los ocho grupos bajo estudio. Se realizaron ANOVAS de dos vías seguidas de prueba pos hoc Fisher para determinar el efecto de la estimulación olfativa y la hora del día sobre la expresión de cada gen. Adicionalmente, se realizaron ajustes COSINOR para obtener la acrofase, el nadir, el porcentaje de ritmicidad de los patrones de expresión de los genes *Per1* y *Bmal1*.

# RESULTADOS

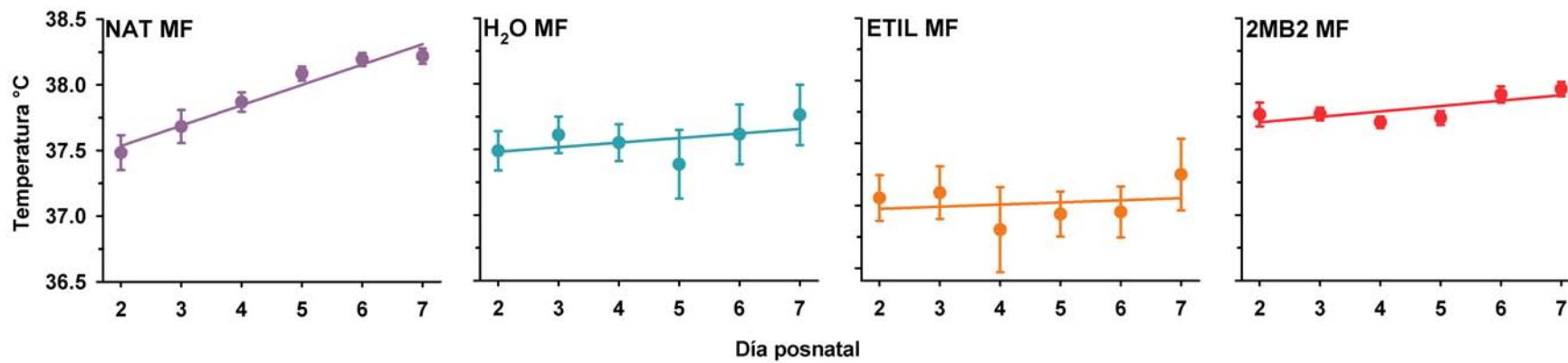
---

## Temperatura Corporal

### Misma Fase

Para la temperatura corporal media de las crías de conejo de los grupos, que fueron manipulados a la misma hora del día durante todo el experimento, el ANOVA de dos vías reveló efectos significativos asociados a los grupos y a la edad (Grupo:  $F_{(3,174)} = 36.76$ ,  $p < 0.0001$ ; Edad:  $F_{(5,174)} = 2.46$ ,  $p = 0.03$ ; Interacción:  $F_{(15,174)} = 0.96$ ,  $p = \text{NS}$ ). El promedio de la temperatura corporal diaria de los conejos del grupo NAT MF en el día P2 fue de  $37.49 \pm 0.13$  °C incrementando hasta  $38.22 \pm 0.06$  °C en P7, para los sujetos del grupo H<sub>2</sub>O MF en P2 fue de  $37.49 \pm 0.15$  °C llegando a  $37.76 \pm 0.23$  °C en P7, para el grupo ETIL MF fue de  $37.06 \pm 0.17$  °C en P2, mientras que en P7 alcanzó  $37.25 \pm 0.30$  °C, finalmente en el grupo 2MB2 MF fue de  $37.77 \pm 0.09$  durante P2 incrementando hasta  $37.96 \pm 0.05$  °C en P7 (Figura 8). Observándose la temperatura más baja en los grupos H<sub>2</sub>O MF y ETIL MF.





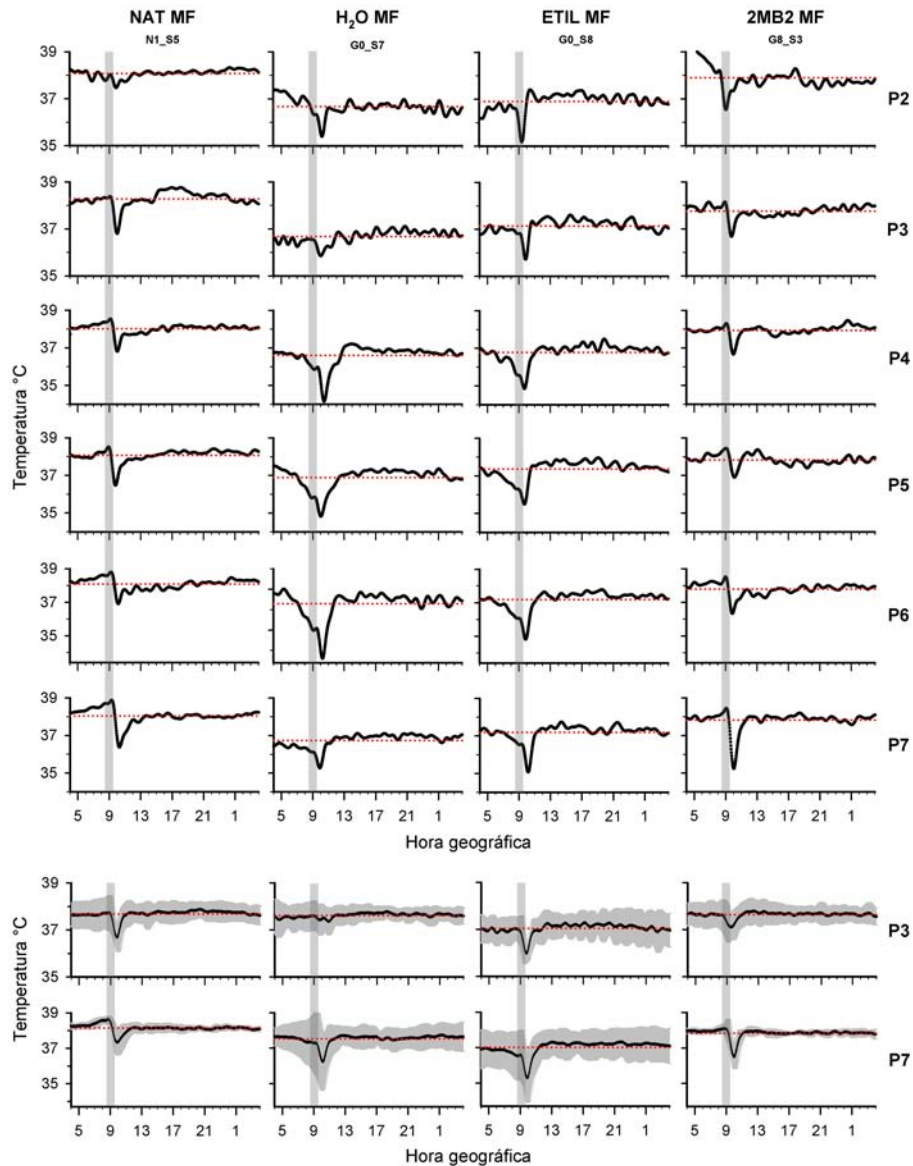
**Figura 8.** Promedio diario de la temperatura corporal del día posnatal 2 al 7, de conejos neonatos, amamantados por una hembra lactante (NAT MF morado) o estimulados olfativamente con agua destilada (H<sub>2</sub>O MF azul), etilisobutirato (ETIL MF naranja) o 2-metilbut-2-enal (2MB2 MF rojo), en un horario fijo (9:00 horas del tiempo local) cada 24 horas. Los valores se expresan como media  $\pm$  error estándar. NAT MF,  $r^2= 0.953$ ; H<sub>2</sub>O MF,  $r^2= 0.260$ ; ETIL MF,  $r^2= 0.043$ ; 2MB2 MF,  $r^2= 0.560$ .

Con respecto al patrón temporal de temperatura corporal el grupo NAT MF exhibió un ritmo diurno característico en P7, en el que la temperatura corporal comenzó a elevarse sobre la media del día, aproximadamente 3 horas antes del horario de amamantamiento, minutos después de ser alimentadas, la temperatura corporal de las crías descendió súbitamente por debajo de la media diaria y permaneció así por aproximadamente 3 horas (Figura 9). Las crías del grupo 2MB2 MF exhibieron un patrón diurno de la temperatura corporal similar al arriba descrito, en el que mostraron un incremento por arriba de la media diaria aproximadamente 2 horas antes de la estimulación olfativa, posteriormente es notorio un descenso en la temperatura con una duración aproximada de 2 horas. En contraste las crías de los grupos H<sub>2</sub>O MF y ETIL MF exhibieron un patrón temporal atípico en el que la temperatura corporal comenzó a descender de 1-2 horas antes de que tuviera lugar la manipulación experimental, de 2-3 horas después de esta, la temperatura regresó a sus niveles basales cercanos a la media diaria.

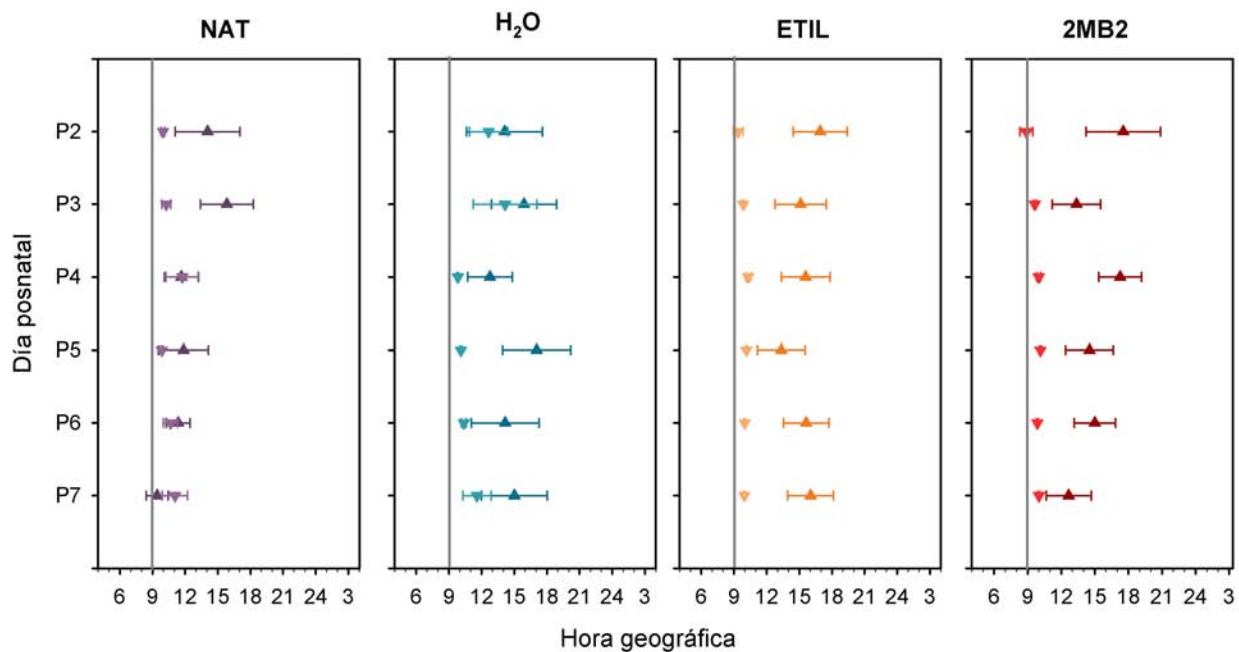
Por lo que corresponde al momento del ciclo en el que se detectó la temperatura corporal máxima T<sub>máx</sub> (Figura 10), el análisis de varianza mostró que los cuatro grupos bajo estudio exhibieron una tendencia similar (Grupo:  $F_{(3,174)} = 2.39$ ,  $p = \text{NS}$ ; Edad:  $F_{(5,174)} = 0.49$ ,  $p = \text{NS}$ ; Interacción:  $F_{(15,174)} = 0.59$ ,  $p = \text{NS}$ ). En P3 T<sub>máx</sub> se detectó a las 15:50 ± 2:26 hrs, 15:54 ± 2:59 hrs, 15:7 ± 2:21 hrs y 13:22 ± 2:9 hrs en el grupo NAT MF, H<sub>2</sub>O MF, ETIL MF y 2MB2 MF, respectivamente. En P7 ocurrió a las 9:25 ± 1:01 hrs, 15:1 ± 3:02 hrs, 16:2 ± 2:05 hrs y 12:40 ± 2:00 hrs en NAT MF, H<sub>2</sub>O MF, ETIL MF y 2MB2 MF, respectivamente.

En cuanto al momento del ciclo en el que ocurre la temperatura mínima T<sub>mín</sub> (Figura 10), se encontró un efecto significativo asociado al grupo (Grupo:  $F_{(3,174)} = 4.61$ ,  $p = 0.003$ ; Edad:  $F_{(5,174)} = 0.66$ ,  $p = \text{NS}$ ; Interacción  $F_{(15,174)} = 1.45$ ,  $p = \text{NS}$ ). En el día P3 el grupo NAT MF alcanzó la T<sub>mín</sub> a las 10:16 ± 0:24 hrs en un horario similar que el grupo ETIL MF donde T<sub>mín</sub> ocurrió a las 9:52 ± 0:5 hrs y que el grupo 2MB2 MF donde T<sub>mín</sub> se presentó a las 9:38 ± 0:7 hrs, en contraste el grupo H<sub>2</sub>O MF mostró un retraso significativo en el horario en el que se detectó T<sub>mín</sub> a las 14:10 ± 2:56 hrs, con respecto de los tres grupos anteriores. En el día P7 la T<sub>mín</sub> se presentó en un horario similar en los cuatro grupos

bajo estudio, ocurriendo a las  $11:4 \pm 1:10$  hrs,  $11:34 \pm 01:19$  hrs,  $9:57 \pm 00:05$  hrs y  $10:01 \pm 00:05$  hrs, en el grupo NAT MF, H<sub>2</sub>O MF, ETIL MF y 2MB2 MF, respectivamente.



**Figura 9.** Ejemplos representativos del patrón temporal diario individual de la temperatura corporal del día posnatal 2 al 7 de conejos neonatos, amamantados por una hembra lactante (NAT MF) o estimulados olfativamente con agua destilada (H<sub>2</sub>O MF), etilobutirato (ETIL MF) o 2-metilbut-2-enal (2MB2), en un horario fijo (tiempo local 9:00 horas) cada 24 horas. La barra gris vertical indica el momento del ciclo en el que tuvo lugar la manipulación experimental, la línea roja horizontal representa la media del día. En la parte baja se representa el promedio del patrón temporal del grupo de los días posnatales 3 y 7. Los valores se expresan como media  $\pm$  error estándar y temperatura en °C.

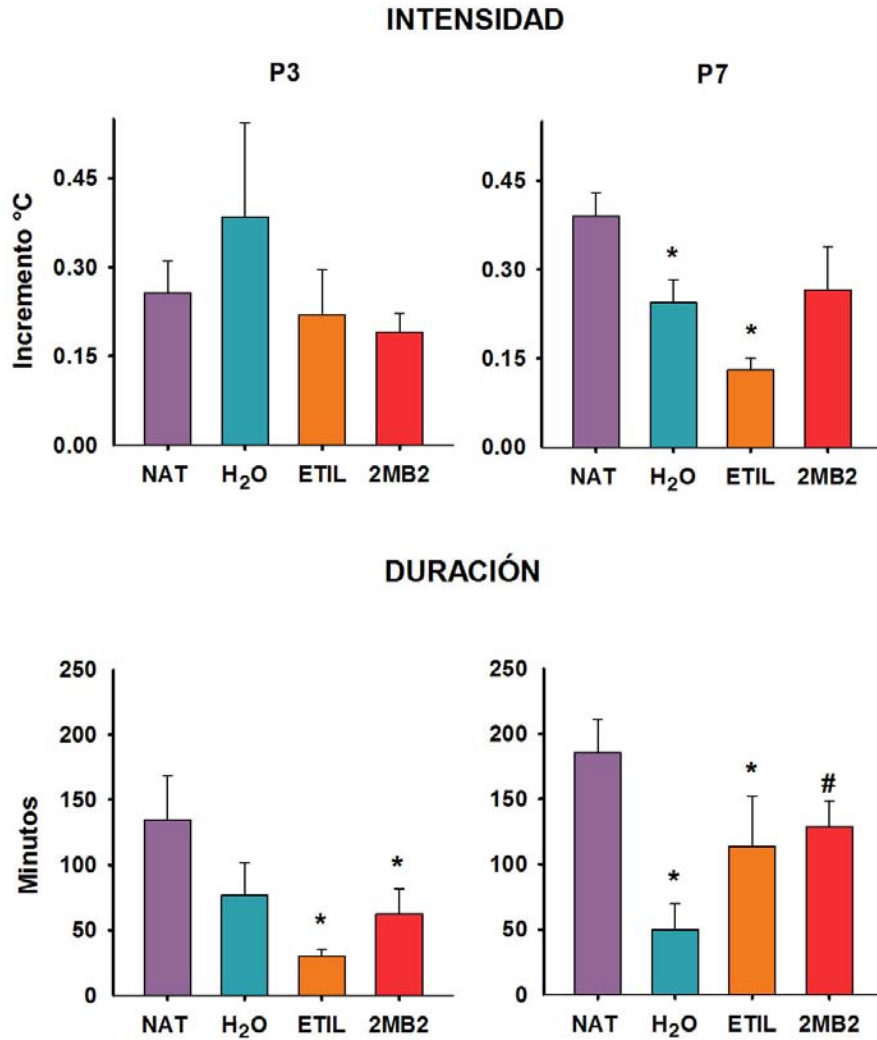


**Figura 10.** Promedio diario del horario de presentación de la temperatura corporal máxima (triángulos apuntando hacia arriba) y temperatura mínima (triángulos apuntando hacia abajo) diaria del día 2 al 7 posnatal, de conejos neonatos, amamantados por una hembra lactante (NAT MF morado) o estimulados olfativamente con agua destilada (H<sub>2</sub>O MF azul), etilisobutirato (ETIL MF naranja) o 2-metilbut-2-enal (2MB2 MF rojo), en un horario fijo (tiempo local 9:00 horas) cada 24 horas. La barra gris vertical indica el momento del ciclo en el que tuvo lugar la estimulación olfativa. Los valores se expresan como media  $\pm$  error estándar.

En cuanto a la intensidad del componente anticipatorio (Figura 11), el ANOVA de dos vías mostró un efecto significativo entre los cuatro grupos bajo estudio asociado al tratamiento de los grupos (Grupo:  $F_{(3,143)} = 5.45$ ,  $p = 0.001$ ; Edad:  $F_{(5,143)} = 0.85$ ,  $p = \text{NS}$ ; Interacción:  $F_{(15,143)} = 1.71$ ,  $p = \text{NS}$ ). En el día P3 no se encontraron diferencias significativas entre los cuatro grupos, el grupo NAT MF presentó un incremento anticipatorio en la temperatura de  $0.26 \pm 0.06$  °C, similar a lo presentado por los grupos H<sub>2</sub>O MF, ETIL MF y 2MB2 MF de  $0.39 \pm 0.16$  °C,  $0.22 \pm 0.08$  °C y  $0.19 \pm 0.03$  °C, respectivamente. En P7, el grupo NAT MF presentó un incremento anticipatorio en la temperatura de  $0.45 \pm 0.06$  °C, similar a lo que presentó el grupo 2MB2 MF de  $0.29 \pm$

0.08 °C. En contraste los grupos H<sub>2</sub>O MF y ETIL MF presentaron un incremento anticipatorio de  $0.14 \pm 0.04$  °C y  $0.23 \pm 0.08$  °C, respectivamente, por lo que la intensidad del componente anticipatorio en estos grupos fue significativamente menor en comparación con NAT MF.

En lo que respecta a la duración del componente anticipatorio (Figura 11), el ANOVA de dos vías mostró un efecto significativo entre los cuatro grupos bajo estudio y en relación a la edad (Grupo:  $F_{(3,143)} = 16.14$ ,  $p < 0.0001$ ; Edad:  $F_{(5,143)} = 2.29$ ,  $p = 0.04$ ; Interacción  $F_{(15,143)} = 1.54$ ,  $p = \text{NS}$ ). En P3, la duración de la anticipación para el grupo NAT MF fue de  $134.67 \pm 33.78$  min, similar a la duración que el grupo H<sub>2</sub>O MF presentó de  $76.80 \pm 24.68$  min, mientras que la duración la anticipación de los grupos ETIL MF y 2MB2 MF fue de  $30 \pm 5.11$  min y  $62.57 \pm 50.72$  min, respectivamente, por lo que en ambos grupos presentaron una duración significativamente menor en comparación a la observada en el grupo NAT MF. En P7, el grupo NAT MF tuvo una duración de la anticipación de  $185.56 \pm 25.67$  min similar a la duración que mostró el grupo 2MB2 MF de  $128.25 \pm 19.98$  min, por el contrario, la anticipación en el grupo ETIL MF tuvo una duración de  $113.67 \pm 38.62$  min, significativamente menor con respecto a NAT MF, mientras que el grupo H<sub>2</sub>O MF presentó una duración de  $50 \pm 19.51$  min, la cual fue estadísticamente diferente a la de los grupos NAT MF y 2MB2 MF.



**Figura 11.** Análisis del componente anticipatorio de la temperatura corporal en el día posnatal 3 y 7 de conejos neonatos, amamantados por una hembra lactante (NAT MF) o estimulados olfativamente con agua destilada (H<sub>2</sub>O MF), etilisobutirato (ETIL MF) o 2-metilbut-2-enal (2MB2 MF), en un horario fijo (tiempo local 9:00 horas) cada 24 horas. En las dos graficas superiores se muestra el promedio de la intensidad de la anticipación, se representa como el incremento en °C con respecto a la media. En el par de graficas inferiores se muestra el promedio de la duración del incremento anticipatorio, se representa en minutos. Los valores se expresan como media  $\pm$  error estándar, \* indica diferencia significativa vs NAT, # vs H<sub>2</sub>O, %vs ETIL  $p < 0.05$ .

## Cambio de Fase

En lo que se refiere al efecto del cambio de horario sobre la expresión del ritmo de temperatura corporal, se encontró que la temperatura corporal media de las crías de conejo fue diferente entre los grupos bajo estudio (Figura 12), el ANOVA de dos vías reveló efectos significativos asociados con el tratamiento de los grupos (Grupo:  $F_{(3,162)}=18.70$ ,  $p < 0.0001$ ; Edad:  $F_{(5,162)}=1.78$ ,  $p=NS$ ; Interacción:  $F_{(15,162)}=0.77$ ,  $p=NS$ ). El promedio de la temperatura corporal diaria de los conejos del grupo NAT CF en el día P3 fue de  $37.76 \pm 0.08$  °C incrementando hasta  $38.16 \pm 0.11$  °C en P7, en el caso del grupo H<sub>2</sub>O CF en P3 fue de  $37.10 \pm 0.19$  °C alcanzando  $37.09 \pm 0.24$  °C en P7, para el grupo ETIL CF fue de  $36.90 \pm 0.38$  °C durante P3, mientras que en P7 alcanzó  $36.89 \pm 0.11$  °C, finalmente en el grupo 2MB2 CF fue de  $37.26 \pm 0.17$  en P3 incrementando hasta  $37.51 \pm 0.17$  °C en P7. Cabe destacarse que en el día P7 se encontró una temperatura promedio similar entre el grupo NAT CF y 2MB2 CF, mientras que los grupos H<sub>2</sub>O CF y ETIL CF presentaron una temperatura corporal promedio menor en comparación al grupo NAT CF. Aunado a lo anterior, es de notar que el cambio de horario en la manipulación experimental tuvo un efecto significativo sobre la tendencia al incremento diarios de la temperatura dependiente de la edad de las crías, puesto que únicamente las crías del grupo NAT CF mostraron un incremento asociado a la edad.

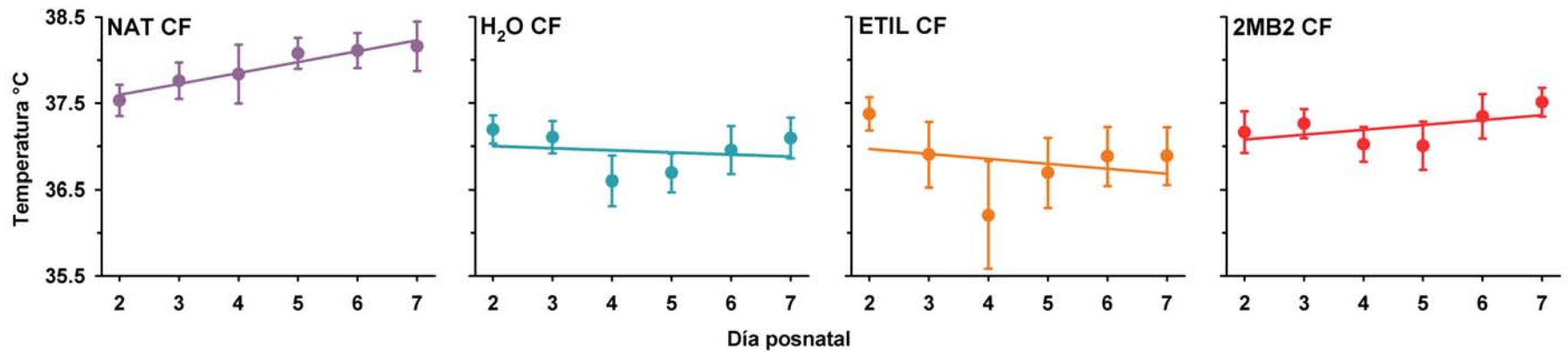
Con respecto al patrón temporal de temperatura (Figura 13), en P4 el día en el que se llevó a cabo el cambio de fase en la manipulación experimental, en el grupo NAT CF se puede observar que la temperatura promedio comienza a elevarse aproximadamente una hora antes del horario programado, a las 9:00 horas y permanece por encima de la media por 5 horas, posterior al amamantamiento a las 15:00 horas, se observa el descenso postprandial característico en la temperatura. En los días posnatales sucesivos, el patrón del ritmo de temperatura se fue ajustando al nuevo horario de amamantamiento. En P7 la temperatura corporal de las crías incrementó aproximadamente 3 horas antes del nuevo horario de amamantamiento a las 15:00 horas, minutos después de ser alimentadas la temperatura de las crías descendió por debajo de la media diaria y retorno a sus niveles basales aproximadamente 1 hora después del amamantamiento. En el

grupo 2MB2 CF en P7 se observó un patrón similar al observado en el grupo NAT CF, en contraste las crías de los grupos H<sub>2</sub>O CF y ETIL CF exhibieron un patrón atípico, en el que la temperatura corporal desciende de 1-2 horas previas a que tenga lugar la estimulación olfativa y regresa a sus niveles basales cercanos a la media de 2-3 horas después de que esta tuvo lugar.

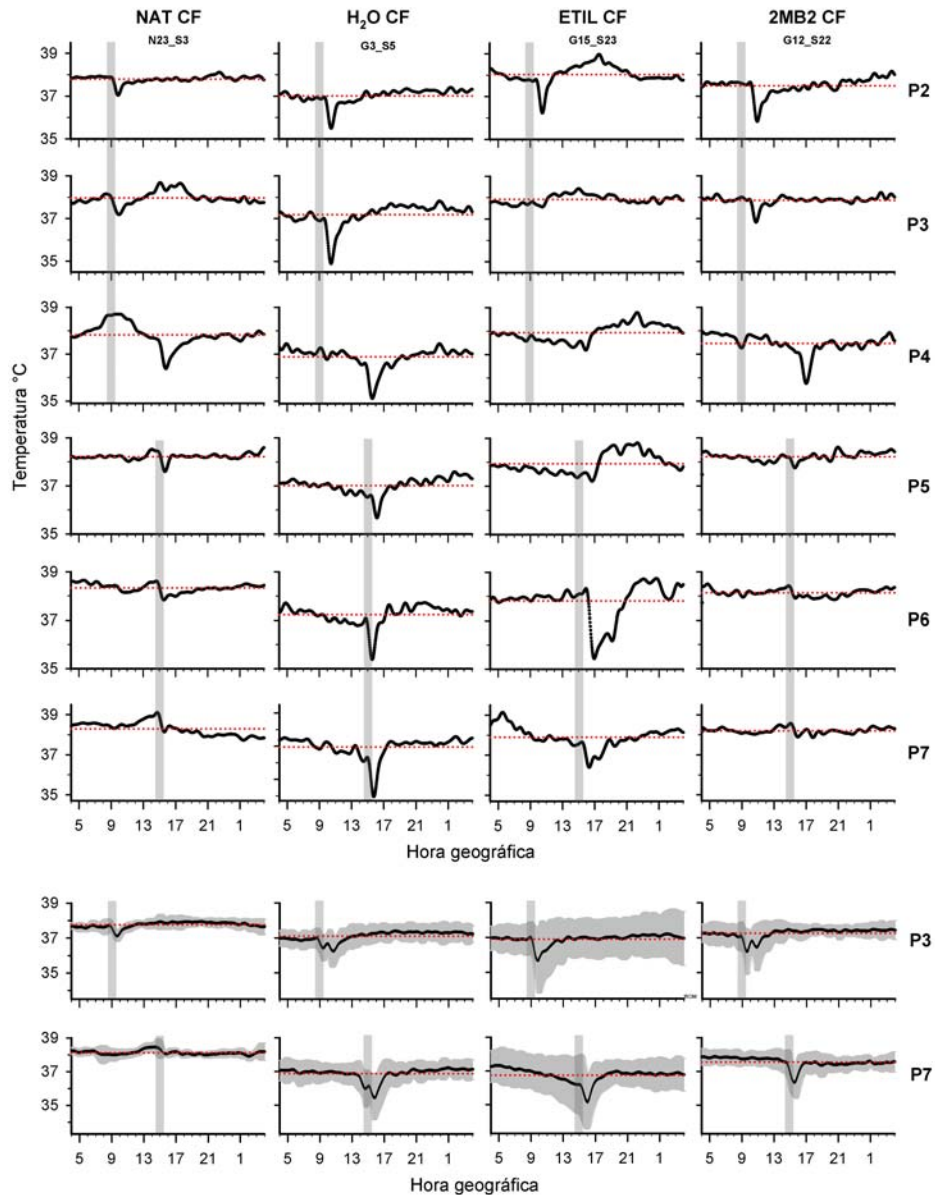
Por lo que corresponde al efecto del cambio de horario en la manipulación experimental sobre el momento del ciclo en el que ocurrió la T<sub>máx</sub> (Figura 14), el ANOVA mostró que los cuatro grupos bajo estudio exhibieron tendencias similares (Grupo:  $F_{(3,162)} = 1.35$ ,  $p = \text{NS}$ ; Edad:  $F_{(5,162)} = 0.66$ ,  $p = \text{NS}$ ; Interacción:  $F_{(15,162)} = 0.84$ ,  $p = \text{NS}$ ). En P3 la T<sub>máx</sub> ocurrió a las 15:35 ± 1:43 hrs, 21:55 ± 1:21 hrs, 18:26 ± 2:30 hrs y 18:51 ± 2:23 hrs en el grupo NAT CF, H<sub>2</sub>O CF, ETIL CF, 2MB2 CF, respectivamente. En P7 la T<sub>máx</sub> ocurrió a las 16:23 ± 1:55 hrs, 19:39 ± 2:37 hrs, 12:45 ± 3:13 hrs y 16:29 ± 2:45 hrs en el grupo NAT CF, H<sub>2</sub>O CF, ETIL CF, 2MB2 CF, respectivamente. Por lo que los grupos H<sub>2</sub>O CF y ETIL CF no mostraron un claro ajuste de fase al nuevo horario de manipulación.

En el caso del efecto del cambio de horario en la manipulación experimental sobre de la T<sub>mín</sub>, ANOVA reveló un efecto significativo asociado al grupo y a la edad (Grupo:  $F_{(3,162)} = 2.92$ ,  $p = 0.03$ ; Edad:  $F_{(5,162)} = 29.98$ ,  $p < 0.0001$ ; Interacción:  $F_{(15,162)} = 0.92$ ,  $p = \text{NS}$ ). En el día posnatal 3 la T<sub>mín</sub> ocurrió en un horario similar entre los cuatro grupos bajo estudio, presentándose a las 12:18 ± 2:34 hrs, 10:6 ± 0:30 hrs, 10:22 ± 0:11 hrs y 10:20 ± 0:13 hrs en el grupo NAT CF, H<sub>2</sub>O CF, ETIL CF, 2MB2 CF, respectivamente. En P7 la T<sub>mín</sub> se presentó en un horario similar a las 18:50 ± 2:30 hrs, 17:22 ± 1:19 hrs y 16:49 ± 1:14 hrs en los grupos NAT CF, ETIL CF y 2MB2 CF, respectivamente. Mientras que en el grupo H<sub>2</sub>O CF la T<sub>mín</sub> ocurrió 15:41 ± 0:13 hrs, un adelanto significativo en comparación con el grupo NAT CF.

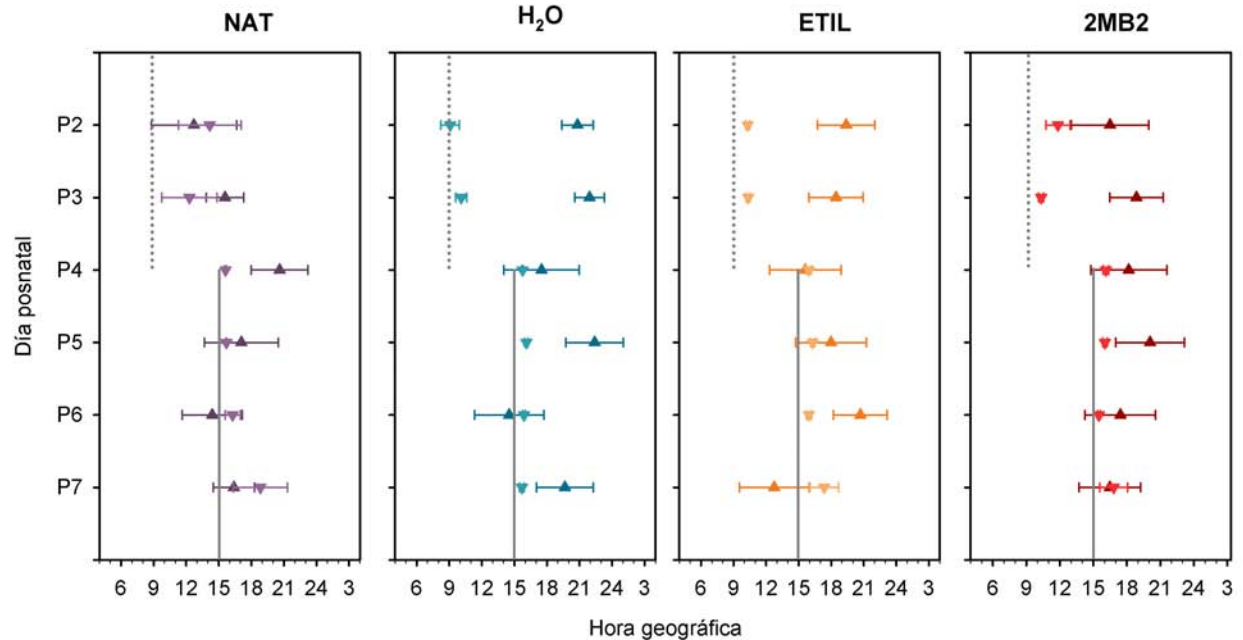




**Figura 12.** Promedio diario de la temperatura corporal del día posnatal 2 al 7, de conejos neonatos, amamantados por una hembra lactante (NAT CF morado) o estimulados olfativamente con agua destilada (H<sub>2</sub>O CF azul), etilisobutirato (ETIL CF naranja) o 2-metil-2butenal (2MB2 CF rojo), en un horario fijo (9:00 horas del tiempo local) cada 24 horas. En P2-P3 la estimulación olfativa se realizó a las 9:00 horas y a partir del día P4-P7 se retrasó 6 horas en el ciclo, realizándose a las 15:00 horas. Los valores se expresan como media  $\pm$  error estándar. NAT CF,  $r^2 = 0.930$ ; H<sub>2</sub>O CF,  $r^2 = 0.036$ ; ETIL CF,  $r^2 = 0.080$ ; 2MB2 CF,  $r^2 = 0.293$ .



**Figura 13.** Ejemplos representativos del patrón temporal diario individual temperatura corporal del día posnatal 2 al 7 de conejos neonatos, amamantados por una hembra lactante (NAT CF) o estimulados olfativamente con agua destilada (H<sub>2</sub>O CF) etilisobutirato (ETIL CF) o 2-metilbut-2-enal (2MB2 CF), en un horario fijo (9:00 horas del tiempo local) cada 24 horas. En P2-P3, la manipulación experimental se realizó a las 9:00 horas y a partir del día P4 se retrasó 6 horas en el ciclo, realizándose a las 15:00 horas. La barra gris vertical indica el momento del ciclo en el que tuvo lugar la manipulación experimental, la línea roja horizontal representa la media del día. En la parte baja se representa el promedio del patrón temporal del grupo de los días posnatales 3 y 7. Los valores se expresan como media  $\pm$  error estándar y temperatura en °C.

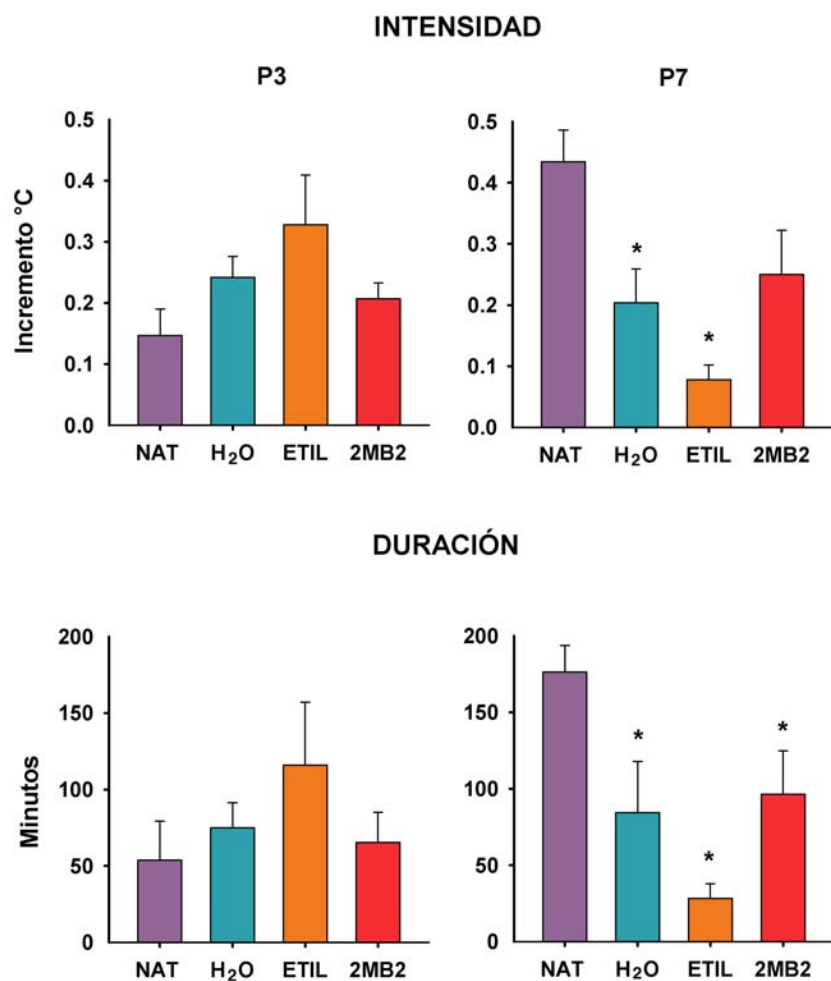


**Figura 14.** Promedio diario del horario de presentación de la temperatura corporal máxima (triángulos apuntando hacia arriba) y temperatura mínima (triángulos apuntando hacia abajo) diaria del día 2 al 7 posnatal, de conejos neonatos, amamantados por una hembra lactante (NAT CF morado) o estimulados olfativamente con agua destilada (H<sub>2</sub>O CF azul), etilisobutirato (ETIL CF naranja) o 2-metilbut-2-enal (2MB2 CF rojo), en un horario fijo cada 24 horas. En P2-P3, la manipulación experimental se realizó a las 9:00 horas y a partir del día P4 se retrasó 6 horas en el ciclo, realizándose a las 15:00 horas. La barra gris vertical indica el momento del ciclo en el que tuvo lugar la manipulación experimental. Los valores se expresan como media  $\pm$  error estándar.

En cuanto al efecto del cambio de fase sobre la intensidad del componente anticipatorio (Figura 15), el ANOVA de dos vías detectó diferencias significativas asociadas a la interacción entre el grupo y la edad (Grupo:  $F_{(3,131)} = 0.78$ ,  $p = \text{NS}$ ; Edad:  $F_{(5,131)} = 0.68$ ,  $p = \text{NS}$ ; Interacción:  $F_{(15,131)} = 2.77$ ,  $p = 0.001$ ). En el día P3 no se encontraron diferencias significativas entre los cuatro grupos, el grupo NAT CF presentó un incremento anticipatorio en la temperatura de  $0.15 \pm 0.04$  °C, similar a lo presentado por los grupos H<sub>2</sub>O CF, ETIL CF y 2MB2 CF de  $0.24 \pm 0.03$  °C,  $0.33 \pm 0.08$  °C y  $0.21 \pm 0.03$  °C, respectivamente. En P7, el grupo NAT CF presentó un incremento anticipatorio en la temperatura de  $0.43 \pm 0.05$  °C, similar a lo que presentó el grupo 2MB2 CF de  $0.25 \pm 0.07$  °C, en contraste los grupos H<sub>2</sub>O CF y ETIL CF presentaron un incremento

anticipatorio de  $0.20 \pm 0.05$  °C y  $0.08 \pm 0.02$  °C, respectivamente, por lo que la intensidad del componente anticipatorio en estos grupos fue significativamente menor en comparación con NAT CF.

En lo que respecta al efecto del cambio de fase sobre la duración del componente anticipatorio (Figura 15), el ANOVA de dos vías reveló diferencias significativas entre los cuatro grupos bajo estudio asociadas a la manipulación experimental y a la interacción entre los grupos y la edad (Grupo:  $F_{(3,131)} = 3.93$ ,  $p = 0.01$ ; Edad:  $F_{(5,131)} = 0.71$ ,  $p = \text{NS}$ ; Interacción:  $F_{(15,131)} = 2.04$ ,  $p = 0.01$ ). En P3, la duración de la anticipación para el grupo NAT MF fue de  $53.67 \pm 25.52$  min similar a la duración que se detectó en los grupos H<sub>2</sub>O CF, ETIL CF y 2MB2 CF, de  $74.86 \pm 16.46$  min,  $116.00 \pm 41.10$  min y  $65.33 \pm 19.69$  min, respectivamente. En P7, en el grupo NAT CF la anticipación duró en promedio  $176.29 \pm 17.36$  min, mientras que la anticipación en los grupos H<sub>2</sub>O CF, ETIL CF y 2MB2 CF en promedio duró  $84.33 \pm 33.47$  min,  $28.33 \pm 9.46$  min y  $96.25 \pm 28.47$  min, respectivamente, las cuales fueron estadísticamente inferiores a la duración del grupo NAT CF.



**Figura 15.** Análisis del componente anticipatorio de la temperatura corporal en el día posnatal 3 y 7 de conejos neonatos, amamantados por una hembra lactante (NAT CF) o estimulados olfativamente con agua destilada (H<sub>2</sub>O CF), etilisobutirato (ETIL CF) o 2-metilbut-2-enal (2MB2 CF), en un horario fijo (tiempo local 9:00 horas) cada 24 horas. En P2-P3, la manipulación experimental se realizó a las 9:00 horas y a partir del día P4 se retrasó 6 horas en el ciclo, realizándose a las 15:00 horas. En las dos graficas superiores se muestra el promedio de la intensidad de la anticipación, se representa como el incremento en °C con respecto a la media. En el par de graficas inferiores se muestra el promedio de la duración del incremento anticipatorio, se representa en minutos. Los valores se expresan como media  $\pm$  error estándar, \* indica diferencia significativa vs NAT, # vs H<sub>2</sub>O, %vs ETIL  $p < 0.05$ .

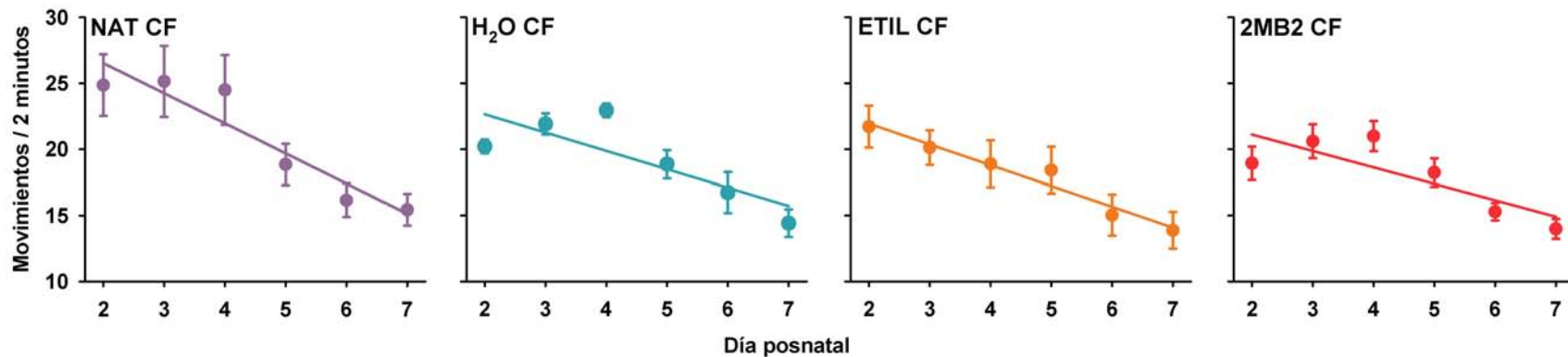
## Actividad Locomotora

### Misma Fase

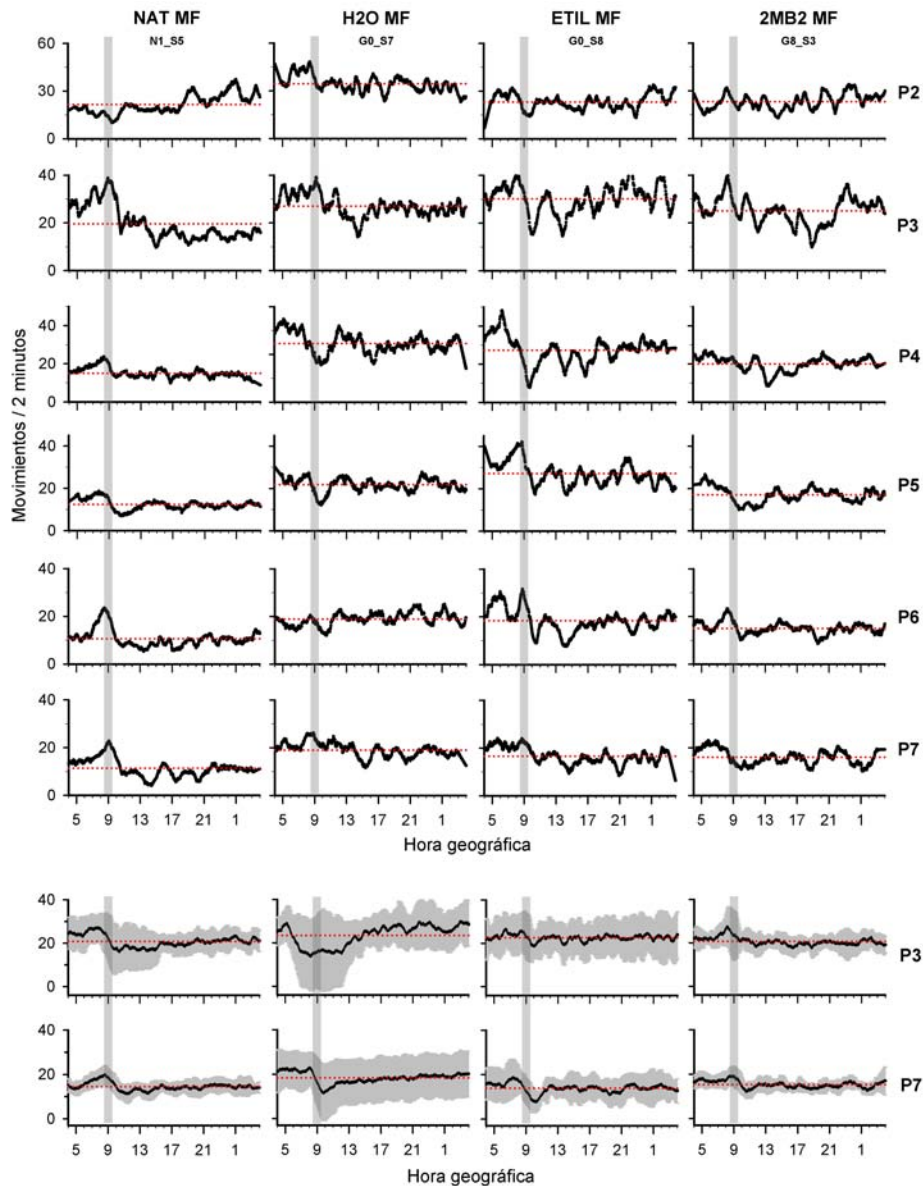
La actividad locomotora promedio de las crías de conejo de los cuatro grupos bajo estudio (Figura 16), mostró un decremento significativo dependiente de la edad (Grupo:  $F_{(3,174)}= 0.79$ ,  $p= NS$ ; Edad:  $F_{(5,174)}= 8.94$ ,  $p< 0.0001$ ; Interacción:  $F_{(15,174)}= 0.3$ ,  $p= NS$ ). En P3 las crías de conejos presentaron un promedio en la actividad locomotora de  $22.24 \pm 1.34$  movimientos en 2 minutos (mov /2 min),  $21.132 \pm 2.569$  mov /2 min,  $22.557 \pm 2.571$  mov /2 min y  $23.17 \pm 2.235$  mov /2 min para el grupo NAT MF, H<sub>2</sub>O MF, ETIL MF y 2MB2 MF, respectivamente. En P7 la actividad locomotora alcanzó los  $14.482 \pm 0.593$  mov /2 min,  $14.734 \pm 1.502$  mov /2 min y  $13.843 \pm 1.734$  mov /2 min, para los grupos NAT MF, H<sub>2</sub>O MF, ETIL MF y 2MB2 MF, respectivamente.

Con respecto al patrón temporal de actividad locomotora en P7, los cuatro grupos bajo estudio exhibieron un ritmo diurno característico (Figura 17) en el que la actividad locomotora, comenzó a elevarse aproximadamente 3 horas previas al horario de amamantamiento (9:00), aproximadamente 1 hora después de ser amamantadas la actividad de las crías descendió por debajo de la media diaria y permaneció así por aproximadamente 3-4 horas.

Por lo que corresponde al momento del ciclo en el que se detectó la actividad locomotora máxima (Actmáx) (Figura 18), el análisis de varianza mostró que los cuatro grupos bajo estudio exhibieron una tendencia similar (Grupo:  $F_{(3,173)}= 1.80$ ,  $p= NS$ ; Edad:  $F_{(5,173)}= 0.93$ ,  $p= NS$ ; Interacción:  $F_{(15,173)}= 1.18$ ,  $p= NS$ ). En P3 la Actmáx se presentó a las  $13:35 \pm 2:13$  hrs,  $15:18 \pm 2:55$  hrs,  $14:37 \pm 1:50$  hrs y  $12:03 \pm 2:04$  hrs en el grupo NAT MF, H<sub>2</sub>O MF, ETIL MF, 2MB2 MF, respectivamente. En P7 está ocurrió a las  $13:46 \pm 2:26$  hrs,  $13:51 \pm 3:17$  hrs,  $12:39 \pm 2:20$  hrs y  $17:41 \pm 2:28$  hrs. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos en relación al momento en que se presentó la actividad locomotora mínima (Actmín), (Grupo:  $F_{(3,172)}= 2$ ,  $p= NS$ ; Edad:  $F_{(5,172)}= 1.85$ ,  $p= NS$ ; Interacción:  $F_{(15,172)}= 1.60$ ,  $p= NS$ ). En P3 la Actmín ocurrió a las  $14:39 \pm 2:2$  hrs,  $11:10 \pm 2:19$  hrs,  $14:12 \pm 2:22$  hrs y  $15:30 \pm 2:2$  hrs en el grupo NAT MF, H<sub>2</sub>O MF, ETIL MF, 2MB2 MF, respectivamente.

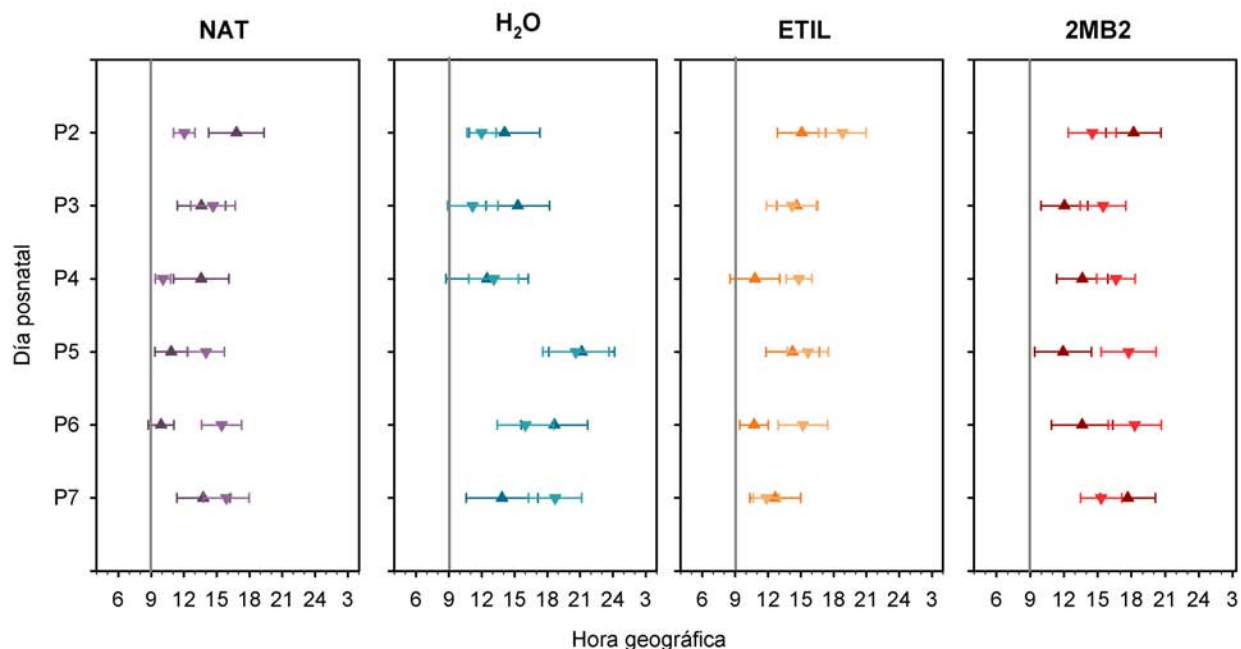


**Figura 16.** Promedio diario de la actividad locomotora del día posnatal 2 al 7, de conejos neonatos, amamantados por una hembra lactante (NAT MF: morado) o estimulados olfativamente con agua destilada (H<sub>2</sub>O MF: azul), etilisobutirato (ETIL MF: naranja) o 2-metilbut-2-enal (2MB2: rojo), en un horario fijo (9:00 horas del tiempo local) cada 24 horas. Los valores se expresan como media  $\pm$  error estándar. NAT CF,  $r^2= 0.880$ ; H<sub>2</sub>O CF,  $r^2= 0.879$ ; ETIL CF,  $r^2= 0.863$ ; 2MB2 CF,  $r^2= 0.897$ .



**Figura 17.** Ejemplos representativos del patrón temporal diario individual de actividad locomotora del día posnatal 2 al 7 de conejos neonatos, amamantados por una hembra lactante (NAT MF) o estimulados olfativamente con agua destilada (H<sub>2</sub>O MF), etilisobutirato (ETIL MF) o 2-metilbut-2-enal (2MB2), en un horario fijo (9:00 horas del tiempo local) cada 24 horas. La barra gris vertical indica el momento del ciclo en el que tuvo lugar la manipulación experimental. La línea roja horizontal representa la media del día. En la parte baja se representa el promedio del patrón temporal del grupo de los días posnatales 3 y 7. Los valores se expresan como media  $\pm$  error estándar y movimientos en 2 minutos.





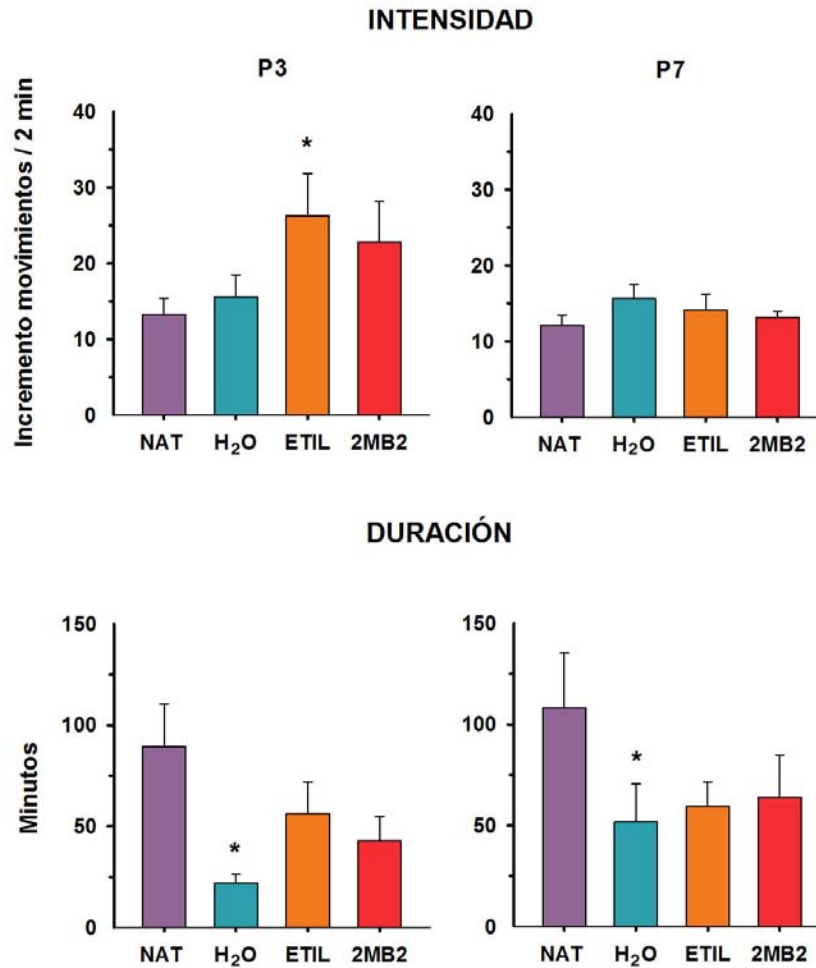
**Figura 18.** Promedio diario del horario de presentación de la actividad locomotora máxima (triángulos apuntando hacia arriba) y la actividad mínima (triángulos apuntando hacia abajo) diaria del día 2 al 7 posnatal, de conejos neonatos, amamantados por una hembra lactante (NAT MF morado) o estimulados olfativamente con agua destilada (H<sub>2</sub>O MF azul), etilisobutirato (ETIL MF naranja) o 2-metilbut-2-enal (2MB2 MF rojo), en un horario fijo (9:00 horas del tiempo local) cada 24 horas. La barra gris vertical indica el momento del ciclo en el que tuvo lugar la estimulación olfativa. Los valores se expresan como media  $\pm$  error estándar.

En P7 se presentó a las  $15:46 \pm 2:6$  hrs,  $18:51 \pm 2:27$  hrs,  $11:39 \pm 1:12$  hrs y  $15:41 \pm 1:50$  hrs en el grupo NAT MF, H<sub>2</sub>O MF, ETIL MF, 2MB2 MF, respectivamente (Figura 18).

En cuanto a la intensidad del componente anticipatorio (Figura 19), el ANOVA de dos vías mostró un efecto significativo entre los cuatro grupos bajo estudio asociado al tratamiento y a la edad (Grupo:  $F_{(3,163)} = 5.33$ ,  $p = 0.001$ ; Edad:  $F_{(5,163)} = 2.78$ ,  $p = 0.01$ ; Interacción:  $F_{(15,163)} = 1.28$ ,  $p = \text{NS}$ ). En el día P3, el grupo NAT MF presentó un incremento anticipatorio en la actividad locomotora de  $13.28 \pm 2.10$  mov /2 min, similar a lo que presentó el grupo H<sub>2</sub>O MF y 2MB2 MF de  $15.53 \pm 2.95$  mov /2 min y  $22.82 \pm 5.33$  mov /2 min, respectivamente. En contraste el grupo ETIL MF presentó un incremento anticipatorio de  $26.29 \pm 5.58$  mov /2 min, por lo que la intensidad del componente

anticipatorio en este grupo fue significativamente mayor en comparación con NAT MF. En P7 el incremento anticipatorio en la actividad locomotora entre los cuatro grupos fue similar, y fue de  $8.45 \pm 1.82$  mov /2 min,  $11.03 \pm 1.25$  mov /2 min,  $11.05 \pm 2.38$  mov /2 min,  $10.65 \pm 1.57$  mov /2 min, para el grupo NAT MF, H<sub>2</sub>O MF, ETIL MF y 2MB2 MF, respectivamente.

En lo que respecta a la duración del componente anticipatorio de la actividad locomotora (Figura 19), el ANOVA de dos vías mostró un efecto significativo entre los cuatro grupos bajo estudio asociado al tratamiento (Grupo:  $F_{(3,160)} = 3.32$ ,  $p = 0.02$ ; Edad:  $F_{(5,160)} = 1.08$ ,  $p = \text{NS}$ ; Interacción:  $F_{(15,160)} = 1.12$ ,  $p = \text{NS}$ ). En P3, la duración de la anticipación para el grupo NAT MF fue de  $89.33 \pm 21.01$  min similar a la duración que los grupos ETIL MF y 2MB2 MF presentaron de  $56.25 \pm 15.60$  min y  $43 \pm 11.85$  min, respectivamente. Mientras que la duración de la anticipación del grupo H<sub>2</sub>O MF fue de  $22 \pm 4.09$  min, significativamente menor en comparación con NAT MF. En P7, el grupo NAT MF tuvo una duración de la anticipación de  $108.20 \pm 26.95$  min, similar a la duración que mostraron los grupos ETIL MF y 2MB2 MF de  $59.50 \pm 11.92$  min y  $63.75 \pm 21.03$  min, por el contrario, la anticipación en el grupo H<sub>2</sub>O MF tuvo una duración de  $51.71 \pm 18.73$  min, significativamente menor con respecto a NAT MF.

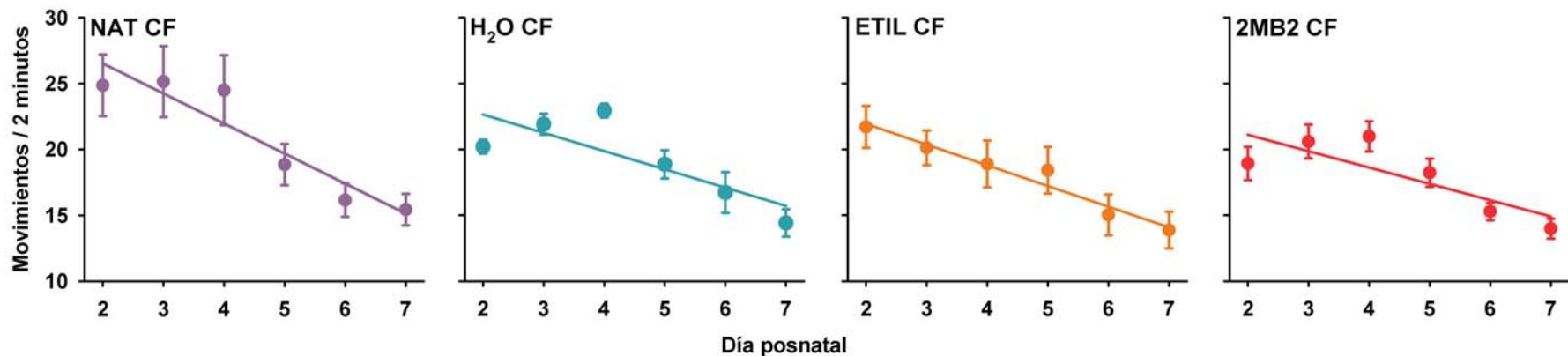


**Figura 19.** Análisis del componente anticipatorio de la actividad locomotora en el día posnatal 3 y 7 de conejos neonatos, amamantados por una hembra lactante (NAT MF) o estimulados olfativamente con agua destilada (H<sub>2</sub>O MF), etilisobutirato (ETIL MF) o 2-metilbut-2-enal (2MB2 MF), en un horario fijo (9:00 horas del tiempo local) cada 24 horas. En las dos graficas superiores se muestra el promedio de la intensidad de la anticipación, se representa como el incremento en movimientos/ 2 minutos con respecto a la media del día. En el par de graficas inferiores se muestra el promedio de la duración del incremento anticipatorio, se representa en minutos. Los valores se expresan como media  $\pm$  error estándar, \* indica diferencia significativa vs NAT, # vs H<sub>2</sub>O, %vs ETIL  $p < 0.05$ .

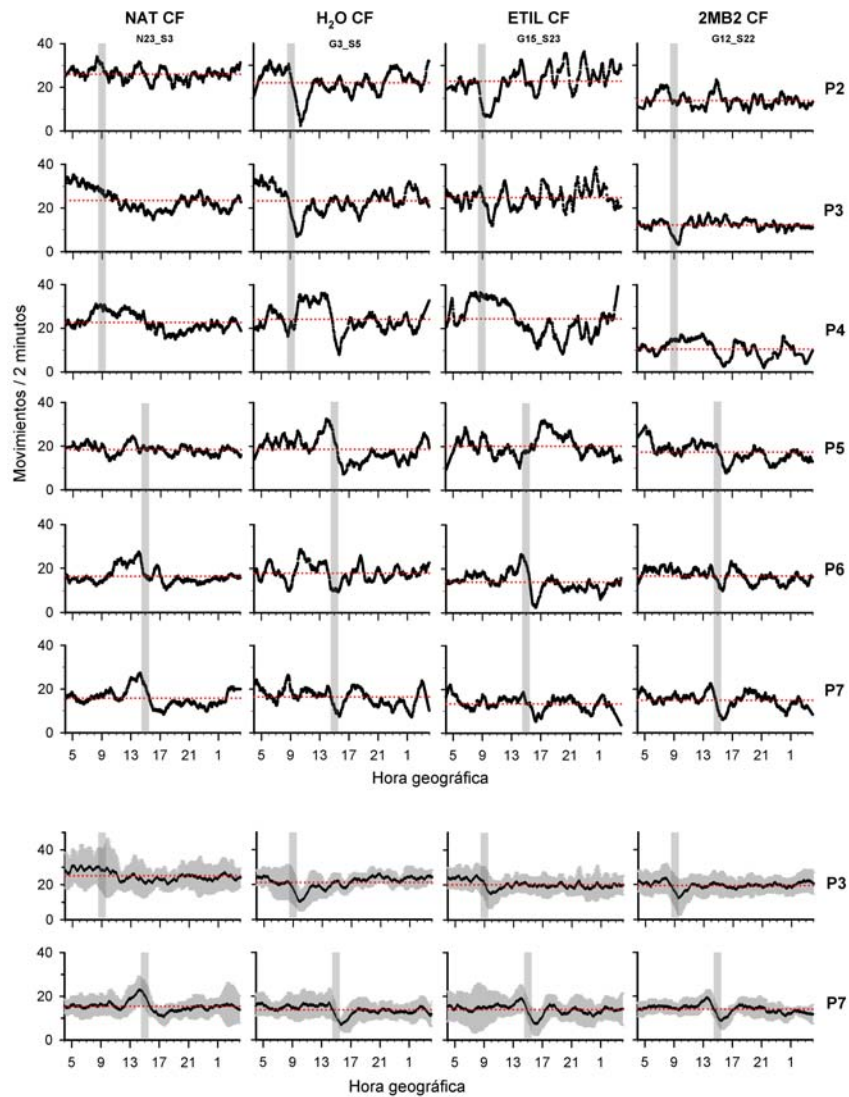
## Cambio de Fase

La actividad locomotora media de las crías de conejo de los cuatro grupos bajo estudio (Figura 20), mostró una disminución significativa asociada a la edad de las crías (Grupo:  $F_{(3,162)} = 4.92$ ,  $p = 0.002$ ; Edad:  $F_{(5,162)} = 20.82$ ,  $p < 0.0001$ ; Interacción:  $F_{(15,162)} = 0.77$ ,  $p = \text{NS}$ ). El promedio de la actividad locomotora diaria de los conejos del grupo NAT CF en el día P3 fue de  $25.15 \pm 2.69$  mov /2 min disminuyendo hasta  $15.44 \pm 1.20$  mov /2 min en P7, en el caso del grupo H<sub>2</sub>O CF en P3 fue de  $20.12 \pm 1.31$  mov /2 min llegando a  $14.42 \pm 1.04$  mov /2 min en P7, para el grupo ETIL CF fue de  $20.12 \pm 1.31$  mov /2 min en P3, mientras que en P7 alcanzó  $13.88 \pm 1.39$  mov /2 min, finalmente en el grupo 2MB2 CF fue de  $20.59 \pm 1.28$  mov /2 min en P3 y llegó a  $13.99 \pm 0.76$  mov /2 min en P7. Cabe destacar que en el día P7 no se encontraron diferencias significativas entre la actividad locomotora promedio entre los cuatro grupos bajo estudio.

Con respecto al patrón temporal de actividad locomotora (Figura 21), en P4 las crías de los grupos NAT MF, H<sub>2</sub>O CF, ETIL CF y 2MB2 exhibieron un patrón diurno similar, se observó una elevación de la actividad locomotora por encima de la media diaria aproximadamente 2 horas antes del horario en el que previamente se había llevado a cabo la manipulación experimental las 9:00 horas, la actividad locomotora permaneció elevada hasta el momento del nuevo horario de la manipulación experimental a las 15:00 horas, posteriormente la actividad locomotora disminuyó y permaneció por debajo de la media hasta el final del ciclo. Tres ciclos posteriores al cambio de fase en P7, las crías de los cuatro grupos bajo estudio exhibieron un patrón temporal en el que la actividad locomotora comienza a incrementarse sobre la media diaria aproximadamente 3 horas antes de que el amamantamiento o la estimulación olfativa tuviera lugar, minutos después de ser alimentadas la temperatura corporal de las crías descendió súbitamente por debajo de la media diaria y permaneció así por aproximadamente de 3-6 horas.

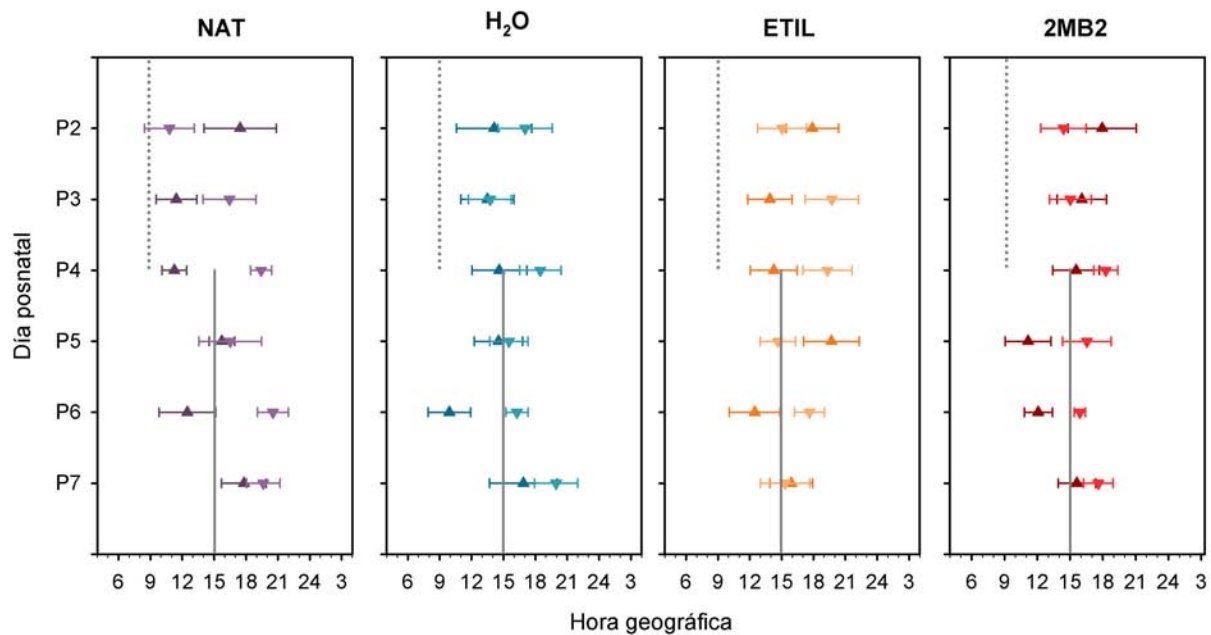


**Figura 20.** Promedio diario de la actividad locomotora del día posnatal 2 al 7, de conejos neonatos, amamantados por una hembra lactante (NAT CF morado) o estimulados olfativamente con agua destilada (H<sub>2</sub>O CF azul), etilisobutirato (ETIL CF naranja) o 2-metilbut-2-enal (2MB2 CF rojo), en un horario fijo (9:00 horas del tiempo local) cada 24 horas. En P2-P3 la manipulación experimental se realizó a las 9:00 horas y a partir del día P4-P7 se retrasó 6 horas en el ciclo, realizándose a las 15:00 horas. Los valores se expresan como media  $\pm$  error estándar. NAT CF,  $r^2= 0.880$ ; H<sub>2</sub>O CF,  $r^2= 0.654$ ; ETIL CF,  $r^2= 0.956$ ; 2MB2 CF,  $r^2= 0.672$ .



**Figura 21.** Ejemplos representativos del patrón temporal diario individual de actividad locomotora del día posnatal 2 al 7 de conejos neonatos, amamantados por una hembra lactante (NAT CF) o estimulados olfativamente con agua destilada (H<sub>2</sub>O CF) etilisobutirato (ETIL CF) o 2-metilbut-2-enal (2MB2 CF), en un horario fijo (9:00 horas del tiempo local) cada 24 horas. En P2-P3, la manipulación experimental se realizó a las 9:00 horas y a partir del día P4 se retrasó 6 horas en el ciclo, realizándose a las 15:00 horas. La barra gris vertical indica el momento del ciclo en el que tuvo lugar la manipulación experimental, la línea roja horizontal representa la media del día. En la parte baja se representa el promedio del patrón temporal del grupo de los días posnatales 3 y 7. Los valores se expresan como media  $\pm$  error estándar y movimientos en 2 minutos.

Por lo que corresponde al momento del ciclo en el que se detectó Actmáx (Figura 22), el ANOVA mostró que los cuatro grupos bajo estudio exhibieron una tendencia similar (Grupo:  $F_{(3,161)} = 0.62$ ,  $p = \text{NS}$ ; Edad:  $F_{(5,161)} = 2.66$ ,  $p = \text{NS}$ ; Interacción:  $F_{(15,161)} = 0.78$ ,  $p = \text{NS}$ ), En P3 la Actmáx se presentó a las  $11:26 \pm 1:55$  hrs,  $13:11 \pm 2:30$  hrs,  $13:53 \pm 2:5$  hrs y  $16:5 \pm 2:15$  hrs, en el grupo NAT CF, H<sub>2</sub>O CF, ETIL CF, 2MB2 CF, respectivamente. En P7 esta ocurrió a las  $17:48 \pm 2:06$  hrs,  $16:53 \pm 3:11$  hrs,  $15:55 \pm 2:02$  hrs y  $15:37 \pm 1:04$  hrs, en el grupo NAT MF, H<sub>2</sub>O CF, ETIL CF, 2MB2 CF, respectivamente. En el caso de la Actmín (Figura 22), se encontraron diferencias significativas asociadas a la edad (Grupo:  $F_{(3,161)} = 0.24$ ,  $p = \text{NS}$ ; Edad:  $F_{(5,161)} = 2.94$ ,  $p = 0.01$ ; Interacción:  $F_{(15,161)} = 1.17$ ,  $p = \text{NS}$ ). En P3 Actmín se presentó a las  $16:26 \pm 2:29$  hrs,  $13:44 \pm 2:2$  hrs,  $19:44 \pm 2:31$  hrs y  $15:1 \pm 1:55$  hrs en el grupo, NAT CF, H<sub>2</sub>O CF, ETIL CF y 2MB2 CF, respectivamente. En P7 la Actmín se presentó en un horario similar a las  $19:37 \pm 1:34$  hrs,  $19:57 \pm 2:2$  hrs,  $15:19 \pm 2:20$  hrs y  $17:35 \pm 1:20$  hrs en el grupo, NAT CF, H<sub>2</sub>O CF, ETIL CF y 2MB2 CF, respectivamente.



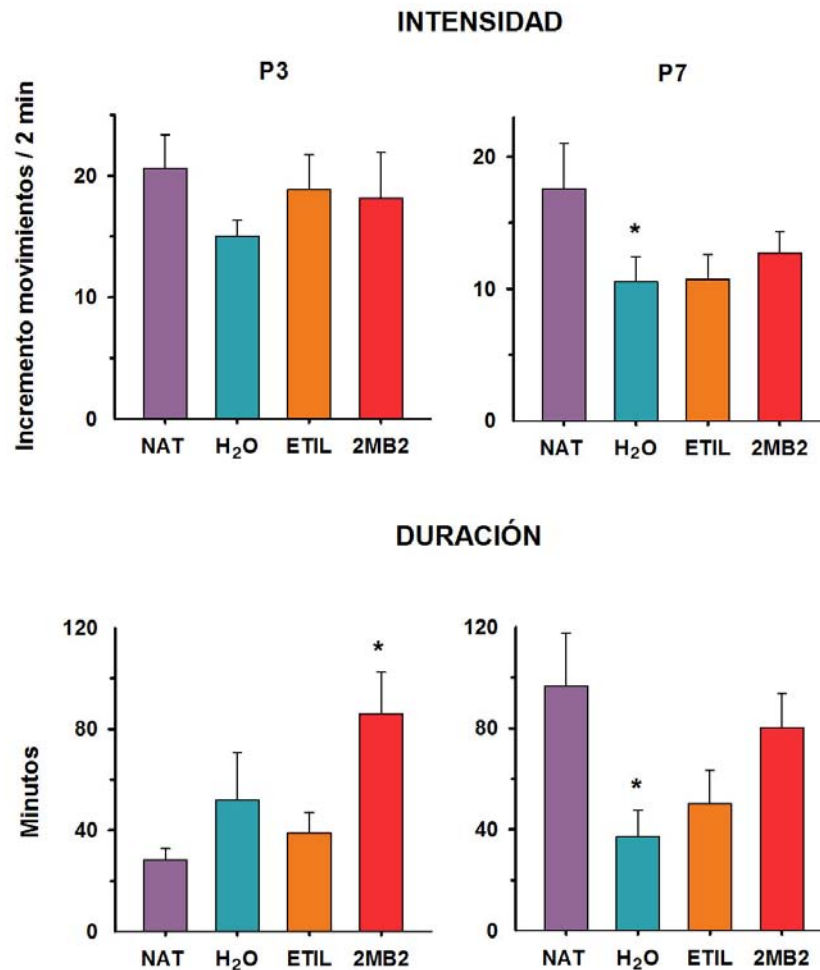
**Figura 22.** Promedio diario del horario de presentación de la actividad locomotora máxima (triángulos apuntando hacia arriba) y actividad mínima (triángulos apuntando hacia abajo) diaria del día 2 al 7 posnatal, de conejos neonatos, amamantados por una hembra lactante (NAT CF morado) o estimulados olfativamente con agua destilada (H<sub>2</sub>O CF azul), etilisobutirato (ETIL CF naranja) o 2-metilbut-2-enal (2MB2 CF rojo), en un horario fijo cada 24 horas. En P2-P3, la manipulación experimental se realizó a las 9:00 horas y a partir del día P4 se retrasó 6 horas en el ciclo, realizándose a las 15:00 horas. La barra gris

vertical indica el momento del ciclo en el que tuvo lugar la manipulación experimental. Los valores se expresan como media  $\pm$  error estándar.

En cuanto al efecto del cambio de fase sobre la intensidad del componente anticipatorio (Figura 23) el ANOVA de dos vías detectó diferencias significativas asociadas a la edad (Grupo:  $F_{(3,151)} = 0.61$ ,  $p = \text{NS}$ ; Edad:  $F_{(5,151)} = 2.61$ ,  $p = 0.02$ ; Interacción:  $F_{(15,151)} = 0.99$ ,  $p = \text{NS}$ ). En el día P3 no se encontraron diferencias significativas entre los cuatro grupos, el grupo NAT CF presentó un incremento anticipatorio en la actividad locomotora de  $20.61 \pm 2.74$  mov /2 min, similar a lo presentado por los grupos H<sub>2</sub>O CF, ETIL CF y 2MB2 CF de  $15.04 \pm 1.29$  mov /2 min,  $18.86 \pm 2.87$  mov /2 min y  $18.14 \pm 3.82$  mov /2 min, respectivamente. En P7, el grupo NAT CF presentó un incremento anticipatorio en actividad locomotora de  $17.59 \pm 3.43$  mov /2 min, similar a lo que presentaron los grupos ETIL CF y 2MB2 CF de  $10.73 \pm 1.85$  mov /2 min y  $12.71 \pm 1.58$  mov /2 min, respectivamente. En contraste el grupo H<sub>2</sub>O CF presentó un incremento anticipatorio de  $10.52 \pm 1.90$  mov /2 min, por lo que la intensidad del componente anticipatorio en este grupo fue significativamente menor en comparación con NAT CF.

En lo que respecta al efecto del cambio de fase sobre la duración de la anticipación en la actividad locomotora (Figura 23), el ANOVA de dos vías reveló un efecto significativo entre los cuatro grupos bajo estudio asociado a la manipulación experimental (Grupo:  $F_{(3,151)} = 2.73$ ,  $p = 0.04$ ; Edad:  $F_{(5,151)} = 1.04$ ,  $p = \text{NS}$ ; Interacción:  $F_{(15,151)} = 1.32$ ,  $p = \text{NS}$ ). En el día P3, el grupo NAT CF presentó una duración de la anticipación de  $28.29 \pm 4.57$  min, similar a la que los grupos H<sub>2</sub>O CF y ETIL CF presentaron de  $52 \pm 18.66$  min,  $39 \pm 8.06$  min, respectivamente. En contraste la anticipación en el grupo 2MB2 CF fue de  $86 \pm 16.25$  min, por lo que la duración en este grupo fue superior en comparación con NAT CF. En P7, en el grupo NAT CF la anticipación duró en promedio  $96.57 \pm 20.99$  min, similar a la duración de la anticipación en los grupos ETIL CF y 2MB2 CF de  $50.25 \pm 13.07$  min y  $80.25 \pm 13.58$  min, respectivamente. Por el contrario, el grupo H<sub>2</sub>O CF mostró una disminución significativa en la duración de la anticipación de  $37.25 \pm 10.36$  min, en comparación del grupo NAT CF.





**Figura 23.** Análisis del componente anticipatorio de la actividad locomotora en el día posnatal 3 y 7 de conejos neonatos, amamantados por una hembra lactante (NAT CF) o estimulados olfativamente con agua destilada (H<sub>2</sub>O CF), etilisobutirato (ETIL CF) o 2-metilbut-2-enal (2MB2 CF), en un horario fijo (tiempo local 9:00 horas) cada 24 horas. En P2-P3, la manipulación experimental se realizó a las 9:00 horas y a partir del día P4 se retrasó 6 horas en el ciclo, realizándose a las 15:00 horas. En las dos graficas superiores se muestra el promedio de la intensidad de la anticipación, se representa como el incremento en movimientos/ 2 minutos con respecto a la media. En el par de graficas inferiores se muestra el promedio de la duración del incremento anticipatorio, se representa en minutos. Los valores se expresan como media  $\pm$  error estándar, \* indica diferencia significativa vs NAT, # vs H<sub>2</sub>O, %vs ETIL  $p < 0.05$ .

## Genes Reloj

### Per1

#### *Núcleo Supraquiasmático*

En el hipotálamo de los conejos, de los cuatro grupos bajo estudio, se observó una abundante expresión del gen *Per1* (Figura 28). En los grupos que en los que la manipulación experimental se llevó a cabo a las 9:00 horas, el ANOVA de dos vías reveló diferencias significativas en la expresión del gen *Per1* con respecto al grupo, la hora del día y la interacción entre estos factores, (Grupo:  $F_{(3,64)}= 24.88$ ,  $p < 0.001$ ; Hora:  $F_{(5,64)}= 18.53$ ,  $p < 0.001$ ; Interacción:  $F_{(15,64)}= 3.67$ ,  $p = 0.001$ ). El análisis COSINOR reveló que los cuatro grupos bajo estudio exhiben una fluctuación con un periodo de 24 horas (Tabla 2) en donde los niveles máximos de *Per1* en el NSQ se presentaron en la primera mitad del ciclo para los cuatro grupos bajo estudio. Gradualmente los niveles de *Per1* descendieron y alcanzaron su abundancia mínima alrededor de las 5:30, 2:30, 6:00 y las 3:30 horas, respectivamente. Por lo que se observó una disminución en la expresión de *Per1* del 47%, 62%, 60% y del 28%, respectivamente (Figura 24, bloque izquierdo).

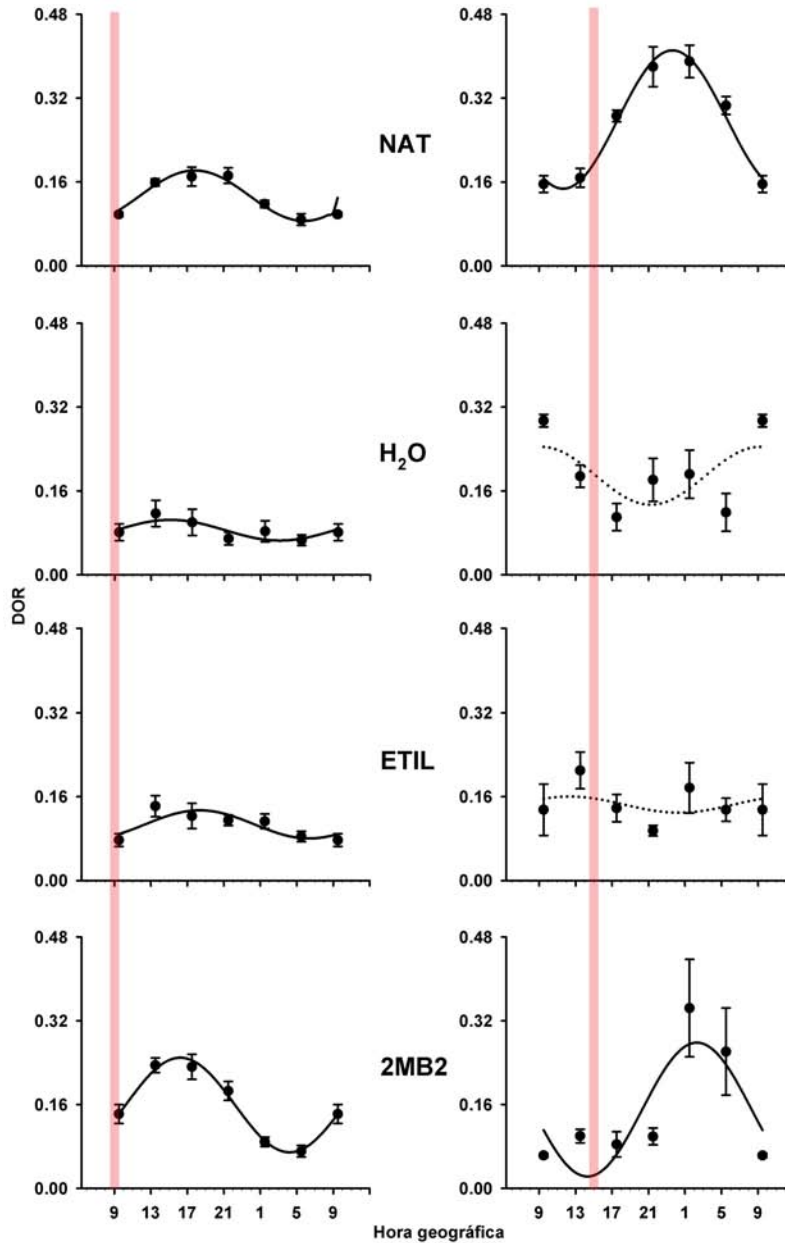
En cuanto al patrón temporal de expresión de *Per1* en el NSQ de las crías a las que se les cambio el horario de la manipulación experimental a las 15:00 horas. El ANOVA encontró diferencias significativas en la expresión de *Per1*, en relación al grupo, la hora del día y la interacción (Grupo:  $F_{(3,68)}= 11.60$ ,  $p < 0.0001$ ; Hora:  $F_{(5,68)}= 3.99$ ,  $p = 0.003$ ; Interacción:  $F_{(15,68)}= 3.70$ ,  $p = 0.0001$ ). El ajuste COSINOR arrojó datos significativos sobre la presencia de una fluctuación de 24 horas en los niveles de expresión de *Per1* en el NSQ de las crías de los grupos NAT CF y 2MB2 CF (Tabla 2), estos grupos presentaron los niveles máximos del gen en la segunda mitad del ciclo, mientras que el nadir se observó aproximadamente a las 11:00 horas para el grupo NAT CF y a las 14:00 horas para 2MB2 CF, mostrando una disminución del 36% y del 8% en la expresión del gen, respectivamente (Figura 24, bloque derecho).

En lo que respecta al efecto del cambio de fase, el grupo NAT CF exhibió un retraso de 5 h 18 min en comparación con NAT MF, mientras que el grupo 2MB2 CF exhibió un retraso de 10 h 5min horas en comparación con 2MB2 MF en la expresión de *Per1* Figura 24).

**Tabla 2.** Resultados del análisis COSINOR en el perfil de expresión del gen *Per1* en el NSQ de conejos de 7 días de edad, se muestran los valores del mesor, amplitud, acrofase (horas: minutos, del tiempo local), porcentaje de ritmicidad y el valor de  $p$ , para un ritmo de 24 horas.

***Per1* NSQ**

GRUPO	MESOR	AMPLITUD	ACROFASE	% DE RITMICIDAD	$p < 0.05$
NAT MF	0.134	0.048	17:50	96.53	✓
H <sub>2</sub> O MF	0.085	0.02	14:37	61.62	✓
ETIL MF	0.107	0.027	17:52	63.65	✓
2MB2 MF	0.159	0.09	15:44	98.72	✓
NAT CF	0.279	0.132	23:08	98.39	✓
H <sub>2</sub> O CF	0.189	0.055	--	36.67	--
ETIL CF	0.148	0.015	--	10.3	--
2MB2 CF	0.15	0.128	01:49	67.67	✓



**Figura 24.** Patrón temporal de expresión del gen *Per1* en el NSQ de conejos de 7 días de edad (P7), amamantados por una hembra lactante grupo NAT o estimulados olfativamente con agua destilada grupo H<sub>2</sub>O, o etilisobutirato grupo ETIL, o 2-metilbut-2-enal grupo 2MB2 en un horario fijo, cada 24 horas. Para los grupos del bloque izquierdo la manipulación experimental se realizó de P2-P7 a las 9:00 horas del tiempo local, para los grupos del bloque derecho la manipulación experimental se realizó en P2- P3, a las 9:00 horas y de P4-P7 a las 15:00 horas. Los círculos negros representan densidad óptica relativa media (DOR)  $\pm$  error estándar, la línea continua representa el ajuste a una función cosenosoidal de 24 horas, cuando el porcentaje de ritmicidad fue superior al 50% y  $p < 0.05$ , la línea discontinua indica cuando las condiciones anteriores no se cumplieron.

### ***Bulbo olfativo capa glomerular***

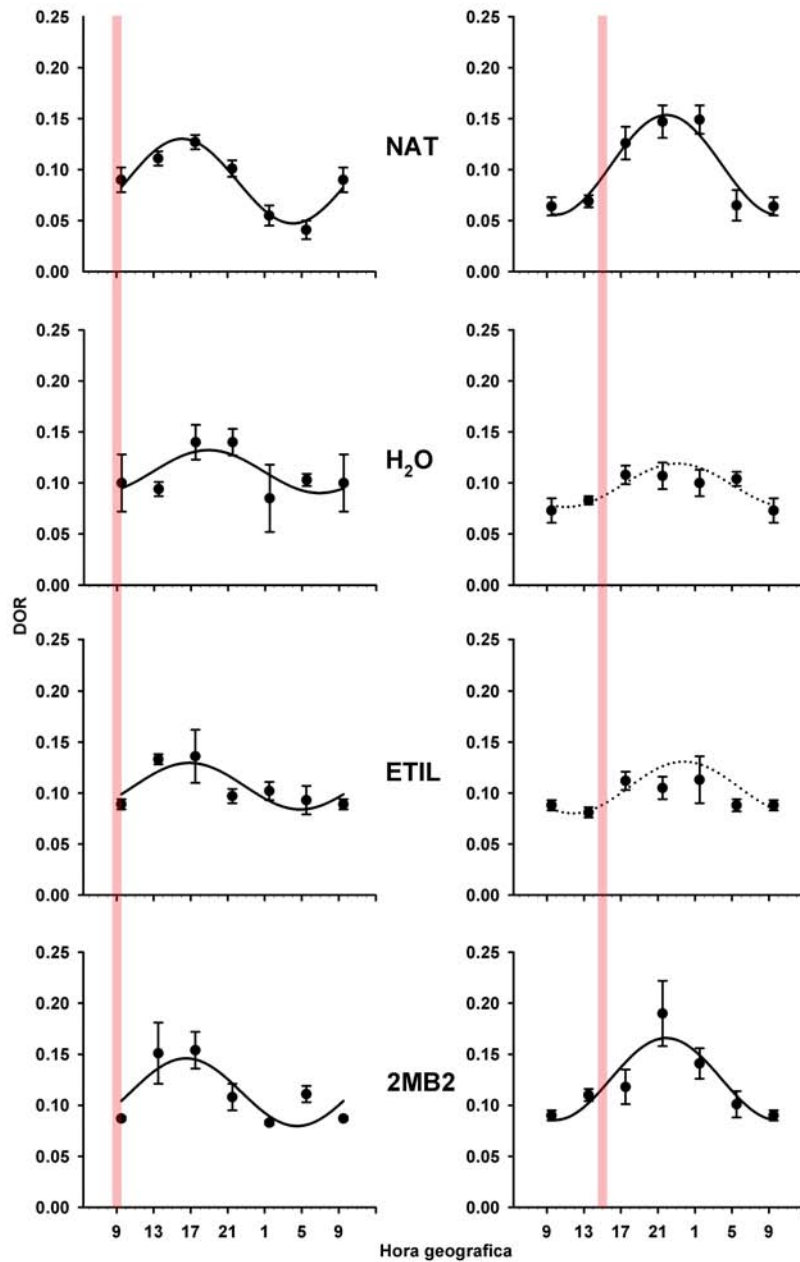
En el BO, de las crías de todos los grupos experimentales, se detectó la expresión del gen *Per1* de forma abundante (Figura 29). En los grupos que en los que la manipulación experimental se llevó a cabo a las 9:00 horas, el ANOVA de dos vías reveló diferencias significativas en la expresión del gen *Per1* en la capa glomerular del BO asociadas al grupo, la hora del día y la interacción (Grupo:  $F_{(3,72)} = 4.92$ ,  $p = 0.003$ ; Hora:  $F_{(5,72)} = 11.49$ ,  $p < 0.0001$ ; Interacción:  $F_{(15,72)} = 1.90$ ,  $p = 0.03$ ). El análisis COSINOR reveló que los cuatro grupos bajo estudio exhiben una fluctuación con un periodo de 24 horas (Tabla 3), en donde los niveles máximos de *Per1* en la capa glomerular del BO, se presentaron en la primera mitad del ciclo en los cuatro grupos bajo estudio. Gradualmente los niveles de *Per1* descendieron y presentando su abundancia mínima alrededor de las 3:30, 6:30, 4:30 y las 4:00 horas, respectivamente. Por lo que se observó una disminución en la expresión de *Per1* del 36%, 68%, 65% y del 55%, respectivamente (Figura 25, bloque izquierdo).

En relación a los grupos de crías donde el horario de la manipulación experimental se retrasó 6 horas, el ANOVA reveló diferencias significativas asociadas al grupo, la hora del día y la interacción entre estos (Grupo:  $F_{(3,74)} = 4.66$ ,  $p = 0.004$ ; Hora:  $F_{(5,74)} = 17.04$ ,  $p < 0.0001$ ; Interacción:  $F_{(15,74)} = 2.26$ ,  $p = 0.01$ ). El ajuste COSINOR arrojó datos significativos sobre la presencia de una fluctuación de 24 horas en los niveles de expresión de *Per1* en la capa glomerular del BO de las crías de los grupos NAT CF y 2MB2 CF (Tabla 3). Los niveles máximos de *Per1* en estos grupos se observaron en la segunda mitad del ciclo. Mientras que la abundancia mínima de *Per1* se observó al inicio del ciclo a las 9:30 horas en ambos grupos, mostrando una disminución del 36% y 52%, en el grupo NAT CF y 2MB2 CF, respectivamente (Figura 25, bloque derecho).

En cuanto al efecto del cambio de fase sobre el patrón de expresión del gen *Per1* en la capa glomerular del BO, se observó un retraso de 5 h 51 min para el grupo NAT CF y de 5 h 23 min para 2MB2 CF (Figura 25).

**Tabla 3.** Resultados del análisis COSINOR en el perfil de expresión del gen *Per1* en la capa glomerular del BO de conejos de 7 días de edad, se muestran los valores del mesor, amplitud, acrofase (horas: minutos, del tiempo local) porcentaje de ritmicidad y el valor de *p*, para un ritmo de 24 horas.

<b><i>Per1</i> BO Glomerular</b>					
<b>GRUPO</b>	<b>MESOR</b>	<b>AMPLITUD</b>	<b>ACROFASE</b>	<b>% DE RITMICIDAD</b>	<b><i>p</i> &lt; 0.05</b>
NAT MF	0.089	0.041	15:34	93.92	✓
H <sub>2</sub> O MF	0.111	0.021	18:23	53.78	✓
ETIL MF	0.107	0.023	16:21	65.32	✓
2MB2 MF	0.111	0.033	15:60	62.46	✓
NAT CF	0.105	0.049	21:26	91.8	✓
H <sub>2</sub> O CF	0.098	0.021	--	48	--
ETIL CF	0.105	0.025	--	38.99	--
2MB2 CF	0.126	0.04	21:23	82.02	✓



**Figura 25.** Patrón temporal de expresión del gen *Per1* en la capa glomerular del BO de conejos de 7 días de edad (P7), amamantados por una hembra lactante grupo NAT o estimulados olfativamente con agua destilada grupo H<sub>2</sub>O, o etilisobutirato grupo ETIL, o 2-metilbut-2-enal grupo 2MB2 en un horario fijo, cada 24 horas. Para los grupos del bloque izquierdo la manipulación experimental se realizó de P2-P7 a las 9:00 horas del tiempo local, para los grupos del bloque derecho la manipulación experimental se realizó en P2 y P3, a las 9:00 horas y de P4-P7 a las 15:00 horas. Los círculos negros representan densidad óptica relativa media (DOR) ± error estándar, la línea continua representa el ajuste a una función cosenosoidal de 24 horas, cuando el porcentaje de ritmicidad fue superior al 50% y  $p < 0.05$ , la línea discontinua indica cuando las condiciones anteriores no se cumplieron.

### ***Bulbo olfativo capa mitral***

En los grupos en los que la manipulación experimental se llevó a cabo a las 9:00 horas, el ANOVA de dos vías reveló diferencias significativas en la expresión del gen *Per1* en la capa mitral del BO asociadas al grupo, la hora del día y la interacción entre estas (Grupo:  $F_{(3,77)} = 2.74$ ,  $p = 0.04$ ; Hora:  $F_{(5,77)} = 19.85$ ,  $p < 0.001$ ; Interacción:  $F_{(15,77)} = 2.61$ ,  $p = 0.003$ ). El análisis COSINOR reveló que los cuatro grupos bajo estudio exhiben una fluctuación con un periodo de 24 horas (Tabla 4) en donde los niveles máximos de *Per1* en la capa mitral del BO se presentaron durante la primera mitad del ciclo en todos los grupos. Posteriormente los niveles de *Per1* descendieron, exhibiendo su mínima abundancia alrededor de las 5:30, 7:30, 4:00 y las 5:00 horas, respectivamente. Por lo que se observó una disminución en la expresión de *Per1* en la capa mitral del BO del 39%, 54%, 51% y del 46%, respectivamente (Figura 26, bloque izquierdo).

En cuanto la expresión de *Per1* en la capa mitral del BO de las crías de los grupos donde el horario de la manipulación experimental se cambió de fase, el ANOVA encontró cambios significativos a lo largo del día (Grupo:  $F_{(3,74)} = 0.06$ ,  $p = \text{NS}$ ; Hora:  $F_{(5,74)} = 14.87$ ,  $p < 0.0001$ ; Interacción:  $F_{(15,74)} = 2.46$ ,  $p = \text{NS}$ ). El ajuste COSINOR arrojó datos significativos sobre la presencia de una fluctuación de 24 horas en los niveles de expresión de *Per1* en la capa mitral del BO de los grupos NAT CF y 2MB2 CF (Tabla 4). Estos grupos presentaron los niveles máximos del gen durante la segunda mitad del ciclo y su abundancia mínima alrededor de las 9:30 y de las 8:30 horas en el grupo NAT CF y 2MB2 CF, respectivamente. Por lo que mostraron una disminución del 41% y del 51%, respectivamente (Figura 26, bloque derecho).

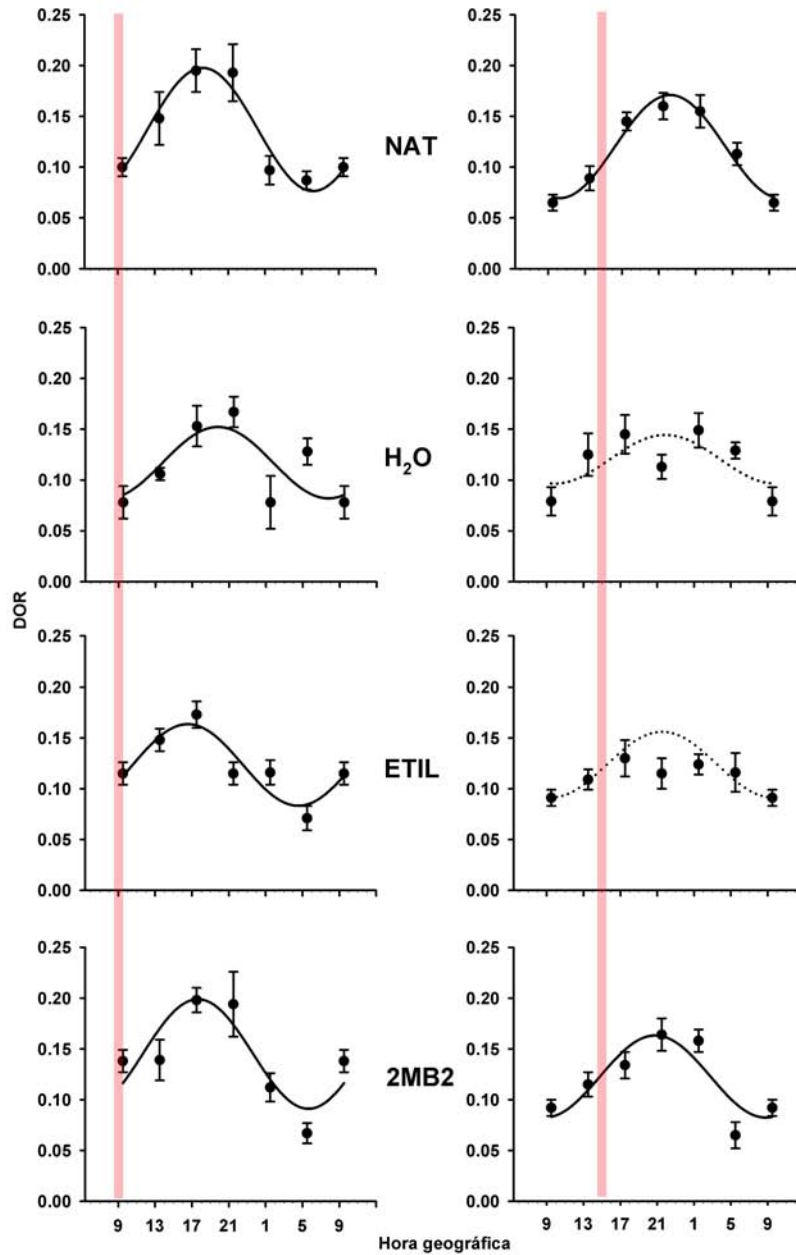
En lo que respecta al efecto del cambio de fase sobre el patrón de expresión del gen *Per1* en la capa mitral del BO, se observó un retraso de 4 h 1 min para NAT CF en comparación con NAT MF y 3 h 9min para 2MB2 CF en comparación con 2MB2 MF (Figura 26).



**Tabla 4.** Resultados del análisis COSINOR en el perfil de expresión del gen *Per1* en la capa mitral del BO de conejos de 7 días de edad, se muestran los valores del mesor, amplitud, acrofase (horas: minutos, del tiempo local) porcentaje de ritmicidad y el valor de *p*, para un ritmo de 24 horas.

***Per1* BO Mitral**

GRUPO	MESOR	AMPLITUD	ACROFASE	% DE RITMICIDAD	<i>p</i> < 0.05
NAT MF	0.137	0.061	17:43	93.63	✓
H <sub>2</sub> O MF	0.117	0.035	19:17	54.71	✓
ETIL MF	0.123	0.04	16:03	81.61	✓
2MB2 MF	0.145	0.054	17:09	76.27	✓
NAT CF	0.12	0.051	21:44	96.96	✓
H <sub>2</sub> O CF	0.12	0.024	--	45.82	--
ETIL CF	0.124	0.032	--	35.46	--
2MB2 CF	0.123	0.04	20:17	77.43	✓



**Figura 26.** Patrón temporal de expresión del gen *Per1* en la capa mitral del BO de conejos de 7 días de edad (P7), amamantados por una hembra lactante grupo NAT o estimulados olfativamente con agua destilada grupo H<sub>2</sub>O, o etilisobutirato grupo ETIL, o 2-metilbut-2-enal grupo 2MB2 en un horario fijo, cada 24 horas. Para los grupos del bloque izquierdo la manipulación experimental se realizó de P2-P7 a las 9:00 horas del tiempo local, para los grupos del bloque derecho la manipulación experimental se realizó en P2 y P3, a las 9:00 horas y de P4-P7 a las 15:00 horas. Los círculos negros representan densidad óptica relativa media (DOR) ± error estándar, la línea continua representa el ajuste a una función cosenosoidal de 24 horas, cuando el porcentaje de ritmicidad fue superior al 50% y  $p < 0.05$ , la línea discontinua indica cuando las condiciones anteriores no se cumplieron.

### ***Bulbo olfativo capa granular***

En los grupos que en los que la manipulación experimental se llevó a cabo a la misma hora, el ANOVA de dos vías reveló diferencias significativas en la expresión del gen *Per1* en la capa granular del BO asociadas a la hora del día y al grupo (Grupo:  $F_{(3,73)} = 5.57$ ,  $p = 0.001$ ; Hora:  $F_{(5,73)} = 10.99$ ,  $p < 0.0001$ ; Interacción:  $F_{(15,73)} = 1.27$ ,  $p = \text{NS}$ ). El análisis COSINOR reveló que los cuatro grupos bajo estudio exhiben una fluctuación con un periodo de 24 horas (Tabla 5), en donde los niveles máximos de *Per1* en la capa granular del BO, se presentaron durante la segunda mitad del ciclo en todos los grupos. Posteriormente, los niveles de *Per1* descendieron y alcanzaron sus niveles más bajos alrededor de las 10:30, 11:30, 13:00 y las 11:00 horas para NAT MF, H<sub>2</sub>O MF, ETIL MF y 2MB2 MF, respectivamente. Momento en el que se observó una disminución en la expresión de *Per1* del 54%, 78%, 75% y del 54%, respectivamente (Figura 27, bloque izquierdo).

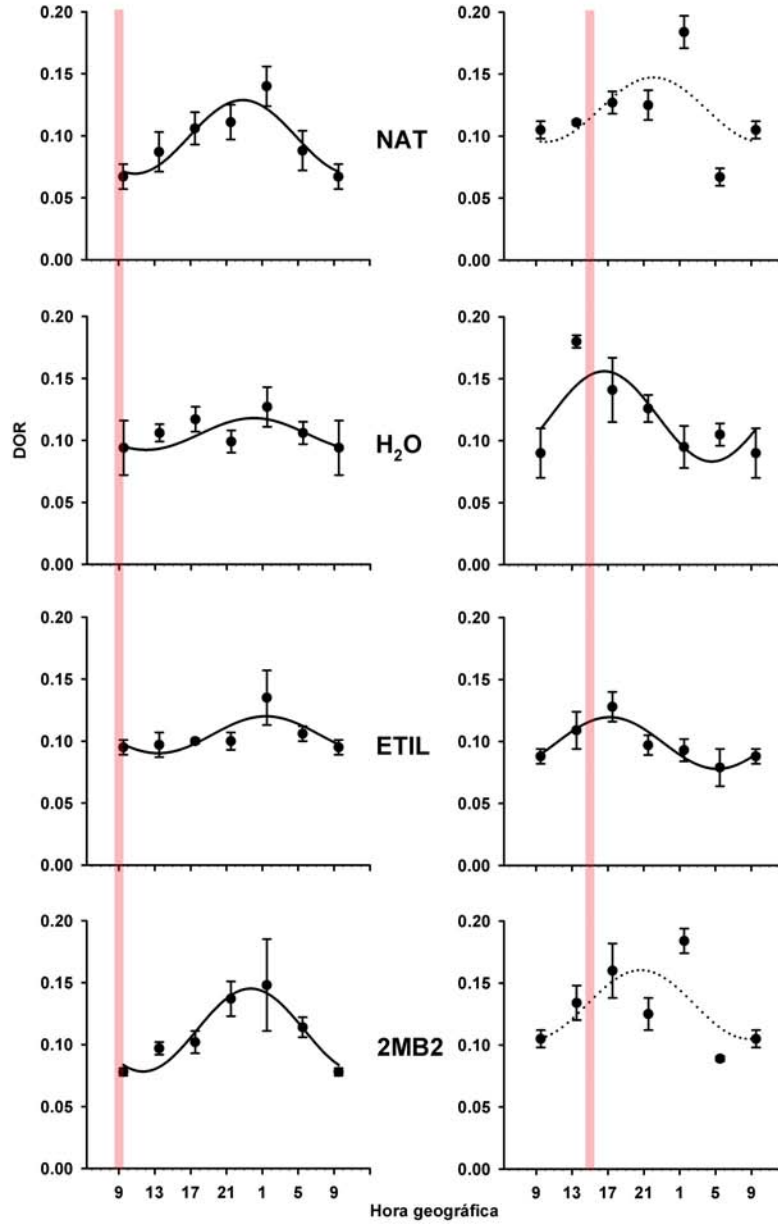
En relación a los grupos de crías donde el horario de la manipulación experimental se retrasó 6 horas, el ANOVA encontró cambios significativos a lo largo del día (Grupo:  $F_{(3,72)} = 0.82$ ,  $p = \text{NS}$ ; Hora:  $F_{(5,72)} = 7.70$ ,  $p < 0.0001$ ; Interacción:  $F_{(15,72)} = 0.62$ ,  $p = \text{NS}$ ). El ajuste COSINOR arrojó datos significativos sobre la presencia de una fluctuación de 24 horas en los niveles de expresión de *Per1* en la capa granular del BO de las crías de los grupos H<sub>2</sub>O CF y ETIL CF (Tabla 5). Los niveles máximos de *Per1* se observaron en la segunda mitad del ciclo en ambos grupos, mientras que el mínimo se observó a las 16:06 y 16:43 horas, respectivamente, por lo que la expresión de *Per1* mostro una disminución del 78% y 75%, respectivamente (Figura 27, bloque derecho).

En cuanto al efecto del cambio de fase sobre el patrón de expresión del gen *Per1* en la capa granular del BO, se observó un adelanto de 7 h 24 min para H<sub>2</sub>O CF y 8 h 11 min para ETIL CF en comparación con los grupos que mantuvieron la misma fase en la manipulación experimental (Figura 27).

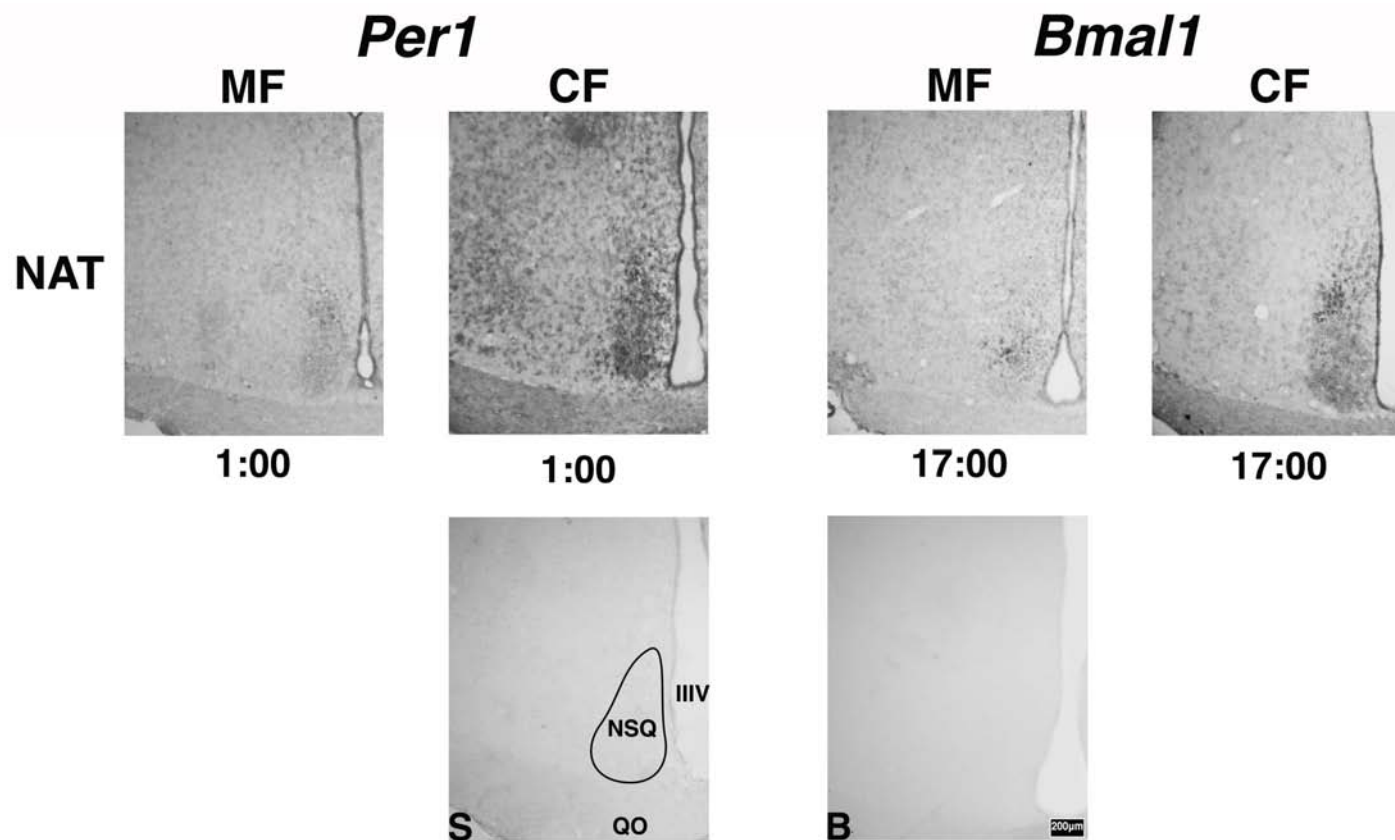
**Tabla 5.** Resultados del análisis COSINOR en el perfil de expresión del gen *Per1* en la capa granular del BO de conejos de 7 días de edad, se muestran los valores del mesor, amplitud, acrofase (horas: minutos, del tiempo local) porcentaje de ritmicidad y el valor de  $p$ , para un ritmo de 24 horas.

***Per1* BO Granular**

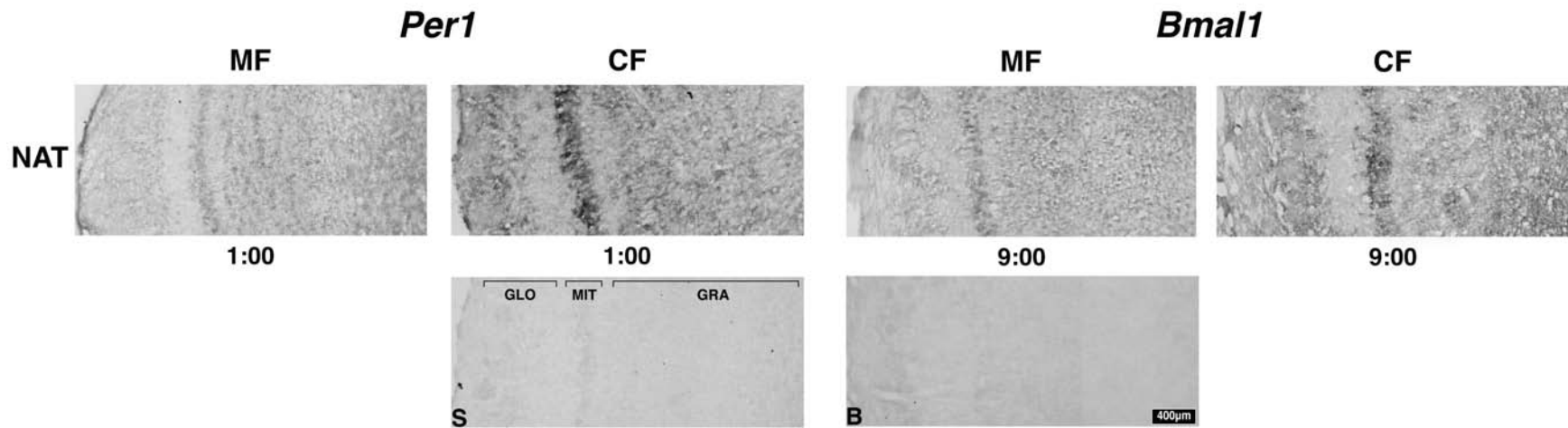
<b>GRUPO</b>	<b>MESOR</b>	<b>AMPLITUD</b>	<b>ACROFASE</b>	<b>% DE RITMICIDAD</b>	<b><math>p &lt; 0.05</math></b>
NAT MF	0.099	0.03	22:20	81.58	✓
H <sub>2</sub> O MF	0.105	0.013	23:30	51.08	✓
ETIL MF	0.105	0.015	24:54	59.67	✓
2MB2 MF	0.112	0.033	23:12	91.09	✓
NAT CF	0.121	0.026	--	35.53	--
H <sub>2</sub> O CF	0.12	0.036	16:06	60.77	✓
ETIL CF	0.099	0.021	16:43	85.58	✓
2MB2 CF	0.133	0.028	--	44.14	--



**Figura 27.** Patrón temporal de expresión del gen *Per1* en la capa granular del BO de conejos de 7 días de edad (P7), amamantados por una hembra lactante grupo NAT o estimulados olfativamente con agua destilada grupo H<sub>2</sub>O, o etilisobutirato grupo ETIL, o 2-metilbut-2-enal grupo 2MB2 en un horario fijo, cada 24 horas. Para los grupos del bloque izquierdo la manipulación experimental se realizó de P2-P7 a las 9:00 horas del tiempo local, para los grupos del bloque derecho la manipulación experimental se realizó en P2 y P3, a las 9:00 horas y de P4-P7 a las 15:00 horas. Los círculos negros representan densidad óptica relativa media (DOR) ± error estándar, la línea continua representa el ajuste a una función cosenosoidal de 24 horas, cuando el porcentaje de ritmicidad fue superior al 50% y  $p < 0.05$ , la línea discontinua indica cuando las condiciones anteriores no se cumplieron.



**Figura 28.** Microfotografías representativas que muestran la expresión de los genes reloj *Per1* a las 1:00 horas (tiempo local) y *Bmal1* a las 17:00 horas (tiempo local), en el núcleo supraquiasmático de conejos de 7 días de edad. Los animales fueron amamantados por una hembra lactante (NAT) en un horario fijo, cada 24 horas. Para los grupos MF la manipulación experimental se realizó de P2-P7 a las 9:00 horas del tiempo local. Para los grupos CF la manipulación experimental se realizó en P2 y P3, a las 9:00 horas y de P4-P7 a las 15:00 horas. S: control hibridado con sonda sentido, B: control hibridado con medio de hibridación, NSQ: núcleo supraquiasmático, IIIV: tercer ventrículo, QO: quiasma óptico, barra de escala= 200µm.



**Figura 29.** Microfotografías representativas que muestran la expresión de los genes reloj *Per1* a las 1:00 horas (tiempo local) y *Bmal1* a las 9:00 horas (tiempo local), en las capas glomerular, mitral y granular del bulbo olfativo de conejos de 7 días de edad. Los animales fueron amamantados por una hembra lactante (NAT) en un horario fijo, cada 24 horas. Para los grupos MF la manipulación experimental se realizó de P2-P7 a las 9:00 horas del tiempo local. Para los grupos CF la manipulación experimental se realizó en P2 y P3, a las 9:00 horas y de P4-P7 a las 15:00 horas. S: control hibridado con sonda sentido, B: control hibridado con medio de hibridación, GLO: capa glomerular, MIT: capa mitral, GRA: capa granular, barra de escala= 400µm.

## Bmal1

### Núcleo Supraquiasmático

En los cuatro grupos bajo estudio se observó una abundante expresión del gen *Bmal1* en el NSQ (Figura 28). En los grupos que en los que la manipulación experimental se llevó a cabo a la misma hora, el ANOVA de dos vías reveló diferencias significativas asociadas al grupo, la hora del día y la interacción entre estas (Grupo:  $F_{(3,68)} = 7.67$ ,  $p = 0.0002$ ; Hora:  $F_{(5,68)} = 18.96$ ,  $p < 0.0001$ ; Interacción:  $F_{(15,68)} = 2.90$ ,  $p = 0.001$ ). El análisis COSINOR reveló que los grupos NAT MF, ETIL MF y 2MB2 MF exhiben una fluctuación con un periodo de 24 horas (Tabla 6) en donde los niveles máximos de *Bmal1* en el NSQ se presentaron al inicio del ciclo en todos los casos. Posteriormente los niveles de *Bmal1* descendieron y alcanzaron su mínimo alrededor de las 21:00, 19:30 y las 19:00 horas, en el grupo NAT MF, ETIL MF y 2MB2 MF, respectivamente. Por lo que se observó una disminución en la expresión de *Bmal1* del 21%, 41% y del 33%, respectivamente (Figura 30, bloque izquierdo).

En cuanto a las crías de los grupos donde el horario de la manipulación experimental se cambió de fase, el ANOVA encontró diferencias significativas en la expresión de *Bmal1* en el NSQ, en cuanto al grupo y la hora del día (Grupo:  $F_{(3,69)} = 20.24$ ,  $p < 0.0001$ ; Hora:  $F_{(5,69)} = 6.15$ ,  $p < 0.0001$ ; Interacción:  $F_{(15,69)} = 0.83$ ,  $p = \text{NS}$ ). El ajuste COSINOR arrojó datos significativos sobre la presencia de una fluctuación de 24 horas en los niveles de expresión de *Bmal1* en el NSQ de las crías de los grupos NAT CF y 2MB2 CF (Tabla 6). Los niveles máximos del gen se observaron en la primera mitad del ciclo, mientras que el nadir se alcanzó alrededor de las 2:00 y 2:30 horas para el grupo NAT CF y 2MB2 CF, respectivamente. Mostrando una disminución del 20% y 63% en la expresión del gen, respectivamente (Figura 30, bloque derecho).

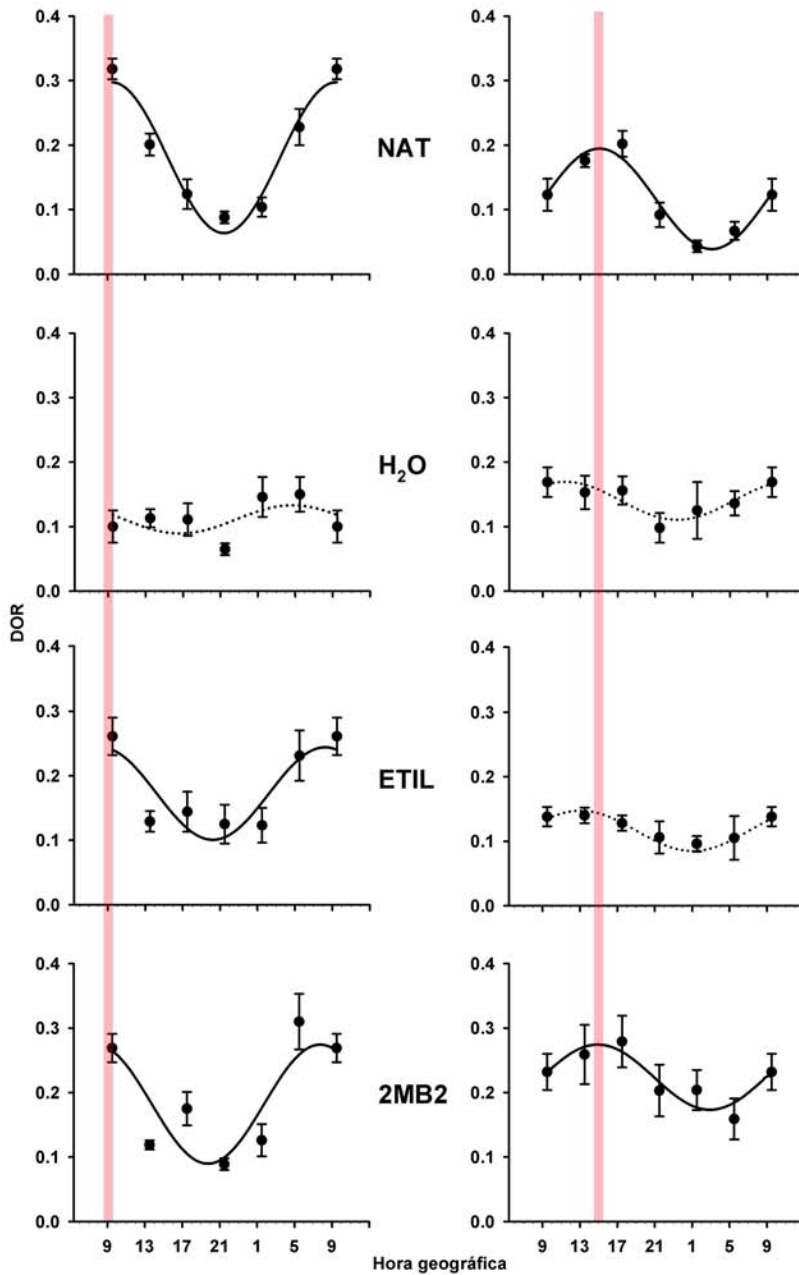
En lo que respecta al efecto del cambio de fase sobre el patrón temporal de la expresión del gen *Bmal1* en el NSQ, se observó un retraso de 5 h 37 min y 7 h 51 min horas en el grupo NAT CF y 2MB2 CF, respectivamente, en comparación con los grupos que mantuvieron la misma fase en la manipulación experimental (Figura 30).



**Tabla 6.** Resultados del análisis COSINOR en el perfil de expresión del gen *Bmal1* en el NSQ de conejos de 7 días de edad, se muestran los valores del mesor, amplitud, acrofase (horas: minutos, del tiempo local) porcentaje de ritmicidad y el valor de  $p$ , para un ritmo de 24 horas.

***Bmal1* NSQ**

<b>GRUPO</b>	<b>MESOR</b>	<b>AMPLITUD</b>	<b>ACROFASE</b>	<b>% DE RITMICIDAD</b>	<b><math>p &lt; 0.05</math></b>
NAT MF	0.181	0.117	8:56	94.28	✓
H <sub>2</sub> O MF	0.111	0.022	--	28.91	--
ETIL MF	0.172	0.072	8:44	75.5	✓
2MB2 MF	0.182	0.092	7:14	68.52	✓
NAT CF	0.117	0.078	14:33	94.33	✓
H <sub>2</sub> O CF	0.14	0.029	--	49.77	--
ETIL CF	0.116	0.031	--	33.47	--
2MB2 CF	0.15	0.128	14:55	67.67	✓



**Figura 30.** Patrón temporal de expresión del gen *Bmal1* en el NSQ de conejos de 7 días de edad (P7), amamantados por una hembra lactante grupo NAT o estimulados olfativamente con agua destilada grupo H<sub>2</sub>O, o etilisobutirato grupo ETIL, o 2-metilbut-2-enal grupo 2MB2 en un horario fijo, cada 24 horas. Para los grupos del bloque izquierdo la manipulación experimental se realizó de P2-P7 a las 9:00 horas del tiempo local, para los grupos del bloque derecho la manipulación experimental se realizó en P2 y P3, a las 9:00 horas y de P4-P7 a las 15:00 horas. Los círculos negros representan densidad óptica relativa media (DOR) ± error estándar, la línea continua representa el ajuste a una función cosenoidal de 24 horas, cuando el porcentaje de ritmicidad fue superior al 50% y  $p < 0.05$ , la línea discontinua indica cuando las condiciones anteriores no se cumplieron.

### **Bulbo olfativo capa glomerular**

En el BO, de las crías de todos los grupos experimentales, se detectó la expresión del gen *Bmal1* de forma abundante (Figura 29). En los grupos que en los que la manipulación experimental se llevó a cabo a las 9:00 horas, el ANOVA de dos vías reveló diferencias significativas en la expresión del gen *Bmal1* en la capa glomerular del BO, asociadas al grupo y a la hora del día (Grupo:  $F_{(3,73)}= 3.63$ ,  $p= 0.01$ ; Hora:  $F_{(5,73)}= 4.07$ ,  $p= 0.002$ ; Interacción:  $F_{(15,73)}= 1.20$ ,  $p= NS$ ). El análisis COSINOR detectó la presencia de un ritmo de 24 horas en la expresión de *Bmal1* para los grupos, NAT MF, ETIL MF y 2MB2 MF (Tabla 7). Los niveles máximos de *Bmal1* en la capa glomerular del BO, se presentaron durante la segunda mitad del ciclo para NAT MF, ETIL MF y 2MB2 MF. Posteriormente los niveles de *Bmal1* descendieron y alcanzaron su mínimo alrededor de las 14:30 y las 9:00 horas, para NAT MF, ETIL MF y 2MB2 MF, respectivamente. Por lo que se observó una disminución en la expresión del gen del 62%, 70% y del 70%, respectivamente (Figura 31, bloque izquierdo).

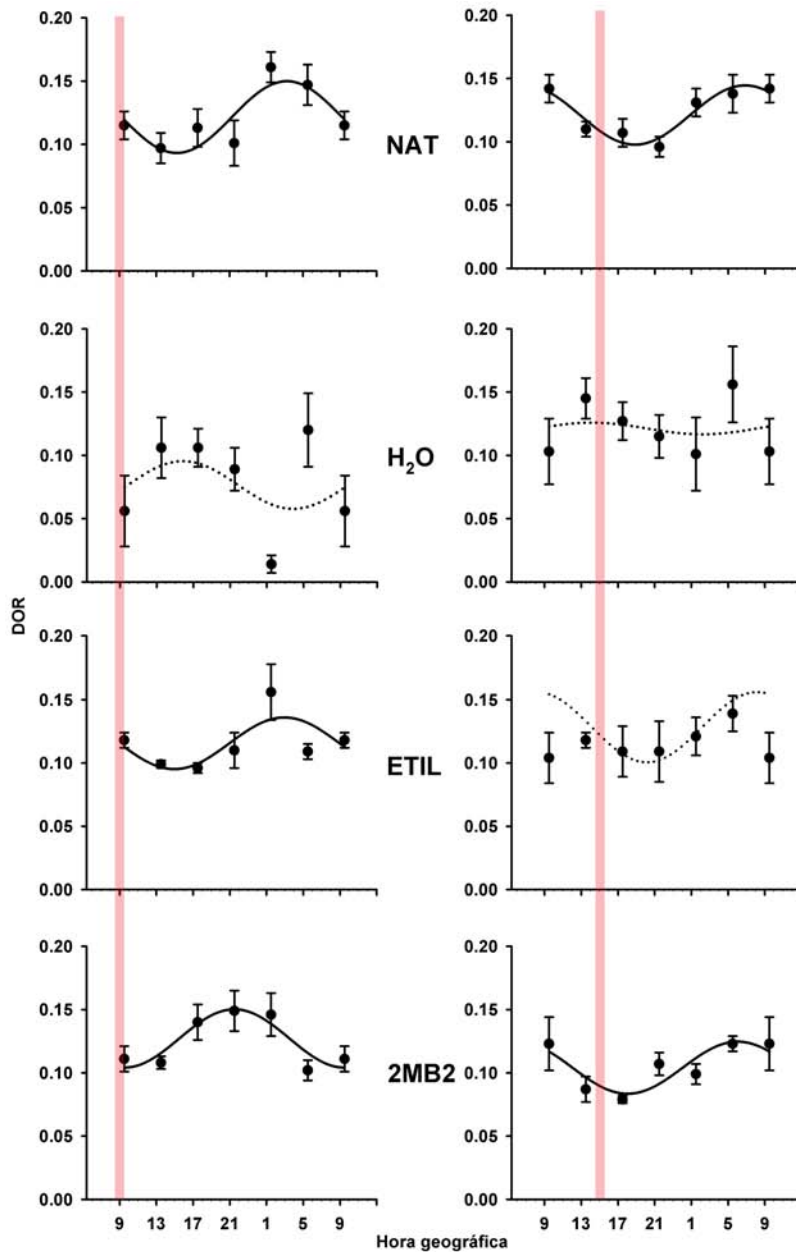
En relación a los grupos de crías donde el horario de la manipulación experimental se retrasó 6 horas, el ANOVA encontró diferencias a lo largo del día en la expresión de *Bmal1* (Grupo:  $F_{(3,74)}= 2.32$ ,  $p= NS$ ; Hora:  $F_{(5,74)}= 2.92$ ,  $p= 0.01$ ; Interacción:  $F_{(15,74)}= 1.05$ ,  $p= NS$ ). El ajuste COSINOR arrojó datos significativos sobre la presencia de una fluctuación de 24 horas en los niveles de expresión de *Bmal1* en la capa glomerular del BO de las crías de los grupos NAT CF y 2MB2 CF (Tabla 7), en donde los niveles máximos de *Bmal1* se observaron al final del ciclo, mientras que los niveles más bajos ocurrieron cerca de las 18:30 y las 17:30 horas, mostrando una disminución del 68% y del 67%, en el grupo NAT CF, y 2MB2 CF, respectivamente (Figura 31, bloque derecho).

En cuanto al efecto del cambio de fase sobre el patrón de expresión del gen *Bmal1* en la capa glomerular del BO, se observó un retraso de 3 h 35 min para NAT CF y 8 h 33 min para 2MB2 CF en comparación con los grupos que mantuvieron la misma fase en la manipulación experimental (Figura 31)

**Tabla 7.** Resultados del análisis COSINOR en el perfil de expresión del gen *Bmal1* en la capa glomerular del BO de conejos de 7 días de edad, se muestran los valores del mesor, amplitud, acrofase (horas: minutos, del tiempo local) porcentaje de ritmicidad y el valor de *p*, para un ritmo de 24 horas.

***Bmal1* BO glomerular**

GRUPO	MESOR	AMPLITUD	ACROFASE	% DE RITMICIDAD	<i>p</i> < 0.05
NAT MF	0.122	0.028	2:45	71.29	✓
H <sub>2</sub> O MF	0.077	0.019	--	13.46	--
ETIL MF	0.116	0.02	2:28	52.92	✓
2MB2 MF	0.127	0.023	21:00	84.28	✓
NAT CF	0.121	0.023	6:20	89.09	✓
H <sub>2</sub> O CF	0.121	0.005	--	2.266	--
ETIL CF	0.128	0.028	--	33.72	--
2MB2 CF	0.104	0.021	5:33	70.6	✓



**Figura 31.** Patrón temporal de expresión del gen *Bmal1* en la capa glomerular de conejos de 7 días de edad (P7), amamantados por una hembra lactante grupo NAT o estimulados olfativamente con agua destilada grupo H<sub>2</sub>O, o etilisobutirato grupo ETIL, o 2-metilbut-2-enal grupo 2MB2 en un horario fijo, cada 24 horas. Para los grupos del bloque izquierdo la manipulación experimental se realizó de P2-P7 a las 9:00 horas del tiempo local, para los grupos del bloque derecho la manipulación experimental se realizó en P2 y P3, a las 9:00 horas y de P4-P7 a las 15:00 horas. Los círculos negros representan densidad óptica relativa media (DOR)  $\pm$  error estándar, la línea continua representa el ajuste a una función cosenosoidal de 24 horas, cuando el porcentaje de ritmicidad fue superior al 50% y  $p < 0.05$ , la línea discontinua indica cuando las condiciones anteriores no se cumplieron.

### ***Bulbo olfativo capa mitral***

En los grupos en los que la manipulación experimental se llevó a cabo a las 9:00 horas, el ANOVA de dos vías reveló diferencias significativas en la expresión del gen *Bmal1* en la capa mitral del BO asociadas al grupo, y a la interacción (Grupo:  $F_{(3,68)} = 3.37$ ,  $p = 0.023$ ; Hora:  $F_{(5,68)} = 1.27$ ,  $p = \text{NS}$ ; Interacción:  $F_{(15,68)} = 2.77$ ,  $p = 0.002$ ). El análisis COSINOR reveló que los grupos NAT MF y ETIL MF exhiben fluctuaciones con un periodo de 24 horas (Tabla 8) en donde los niveles máximos de *Bmal1* en la capa mitral del BO se presentaron en la segunda mitad del ciclo. Los niveles de *Bmal1* descendieron, alcanzando su mínimo alrededor de las 12:00 en el grupo NAT MF y a las 16:30 ETIL MF. Se observó una disminución en la expresión de *Bmal1* en la capa mitral del BO del 77% y del 61%, respectivamente (Figura 32, bloque izquierdo).

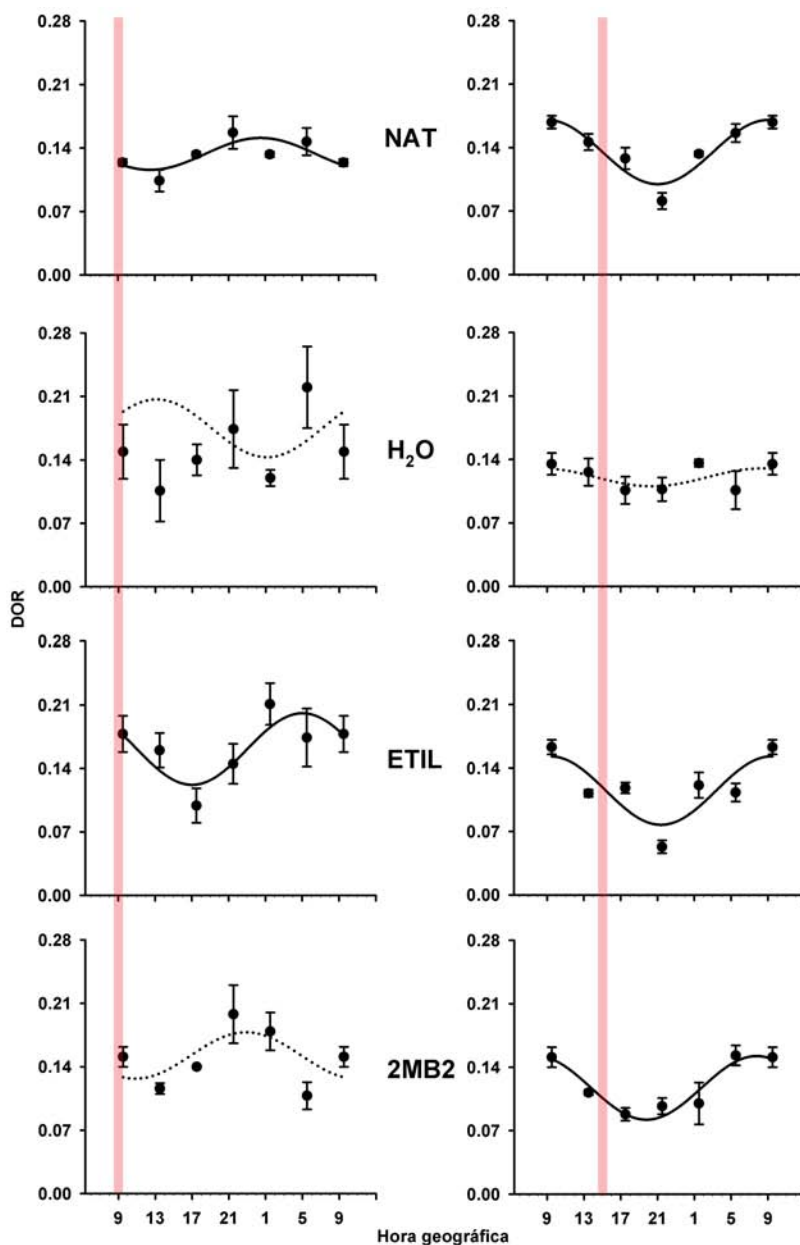
En cuanto la expresión de *Bmal1* en la capa mitral del BO de las crías de los grupos donde el horario de la manipulación experimental se cambió de fase, el ANOVA encontró cambios significativos en relación al grupo, a la hora del día y la interacción entre estas (Grupo:  $F_{(3,76)} = 3.80$ ,  $p = 0.01$ ; Hora:  $F_{(5,76)} = 13.80$ ,  $p < 0.0001$ ; Interacción:  $F_{(15,76)} = 2.38$ ,  $p = 0.007$ ). El ajuste COSINOR arrojó datos significativos sobre la presencia de una fluctuación de 24 horas en los niveles de expresión de *Bmal1* en la capa mitral del BO de los grupos NAT CF, ETIL CF y 2MB2 CF (Tabla 8). Estos grupos presentaron los niveles máximos del gen durante la primera mitad del ciclo. Mientras que los niveles mínimos de *Bmal1* se observaron a las 20:30, 21:00 y las 19:30 horas, el grupo NAT CF, ETIL CF y 2MB2 CF, respectivamente. Mostrando una disminución del 58%, 51% y del 54%, respectivamente (Figura 32, bloque derecho).

En cuanto al efecto del cambio de fase sobre el patrón de expresión del gen *Bmal1* en la capa glomerular del BO, se observó un retraso de 8 h 32 min para NAT CF, 4 h 21 min para ETIL CF y de 8 h 55 min para 2MB2 CF, en comparación con los grupos que mantuvieron la misma fase en la manipulación experimental (Figura 32).

**Tabla 8.** Resultados del análisis COSINOR en el perfil de expresión del gen *Bmal1* en la capa mitral del BO de conejos de 7 días de edad, se muestran los valores del mesor, amplitud, acrofase (horas: minutos, del tiempo local) porcentaje de ritmicidad y el valor de  $p$ , para un ritmo de 24 horas.

***Bmal1* BO Mitral**

GRUPO	MESOR	AMPLITUD	ACROFASE	% DE RITMICIDAD	$p < 0.05$
NAT MF	0.134	0.018	23:59	60.88	✓
H <sub>2</sub> O MF	0.175	0.032	--	16.31	--
ETIL MF	0.161	0.04	4:32	67.05	✓
2MB2 MF	0.152	0.026	--	40.7	--
NAT CF	0.135	0.035	8:32	87.43	✓
H <sub>2</sub> O CF	0.12	0.01	--	29.4	--
ETIL CF	0.115	0.038	8:53	67.02	✓
2MB2 CF	0.117	0.035	7:17	91.07	✓



**Figura 32.** Patrón temporal de expresión del gen *Bmal1* en la capa mitral del BO de conejos de 7 días de edad (P7), amamantados por una hembra lactante grupo NAT o estimulados olfativamente con agua destilada grupo H<sub>2</sub>O, o etilisobutirato grupo ETIL, o 2-metilbut-2-enal grupo 2MB2 en un horario fijo, cada 24 horas. Para los grupos del bloque izquierdo la manipulación experimental se realizó de P2-P7 a las 9:00 horas del tiempo local, para los grupos del bloque derecho la manipulación experimental se realizó en P2 y P3, a las 9:00 horas y de P4-P7 a las 15:00 horas. Los círculos negros representan densidad óptica relativa media (DOR) ± error estándar, la línea continua representa el ajuste a una función cosenosoidal de 24 horas, cuando el porcentaje de ritmicidad fue superior al 50% y  $p < 0.05$ , la línea discontinua indica cuando las condiciones anteriores no se cumplieron.



### ***Bulbo olfativo capa granular***

En los grupos que en los que la manipulación experimental se llevó a cabo a las 9:00 horas, el ANOVA de dos vías reveló cambios a lo largo del día en la expresión del gen *Bmal1* en la capa granular del BO (Grupo:  $F_{(3,72)} = 0.54$ ,  $p = \text{NS}$ ; Hora:  $F_{(5,72)} = 2.68$ ,  $p = 0.02$ ; Interacción:  $F_{(15,72)} = 1.57$ ,  $p = \text{NS}$ ). El análisis COSINOR reveló que los cuatro grupos bajo estudio exhiben una fluctuación con un periodo de 24 horas (Tabla 9), en donde los niveles máximos de *Bmal1* en la capa granular del BO, se presentaron al final del ciclo para los grupos NAT MF, ETIL MF y 2MB2 MF, y al inicio del ciclo para el grupo H<sub>2</sub>O MF. Posteriormente, los niveles de *Bmal1* descendieron y alcanzaron su mínimo alrededor de las 16:00, 22:00, 15:30 y las 12:30 horas para NAT MF, H<sub>2</sub>O MF, ETIL MF y 2MB2 MF, respectivamente. Por lo que se observó una disminución en la expresión de *Bmal1* del 69%, 51%, 59% y del 65%, respectivamente (Figura 33, bloque izquierdo).

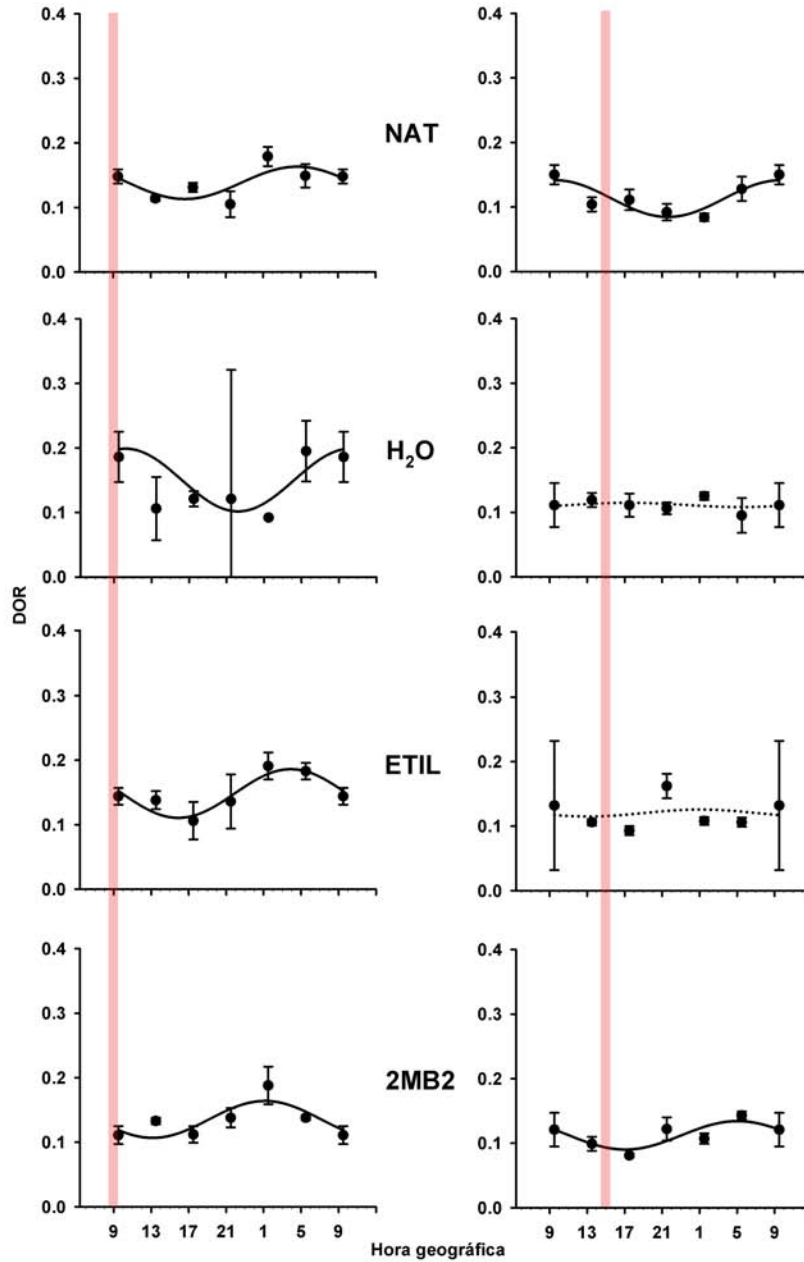
En relación a los grupos de crías donde el horario de la manipulación experimental se retrasó 6 horas, el ANOVA encontró diferencias significativas asociadas a la interacción entre la hora del día y el grupo (Grupo:  $F_{(3,76)} = 0.26$ ,  $p = \text{NS}$ ; Hora:  $F_{(5,76)} = 2.04$ ,  $p = \text{NS}$ ; Interacción:  $F_{(15,76)} = 1.95$ ,  $p = 0.03$ ). El análisis COSINOR detectó la presencia de un ritmo de 24 horas en la expresión de *Bmal1* en la capa mitral del BO para los grupos, NAT CF y 2MB2 CF (Tabla 9), el nivel máximo de *Bmal1* se observó al inicio del ciclo para NAT CF y al final del ciclo para 2MB2 CF, mientras que el mínimo se observó a las 21:00 y a las 16:30 horas, respectivamente. Por lo que la expresión de *Bmal1* mostro una disminución del 60% y 67%, respectivamente (Figura 33, bloque derecho).

En cuanto al efecto del cambio de fase sobre el patrón de expresión del gen *Bmal1* en la capa granular del BO, se observó un adelanto de 4 h 59 min para NAT CF y 3 h 53 min para 2MB2 CF, en comparación con los grupos que mantuvieron la misma fase en la manipulación experimental (Figura 33).

**Tabla 9.** Resultados del análisis COSINOR en el perfil de expresión del gen *Bmal1* en la capa granular del BO de conejos de 7 días de edad, se muestran los valores del mesor, amplitud, acrofase (horas: minutos, del tiempo local) porcentaje de ritmicidad y el valor de  $p$ , para un ritmo de 24 horas.

***Bmal1* BO Granular**

GRUPO	MESOR	AMPLITUD	ACROFASE	% DE RITMICIDAD	$p < 0.05$
NAT MF	0.138	0.025	4:08	52.18	✓
H <sub>2</sub> O MF	0.15	0.049	9:44	78.32	✓
ETIL MF	0.148	0.038	3:24	83.87	✓
2MB2 MF	0.135	0.029	0:40	60.24	✓
NAT CF	0.113	0.028	9:07	74.45	✓
H <sub>2</sub> O CF	0.111	0.003	--	6.494	--
ETIL CF	0.12	0.005	--	2.932	--
2MB2 CF	0.112	0.022	4:33	64.35	✓



**Figura 33.** Patrón temporal de expresión del gen *Bmal1* en la capa granular del BO de conejos de 7 días de edad (P7), amamantados por una hembra lactante grupo NAT o estimulados olfativamente con agua destilada grupo H<sub>2</sub>O, o etilisobutirato grupo ETIL, o 2-metilbut-2-enal grupo 2MB2 en un horario fijo, cada 24 horas. Para los grupos del bloque izquierdo la manipulación experimental se realizó de P2-P7 a las 9:00 horas del tiempo local, para los grupos del bloque derecho la manipulación experimental se realizó en P2 y P3, a las 9:00 horas y de P4-P7 a las 15:00 horas. Los círculos negros representan densidad óptica relativa media (DOR) ± error estándar, la línea continua representa el ajuste a una función cosenosoidal de 24 horas, cuando el porcentaje de ritmicidad fue superior al 50% y  $p < 0.05$ , la línea discontinua indica cuando las condiciones anteriores no se cumplieron.

## DISCUSIÓN GENERAL

---

En la literatura se han reportado evidencias en relación a la influencia que las señales olfativas maternas ejercen sobre los ritmos circadianos en etapas tempranas del desarrollo (Chávez Martín del Campo, 2009; Montúfar-Chaveznava *et al.*, 2013), sin embargo, este es el primer trabajo que detalla ampliamente la influencia de un compuesto volátil, como la feromona 2MB2 sobre la actividad de la maquinaria molecular del reloj circadiano, en la expresión de los ritmos de temperatura y actividad locomotora, así como también la respuesta del sistema circadiano de animales de 7 días de edad ante un cambio de fase en la presentación de la feromona.

Similar a lo previamente descrito en esta especie (Jilge, 1995; Jilge *et al.*, 2000; Caba *et al.*, 2008; Trejo-Muñoz *et al.*, 2012; Montúfar-Chaveznava *et al.*, 2013), los conejos de 7 días de edad, alimentados por una hembra lactante, en un horario fijo cada 24 horas, exhiben claros ritmos de temperatura caracterizados por un marcado incremento de la temperatura corporal horas previas al momento del amamantamiento, lo que se le conoce como componente anticipatorio. Posteriormente la temperatura alcanza el valor máximo del día durante el amamantamiento, esto es seguido de un marcado descenso de la misma durante el posprandio, finalmente durante las horas restantes del ciclo esta variable regresa a sus niveles basales cercanos a la media diaria. En el caso de los animales que fueron estimulados olfativamente, solamente aquellos estimulados con 2MB2 presentan un patrón de temperatura corporal similar al del grupo Natural, en donde el incremento anticipatorio es evidente horas antes de que la estimulación olfativa ocurra, en contraste los grupos estimulados con agua destilada y etilisobutirato exhibieron un patrón atípico y con alta variación entre individuos, en el que la temperatura decae incluso horas antes de que estimulación olfativa y alimentación ocurra. Estudios anteriores encontraron respuestas similares (Chávez Martín del Campo, 2009; Montúfar-Chaveznava *et al.*, 2013) ya que tanto el estímulo olfativo diario de la leche materna del conejo, como el de la feromona fueron suficientes para replicar el patrón del grupo

amantado con una hembra lactante. Por lo que concierne al efecto del cambio de fase en los patrones temporales de temperatura, se observó que el grupo de crías que fue amamantado por una hembra ajustó paulatinamente su fase a la ocurrencia del nuevo horario de amamantamiento, estos resultados confirman las observaciones de estudios previos (Jilge *et al.*, 2001; Caldelas *et al.*, 2009) y corroboran que el amamantamiento actúa como una señal sincronizadora. Entre los grupos de crías donde se cambió la fase de la presentación del estímulo olfativo, en aquellos estimulados con 2MB2 el patrón de temperatura corporal se ajustó al nuevo horario de estimulación olfativa, en contraste las crías de los grupos controles H<sub>2</sub>O y ETIL nuevamente exhibieron un patrón atípico en el que la temperatura comenzó a disminuir horas antes del nuevo horario de estimulación olfativa. Esto nos indica que la presentación diaria del odorante etilisobutirato o la sola alimentación enteral no son suficientes para mantener la estabilidad y el control de fase en el patrón temporal de la temperatura corporal.

En lo que se refiere al componente anticipatorio del patrón temporal de temperatura corporal, semejante a lo reportado en trabajos previos (Montúfar-Chaveznava *et al.*, 2013), se observó una influencia de la feromona 2MB2 tanto en la intensidad como en la duración de este, ya que en el día P7 fue similar entre los grupos Natural y 2MB2, mientras que, en los grupos control de la estimulación olfativa ambos parámetros fueron menores. Por otro lado, después del cambio de fase en la manipulación experimental, el incremento anticipatorio en los grupos H<sub>2</sub>O y ETIL nuevamente fue de menor intensidad, en comparación con las crías que recibieron señales olfativas maternas.

En cuanto al patrón de actividad locomotora de los animales que fueron estimulados olfativamente, los tres grupos bajo estudio H<sub>2</sub>O, ETIL y 2MB2 mostraron similitud entre sí y con el grupo de crías que fue amamantado. Mientras que en respuesta al cambio de fase en la manipulación experimental encontramos que el patrón temporal de la actividad locomotora ajustó su fase al nuevo horario de manipulación en los cuatro grupos. Existe la posibilidad de que las diferencias entre la temperatura y la actividad se deban a que la actividad locomotora este siendo sincronizada por el patrón diario en el consumo de alimento, se ha reportado que cuando ratas adultas con una lesión completa del NSQ o mantenidas en condiciones de oscuridad constante, son sometidas a un régimen de restricción alimentaria al cabo de un par de semanas muestran actividad anticipatoria al

alimento en el ritmo de actividad locomotora (Stephan, 2011), adicionalmente se ha documentado que en los conejos neonatos la presencia de un NSQ funcional no es necesaria para que se presente la actividad anticipatoria (Hernández-Campos, 2013). Por otra parte, en conejos neonatos alimentados diariamente se observó que algunas variables metabólicas como los niveles de glucosa, ácidos grasos libres y colecistoquina, se sincronizan al patrón de alimentación diario independientemente de la presencia de las señales olfativas (Montúfar-Chaveznava *et al.*, 2013), por lo que es probable el patrón temporal de actividad locomotora este siendo generado por osciladores periféricos para los que el alimento actúa como una señal sincronizadora.

Sin embargo, el presente estudio observamos un efecto del cambio de fase en la estimulación olfativa sobre las características del componente anticipatorio, dado que, tanto la duración como la intensidad de este es menor en aquellas crías que no recibieron estimulación olfativa. En un estudio previo donde se lesionó el NSQ de conejos neonatos se encontró que la ausencia del NSQ repercute sobre la intensidad y la duración del componente anticipatorio de la actividad locomotora (Hernández-Campos, 2013), adicionalmente otro estudio independiente realizado en ratas adultas se propone que el NSQ participa de forma activa en la sincronización por alimento, ya que se encontró que el NSQ modula la respuesta de estructuras cortico-límbicas e hipotalámicas, lo que resulta en un incremento en la actividad anticipatoria al alimento (Angeles-Castellanos *et al.*, 2010). Por lo que, a pesar de no ser necesario para la presentación de la anticipación no podemos descartar el papel modulador que ejerce el NSQ sobre el componente anticipatorio en conejos neonatos.

En condiciones de ayuno por hasta 72 horas y por tanto en ausencia de la señal sincronizadora, el componente anticipatorio es el único elemento del patrón temporal de la temperatura y la actividad locomotora de conejos neonatos que persiste, por lo que se considera que su origen es endógeno y está controlado por el sistema circadiano de las crías (Jilge & Hudson, 2001; Trejo-Muñoz *et al.*, 2012), por lo que se puede inferir de las observaciones anteriores, que las señales maternas olfativas la feromona 2MB2 influyen en la expresión de los ritmos circadianos de los conejos neonatos a través de la modulación del componente anticipatorio de las crías.

Reportes anteriores indican que la temperatura corporal de las crías de conejos tiende a aumentar conforme avanza la edad de los animales (Jilge *et al.*, 2000; Trejo-Muñoz *et al.*, 2012), este fenómeno ha sido observado en otras especies de mamíferos altriciales como roedores y primates (Spiers & Adair, 1986; Mirmiran *et al.*, 2001). De acuerdo con estos trabajos, la estabilidad e incremento de la temperatura corporal que ocurre con el tiempo en mamíferos altriciales, está relacionado con el desarrollo de mayor aislamiento térmico, la disminución de la superficie corporal en relación al volumen y con el mejoramiento de la capacidad metabólica del individuo (Hull, 1965; Bautista *et al.*, 2003). En este sentido observamos que las señales olfativas provenientes de la madre también parecen influir en los cambios ligados al desarrollo que ocurren en la temperatura corporal, ya que mientras que las crías de los grupos Natural y 2MB2 mostraron un incremento en la temperatura corporal diaria, las crías de los grupos que no recibieron estimulación olfativa relacionada con señales maternas no presentaron esta tendencia, inclusive llegando a tener una temperatura promedio menor, estas observaciones guardan estrechas similitudes con estudios previos realizados en esta misma especie (Chávez Martín del Campo, 2009; Montúfar-Chaveznava *et al.*, 2013; Navarrete *et al.*, 2016; Ortega-Bernal, 2016) en los que las crías que no recibieron estimulación olfativa de señales maternas, ya sea porque fueron estimulados con agua destilada o porque el BO fue eliminado por una lesión, presentaron temperatura corporal más baja en comparación con los que fueron estimulados con la feromona 2MB2 o leche materna. Por lo que es posible que las diferencias observadas en la temperatura corporal estén asociadas a la exposición de señales olfativas maternas. En la literatura existen evidencias que indican que la estimulación con odorantes como el aceite esencial de toronja (*Citrus paradisi*) puede llegar a influir en el funcionamiento del sistema nervioso autónomo, a través del incremento de la actividad de la rama simpática que inerva al tejido adiposo pardo, las glándulas adrenales, los riñones y a su vez disminuye la actividad del nervio vago, lo anterior deriva en un incremento temporal en la lipólisis, la termogénesis y elevación de la presión arterial. Mientras que la estimulación con aceite esencial de lavanda (*Lavendula angustifolia*) tiene el efecto contrario en las variables mencionadas (Tanida *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2007; Nagai *et al.*, 2014).

Adicionalmente, estudios realizados por Gilbert y colaboradores (2007) demostraron que cuando una cría se aloja en solitario la estabilidad térmica dentro del nido se pierde. Es de notar que en estrecha similitud a lo observado en el presente trabajo en los grupos controles de la estimulación olfatoria, cuando se aloja a crías en solitario, estas no presentan el incremento anticipatorio previo al amamantamiento en la temperatura corporal e incluso muestran un ligero descenso de la temperatura, sin embargo, la actividad no muestra ningún cambio en comparación con grupos donde se alojaron 2, 4, 6 u 8 crías de conejo. Los autores de este trabajo proponen que la presencia de los hermanos de camada es importante para la estabilidad térmica dentro del nido durante los primeros 5 días de vida, en los que las crías son consideradas térmicamente ineficientes, ya que el agrupamiento de los animales en el nido contribuiría a la generación del incremento anticipatorio en la temperatura corporal, a través de la reducción de los costos termo-regulatorios y gasto de energía, pues la energía que se conserva puede ser utilizada para crecimiento y generación de biomasa (Gilbert *et al.*, 2007).

En el presente estudio se procuró que dentro de la caja donde se alojaban los conejos siempre hubiera al menos 4 individuos del mismo grupo, por lo que el efecto que observamos sobre los patrones temporales de temperatura corporal y sobre el componente anticipatorio de las crías estimuladas con agua destilada o etilisobutirato no se explica por la falta de individuos en el nido.

En la literatura existen evidencias en roedores, que sugieren que las señales olfativas también pueden influir en la actividad del sistema circadiano, por ejemplo se ha observado que la que estimulación olfatoria aplicada a ciertas horas del día, incrementa la magnitud de los cambios de fase producidos por pulsos de luz, en la actividad locomotora y la expresión de la proteína c-Fos en el NSQ, y además alarga el periodo del ritmo de actividad locomotora de ratones (Amir *et al.*, 1999). Por otra parte, en hembras del roedor *Octon degus* la exposición a señales olfativas de con-específicos acelera la tasa de re-sincronización ante un cambio de fase en el ciclo luz oscuridad y en condiciones de oscuridad constante es capaz de sincronizar el ritmo de actividad locomotora del 75% de los animales bajo estudio (Governale & Lee, 2001). En el caso las especies de roedores del genero *Acomys*, *A. russatus* y *A. cahirinus* que coexisten en



el mismo hábitat, se ha encontrado que la presencia de señales químicas proveniente de *A. cahirinus* es capaz de ocasionar un cambio en la fase en los patrones de actividad-reposo de *A. russatus*, se cree que está es una estrategia es para evitar la competencia por recursos que representa la convivencia con la otra especie (Haim & Rozenfeld, 1993). Puesto que, como anteriormente se mencionó, las señales olfativas pueden influir en el sistema nervioso autónomo específicamente en la generación de la termogénesis, en el presente estudio, proponemos que la ausencia de señales olfativas relacionadas con la comunicación madre cría, estarían provocando la alteración de la capacidad termo-regulatoria que se observó en los conejos de los grupos Etil y H<sub>2</sub>O. A la vez estas observaciones refuerzan la teoría que las señales olfativas maternas estarían actuando como señales relevantes para el sistema circadiano, como estímulos que promueven la estabilidad térmica dentro del nido, a través del control circadiano autonómico de la termogénesis, contribuyendo así a la expresión del componente anticipatorio tanto en la temperatura corporal como en la actividad locomotora.

En cuanto a la expresión de los genes reloj en el hipotálamo de conejos neonatos de 7 días de edad observamos que las neuronas del NSQ expresan ritmos con un periodo de 24 horas en los genes *Per1* y *Bmal1* similar a lo observado en neonatos de otras especies altriciales (Ohta *et al.*, 2002; Sumová *et al.*, 2006) y en neonatos de la misma especie, tanto en la expresión de genes como de proteínas del reloj molecular (Caldelas *et al.*, 2007; Caba & González-Mariscal, 2009; Trejo-Muñoz *et al.*, 2014).

En los grupos de animales en los que la manipulación experimental se realizó en el mismo horario, el patrón de expresión de *Per1* en el NSQ fue similar, en promedio la acrofase ocurrió 7.5 horas después del amamantamiento o estimulación olfativa. A su vez las fases de expresión de *Per1* en el NSQ fueron comparables a las reportadas previamente para el conejo europeo (Caldelas *et al.*, 2007, 2009). Como consecuencia del cambio de fase de la manipulación experimental observamos diferencias importantes entre grupos en la expresión de *Per1*, mientras que los grupos NAT y 2MB2 mantuvieron el componente rítmico de 24 horas, ambos grupos mostraron un retraso en la acrofase del ritmo de distintas magnitudes, siendo mayor en el grupo 2MB2. En contraste en aquellos animales

estimulados olfativamente con etilisobutirato o con agua destilada, observamos la pérdida de la ritmicidad en el patrón de expresión de *Per1*.

En cuanto al patrón expresión de *Bmal1* en el NSQ, encontramos que cuando los grupos de animales fueron manipulados durante el mismo horario solo aquellos que recibieron estímulos olfativos presentaron un patrón rítmico de 24 horas, la acrofase de la expresión de *Bmal1* ocurrió momentos cercanos al horario de la manipulación experimental, y se presenta en antifase a *Per1* un patrón similar a lo previamente reportado (Caldelas *et al.*, 2007, 2009). En los grupos expuestos a un cambio de fase en la manipulación experimental observamos consistentemente que los grupos NAT y 2MB2 presentan un patrón rítmico de 24 horas aunado a un retraso en la acrofase del ritmo de mayor magnitud en el grupo 2MB2. De igual manera los grupos que no recibieron estimulación olfativa relacionada con la madre no mostraron ritmicidad en la expresión *Bmal1* en el NSQ.

Es de recalcar que de forma consistente observamos una disminución en la amplitud de la expresión de ambos genes reloj en el grupo estimulado con agua destilada con respecto de aquellos expuestos a señales olfativas.

Las observaciones anteriores señalan claros efectos de la falta de estímulos olfativos sobre la expresión de los genes reloj en el NSQ de conejos neonatos, por lo tanto, podemos afirmar que en este modelo experimental la sola alimentación enteral diaria resulta insuficiente para ajustar la fase del ritmo de expresión de los genes reloj en el NSQ.

Sin embargo, es evidente que el control de fase que ejerce la feromona 2MB2 en comparación con el amamantamiento difiere, pues consistentemente tanto la magnitud del cambio de fase en la expresión de los genes reloj es mayor mientras que la homogeneidad de la fase entre organismos es menor. Estas diferencias podrían indicar que el control de la fase del reloj molecular no depende únicamente de los estímulos olfativos, ya que como se mencionó anteriormente, durante el amamantamiento los neonatos se exponen simultáneamente a un cúmulo de señales sensoriales que podrían enviar información rítmica a otros osciladores en el organismo y de esta manera acoplar adecuadamente las fases de los osciladores logrando la óptima sincronización del

organismo. En este sentido se ha demostrado que otras señales no-fólicas como la ingesta diaria de una dieta hipocalórica bajo oscuridad constante, el consumo de una dieta hipoproteica y la infusión diaria de melatonina son capaces de sincronizar los ritmos de expresión de diversos genes en el NSQ (Revisado en Challet *et al.*, 2003; Revisado en Caldelas *et al.*, 2005).

Trabajos anteriores han señalado la existencia de una vía poli-sináptica a través de la cual información olfativa se trasmite hacia el hipotálamo, en ella destacan tres estructuras involucradas con el procesamiento olfativo: la tectia tecta, el núcleo dorsal endopiriforme y el núcleo cortical anterior de la amígdala (KROUT *et al.*, 2002), debido a que dichas estructuras poseen conexiones al NSQ en ratas adultas y primates, se ha sugerido que sería a través de esta vía como ocurriría la modulación del sistema circadiano por señales olfativas.

Sobre la relación entre las señales olfativas y el sistema circadiano, evidencias adicionales indican que el NSQ y los genes reloj participan en la generación de los cambios de la neurotransmisión autonómica y los fenómenos fisiológicos producidos por la estimulación olfativa con esencias de toronja y lavanda, ya que los efectos de la estimulación olfativa con estas esencias son regulados de forma circadiana y en ausencia de un NSQ funcional o un reloj molecular deficiente como en organismos con una doble mutación en los genes *Cry1* y *Cry2*, estos efectos se pierden (Tanida *et al.*, 2008; Nagai *et al.*, 2014).

Semejante a lo observado en el NSQ, encontramos que los genes reloj *Per1* y *Bmal1* se expresan en las capas glomerular, mitral y granular del BO con un periodo de 24 horas, las expresiones de dichos genes en relación a la fase de la manipulación experimental diaria es similar a lo previamente reportado para esta especie (Montúfar-Chaveznava *et al.*, 2012), el pico de expresión del gen *Per1* en promedio ocurrió 8 horas después de la manipulación experimental en las capas glomerular y mitral del BO, mientras que en la capa granular la máxima expresión ocurrió más tarde, en promedio 14.5 horas después. Entre los grupos donde se mantuvo la misma fase de manipulación experimental las fases de expresión de *Per1* se mantuvieron cercanas tanto en la capa glomerular como en la capa mitral.

El efecto del cambio de fase en la manipulación experimental fue similar a lo observado previamente en el NSQ, ya que en los animales que fueron amantados por una hembra lactante y aquellos estimulados con la feromona materna observamos un atraso en la fase de expresión de *Per1* de en promedio 4.5 horas, mientras que en aquellos animales que no recibieron los estímulos olfativos relacionados con la madre fueron incapaces de ajustar la fase del ritmo de *Per1* a la ocurrencia de la señal olfativa, este fenómeno se observó tanto en la capa glomerular como en la capa mitral. Sin embargo, en la capa granular del BO observamos un efecto particular, ya que tanto el grupo NAT como el grupo 2MB2 después del cambio de fase no presentan ritmicidad en la expresión de *Per1*, mientras que los grupos que no recibieron señales olfativas maternas presentaron un avance de fase en la expresión de *Per1* de 7.6 horas.

En este sentido a nivel de las proteínas del reloj en el protocolo anterior de este trabajo, encontramos que la feromona 2MB2 produce una respuesta diferencial en las capas del BO la cual está regulada temporalmente. Para la proteína PER1 únicamente encontramos cambios en la capa glomerular y la capa mitral cuando la feromona materna se presentó en ZT0 en contraste, la capa granular no presentó ningún cambio en respuesta a la estimulación con 2MB2, tomando en consideración estos resultados se podría inferir que no todas las capas del BO tienen la misma contribución en el control de la regulación temporal del BO (Trejo-Muñoz *et al.*, 2014).

Un fenómeno similar ocurre también en la respuesta del NSQ de ratas ante un pulso de luz, ya que el gen *Per1* solo es inducido en la región marginal durante la noche subjetiva, mientras que en la región interna este gen se induce durante la noche subjetiva tardía, en contraste *Per2* se induce en ambas zonas durante la noche subjetiva, por lo que en el marcapasos circadiano no todos los genes del reloj molecular tienen la misma susceptibilidad de ser alterados por señales sincronizadoras (Yan & Silver, 2002).

En las tres capas del BO la expresión de *Bmal1* se encuentra en anti fase en relación a *Per1*, la máxima abundancia del gen se detectó en promedio 17 horas después de la manipulación experimental. En cuanto al efecto del cambio de fase de la manipulación experimental sobre la expresión de *Bmal1* en las tres capas se observó una respuesta muy similar las previamente descritas donde encontramos retrasos en la acrofase de

expresión de *Bmal1* de los grupos NAT y 2MB2 mientras que el patrón de expresión de *Bmal1* en los grupos H<sub>2</sub>O y ETIL fue incapaz de ajustar su fase a la presentación de la señal olfativa. Es de destacar que observamos de forma generalizada la pérdida del componente rítmico en la expresión de los genes reloj del BO en el grupo H<sub>2</sub>O después del cambio de fase en la estimulación olfativa.

La pérdida de la ritmicidad en la expresión de los genes reloj después del cambio de fase podría indicar dada la falta de señales olfativas que la respuesta del sistema es mucho más lenta tardando más tiempo en reorganizarse, lo que provocaría una desincronización entre las diferentes fases de los individuos. Sería interesante en un futuro extender la duración del presente estudio un par del ciclo más para asegurarse que el sistema tuvo el tiempo necesario para responder y resincronizarse, así como en la medida de lo posible probar la respuesta del sistema en ausencia de la señal.

## CONCLUSIONES

---

- ⊕ La estimulación olfativa con feromona 2MB2 es capaz de modular temporalmente la expresión de las proteínas reloj PER1, CRY1 y BMAL1, así como a la proteína de expresión temprana C-FOS en el NSQ y BO de conejos neonatos.
- ⊕ La exposición diaria a la feromona 2MB2 sincroniza los ritmos de temperatura y actividad locomotora de los conejos neonatos.
- ⊕ La exposición diaria a la feromona 2MB2 modula los ritmos de expresión de los genes reloj *Per1* y *Bmal1* en el NSQ y BO de los conejos neonatos.
- ⊕ Dadas las evidencias expuestas en este trabajo, concluimos que la feromona 2MB2 actúa como una señal sincronizadora para el sistema circadiano de las crías de conejo durante la primera semana de vida.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Abe M, Herzog ED, Yamazaki S et al. (2002) Circadian Rhythms in Isolated Brain Regions. *Brain*, **22**, 350–356.
- Abraham U, Saleh M, Kramer A (2013) Odor Is a Time Cue for Circadian Behavior. *Journal of Biological Rhythms*, **28**, 26–37.
- Abrahamson EE, Moore RY (2001) Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Research*, **916**, 172–191.
- Abrahamson EE, Moore RY (2006) Lesions of suprachiasmatic nucleus efferents selectively affect rest-activity rhythm. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **252**, 46–56.
- Aguilar-Roblero R (1993) Teorías básicas de los ritmos biológicos. *Psiquis*, **6**, 121–132.
- Aguilar-Roblero R, Guadarrama P, Mercado C, Chávez JL (2004) El núcleo supraquiasmático y la glándula pineal en la regulación de los ritmos circadianos en roedores. In: *Temas Selectos de Neurociencia III* (ed Velázquez Moctezuma J), pp. 321–330. UAM, México D.F.
- Amir S, Cain S, Sullivan J, Robinson B, Stewart J (1999) In rats, odor-induced Fos in the olfactory pathways depends on the phase of the circadian clock. *Neuroscience Letters*, **272**, 175–178.
- Angeles-Castellanos M, Salgado-Delgado R, Rodriguez K, Buijs RM, Escobar C (2010) The suprachiasmatic nucleus participates in food entrainment: a lesion study. *Neuroscience*, **165**, 1115–1126.
- Antle MC, LeSauter J, Silver R (2005) Neurogenesis and ontogeny of specific cell phenotypes within the hamster suprachiasmatic nucleus. *Brain research. Developmental brain research*, **157**, 8–18.
- Aschoff J (1981) *Handbook of behavioral neurobiology. Volume 4. Biological rhythms*. Plenum Press, New York, 563 pp.
- Aton SJ, Herzog ED (2005) Come together, right ... now : Synchronization of rhythms in a mammalian circadian clock. *Neuron*, **48**, 531–534.
- Balsalobre A, Damiola F, Schibler U (1998) A Serum Shock Induces Circadian Gene Expression in Mammalian Tissue Culture Cells. *Cell*, **93**, 929–937.
- Bautista A, Drummond H, Martínez-Gómez M, Hudson R (2003) Thermal benefit of sibling presence in the newborn rabbit. *Developmental psychobiology*, **43**, 208–215.

- Bedont JL, Blackshaw S (2015) Constructing the suprachiasmatic nucleus: a watchmaker's perspective on the central clockworks. *Frontiers in systems neuroscience*, **9**, 74.
- Bedont JL, Newman EA, Blackshaw S (2015) Patterning, specification, and differentiation in the developing hypothalamus. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, **4**, 445–468.
- Bell-Pedersen D, Cassone VM, Earnest DJ, Golden SS, Hardin PE, Thomas TL, Zoran MJ (2005) Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nature Reviews Drug Discovery*, 1–13.
- Berson DM (2003) Strange vision : ganglion cells as circadian photoreceptors. *Trends in Neurosciences*, **26**, 314–320.
- Bloch G, Herzog ED, Levine JD, Schwartz WJ (2013) Socially synchronized circadian oscillators. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **280**, 20130035–20130035.
- Buhr ED, Yoo S-H, Takahashi JS (2010) Temperature as a Universal Resetting Cue for Mammalian Circadian Oscillators. *Science*, **330**, 379–385.
- Buijs RM, Kalsbeek a (2001) Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nature reviews. Neuroscience*, **2**, 521–6.
- Buijs FN, León-Mercado L, Guzmán-Ruiz M, Guerrero-Vargas NN, Romo-Nava F, Buijs RM (2016) The Circadian System: A Regulatory Feedback Network of Periphery and Brain. *Physiology (Bethesda, Md.)*, **31**, 170–81.
- Burt J, Alberto CO, Parsons MP, Hirasawa M (2011) Local network regulation of orexin neurons in the lateral hypothalamus. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **301**, R572 LP-R580.
- Caba M, González-Mariscal G (2009) The rabbit pup, a natural model of nursing-anticipatory activity. *The European journal of neuroscience*, **30**, 1697–706.
- Caba M, Tovar A, Silver R, Mogado E, Meza E, Zavaleta Y, Juárez C (2008) Nature's food anticipatory experiment: entrainment of locomotor behavior, suprachiasmatic and dorsomedial hypothalamic nuclei by suckling in rabbit pups. *The European journal of neuroscience*, **27**, 432–43.
- Caldelas I, Salazar-Juárez A, Granados-Fuentes D, Escobar C, Aguilar-Roblero R (1998) Circadian modulation of c-Fos expression occurs only in the SCN and not in other visual projection areas in the rat. *Biological Rhythm Research*, **29**, 494–500.
- Caldelas I, Chimal-Monroy J, Martínez-Gómez M, Hudson R (2005) Non-photoc circadian entrainment in mammals: A brief review and proposal for study during development. *Biological Rhythm Research*, **36**, 23–37.
- Caldelas I, Tejadilla D, González B, Montúfar R, Hudson R (2007) Diurnal pattern of clock gene expression



- in the hypothalamus of the newborn rabbit. *Neuroscience*, **144**, 395–401.
- Caldelas I, González B, Montúfar-Chaveznava R, Hudson R (2009) Endogenous clock gene expression in the suprachiasmatic nuclei of previsual newborn rabbits is entrained by nursing. *Developmental neurobiology*, **69**, 47–59.
- Carlezon WA, Duman RS, Nestler EJ (2005) The many faces of CREB. *Trends in Neurosciences*, **28**, 436–445.
- Challet E, Caldelas I, Graff C, Pévet P (2003) Synchronization of the molecular clockwork by light- and food-related cues in mammals. *Biological Chemistry*, **384**, 711–719.
- Charra R, Datiche F, Casthano A, Gigot V, Schaal B, Coureaud G (2012) Brain processing of the mammary pheromone in newborn rabbits. *Behavioural Brain Research*, **226**, 179–188.
- Charra R, Datiche F, Gigot V, Schaal B, Coureaud G (2013) Pheromone-induced odor learning modifies Fos expression in the newborn rabbit brain. *Behavioural brain research*, **237**, 129–40.
- Chávez Martin del Campo E (2009) *La participación de la feromona materna, 2MB2, en la sincronización no fótica del sistema circadiano de conejos neonatos, Oryctolagus cuniculus*. Universidad Nacional Autónoma de México, 1-80 pp.
- Chou TC, Scammell TE, Gooley JJ, Gaus SE, Saper CB, Lu J (2003) Critical Role of Dorsomedial Hypothalamic Nucleus in a Wide Range of Behavioral Circadian Rhythms. *The Journal of Neuroscience*, **23**, 10691 LP-10702.
- Colwell CS (2011) Linking neural activity and molecular oscillations in the SCN. *Nature reviews. Neuroscience*, **12**, 553–69.
- Coureaud G, Schaal B (2000) Attraction of newborn rabbits to abdominal odors of adult conspecifics differing in sex and physiological state. *Developmental Psychobiology*, **36**, 271–281.
- Coureaud G, Schaal B, Langlois D, Perrier G (2001) Orientation response of newborn rabbits to odours of lactating females: relative effectiveness of surface and milk cues. *Animal behaviour*, **61**, 153–162.
- Coureaud G, Langlois D, Perrier G, Schaal B (2003) A single key-odorant accounts for the pheromonal effect of rabbit milk: Further test of the mammary pheromone's activity against a wide sample of volatiles from milk. *Chemoecology*, **13**, 187–192.
- Coureaud G, Charra R, Datiche F et al. (2010) A pheromone to behave, a pheromone to learn: the rabbit mammary pheromone. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, **196**, 779–90.
- Daan S, Aschoff J (2001) The Entrainment of Circadian Systems. In: *Circadian Clocks* (eds Takahashi JS, Turek FW, Moore RY), pp. 7–43. Springer US, Boston, MA.
- Davis FC, Gorski RA (1985) Development of Hamster Circadian Rhythms. *Biology of Reproduction*, **33**,

353–362.

- Davis FC, Gorski RA (1988) Development of hamster circadian rhythms: Role of the maternal suprachiasmatic nucleus. *Journal of Comparative Physiology A*, **162**, 601–610.
- Davis FC, Mannion J (1988) Entrainment of hamster pup circadian rhythms by prenatal melatonin injections to the mother. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **255**, R439 LP-R448.
- Davis FC, Boada R, LeDeaux J (1990) Neurogenesis of the hamster suprachiasmatic nucleus. *Brain Research*, **519**, 192–199.
- Decoursey PJ (1960) Phase control of activity in a rodent. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, **25**, 49–55.
- Deurveilher S, Semba K (2005) Indirect projections from the suprachiasmatic nucleus to major arousal-promoting cell groups in rat: implications for the circadian control of behavioural state. *Neuroscience*, **130**, 165–83.
- Dibner C, Schibler U, Albrecht U (2010) The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annual review of physiology*, **72**, 517–49.
- Drucker-Colín R, Aguilar-Roblero R, García-Hernández F, Fernández-Cancino F, Rattoni FB (1984) Fetal suprachiasmatic nucleus transplants: diurnal rhythm recovery of lesioned rats. *Brain Research*, **311**, 353–357.
- Dunlap JC, Loros JJ, Decoursey PJ (2003) *Chronobiology: Biological Timekeeping*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, 393 pp.
- Escobar C, Hudson R, Martínez-Gómez M, Aguilar-Roblero R (2000) Metabolic correlates of the circadian pattern of suckling-associated arousal in young rabbits. *Journal of comparative physiology. A, Sensory, neural, and behavioral physiology*, **186**, 33–8.
- Evans JA, Pan H, Liu AC, Welsh DK (2012) *Cry1<sup>-/-</sup>* Circadian Rhythmicity Depends on SCN Intercellular Coupling. *Journal of Biological Rhythms*, **27**, 443–452.
- Floessner T, Hut RA (2017) Basic Principles Underlying Biological Oscillations and Their Entrainment. In: *Biological Timekeeping: Clocks, Rhythms and Behaviour* (ed Kumar V), pp. 47–60. Springer Nature, New Delhi.
- Gilbert C, Blanc S, Giroud S, Trabalon M, Le Maho Y, Perret M, Ancel A (2007) Role of huddling on the energetic of growth in a newborn altricial mammal. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, **293**, R867-76.
- Goel N, Lee TM, Pieper DR (1998) Removal of the olfactory bulbs delays photic reentrainment of circadian activity rhythms and modifies the reproductive axis in male *Octodon degus*. *Brain Research*, **792**, 229–

236.

- Golombek D a, Rosenstein RE (2010) Physiology of Circadian Entrainment. *Physiology Rev*, **90**, 1063–1102.
- Governale MM, Lee TM (2001) Olfactory cues accelerate reentrainment following phase shifts and entrain free-running rhythms in female *Octodon degus* (Rodentia). *Journal of Biological Rhythms*, **16**, 489–501.
- Granados-Fuentes D, Saxena MT, Prolo LM, Aton SJ, Herzog ED (2004a) Olfactory bulb neurons express functional , entrainable circadian rhythms. *European Journal of Neuroscience*, **19**, 898–906.
- Granados-Fuentes D, Prolo LM, Abraham U, Herzog ED (2004b) The suprachiasmatic nucleus entrains, but does not sustain, circadian rhythmicity in the olfactory bulb. *J. Neurosci*, **24**, 615±619.
- Granados-Fuentes D, Tseng A, Herzog ED (2006) A circadian clock in the olfactory bulb controls olfactory responsivity. *The Journal of neuroscience*, **26**, 12219–25.
- Granados-Fuentes D, Ben-Josef G, Perry G, Wilson DA, Sullivan-Wilson A, Herzog ED (2011) Daily rhythms in olfactory discrimination depend on clock genes but not the suprachiasmatic nucleus. *Journal of biological rhythms*, **26**, 552–560.
- Green DJ, Gillette R (1982) Circadian rhythm of firing rate recorded from single cells in the rat suprachiasmatic brain slice. *Brain Research*, **245**, 198–200.
- Grosse J, Velickovic A, Davis FC et al. (2005) Entrainment of Syrian hamster circadian activity rhythms by neonatal melatonin injections Entrainment of Syrian hamster rhythms by neonatal melatonin circadian injections activity. *American Journal Of Physiology*, 533–540.
- Guilding C, Piggins HD (2007) Challenging the omnipotence of the suprachiasmatic timekeeper : are circadian oscillators present throughout the mammalian brain ? *Neuroscience*, **25**, 3195–3216.
- Haim a, Rozenfeld FM (1993) Temporal segregation in coexisting *Acomys* species: the role of odour. *Physiology & behavior*, **54**, 1159–61.
- Halberg F, Halberg E, Barnum CP, Bittner JJ (1959) Physiologic 24-hour periodicity in human beings and mice, the lighting regimen and daily routine. *Photoperiodism and related phenomena in plants and animals*, **55**, 803–878.
- Hastings MH, Herzog ED (2004) Clock genes, oscillators, and cellular networks in the suprachiasmatic nuclei. *Journal of biological rhythms*, **19**, 400–13.
- Helm B, Stevenson TJ (2014) Circannual Rhythms: History, Present Challenges, Future Directions. In: *Annual, Lunar, and Tidal Clocks: Patterns and Mechanisms of Nature's Enigmatic Rhythms* (eds Numata H, Helm B), pp. 203–225. Springer Japan, Tokyo.
- Hernández-Campos O (2013) *Efecto de las lesiones del núcleo supraquiasmático en la expresión de los*

- ritmos de temperatura corporal y actividad locomotora de conejos en desarrollo*. Universidad Autónoma de México, 140 pp.
- Herzog ED (2007) Neurons and networks in daily rhythms. *Nature reviews. Neuroscience*, **8**, 790–802.
- Hirota T, Fukada Y (2004) Resetting Mechanism of Central and Peripheral Circadian Clocks in Mammals. *Zoological Science*, **368**, 359–368.
- Hudson R, Distel H (1982) The Pattern of Behaviour of Rabbit Pups in the Nest. *Behaviour*, **79**, 255–271.
- Hudson R, Distel H (1983) Nipple location by newborn rabbits: behavioural evidence form pheromonal guidance. *Behaviour*, **82**, 260–275.
- Hudson R, Distel H (1986) Pheromonal release of suckling in rabbits does not depend on the vomeronasal organ. *Physiology & Behavior*, **37**, 123–128.
- Hull D (1965) Oxygen consumption and body temperature of new-born rabbits and kittens exposed to cold. *The Journal of Physiology*, **177**, 192–202.
- Inouye S-IT, Kawamura H (1979) Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic “island” containing the suprachiasmatic nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **76**, 5962–5966.
- Jilge B (1995) Ontogeny of the rabbit’s circadian rhythms without an external zeitgeber. *Physiology and Behavior*, **58**, 131–140.
- Jilge B, Hudson R (2001) Diversity and Development of Circadian Rhythms in the European Rabbit. *Chronobiology International*, **18**, 1–26.
- Jilge B, Kuhnt B, Landerer W, Rest S (2000) Circadian thermoregulation in suckling rabbit pups. *Journal of biological rhythms*, **15**, 329–35.
- Jilge B, Kuhnt B, Landerer W, Rest S (2001) Circadian temperature rhythms in rabbit pups and in their does. *Laboratory animals*, **35**, 364–373.
- Kabrita CS, Davis FC (2008) Development of the mouse suprachiasmatic nucleus: Determination of time of cell origin and spatial arrangements within the nucleus. *Brain Research*, **1195**, 20–27.
- Keil W, von Stralendorff F, Hudson R (1990) A behavioral bioassay for analysis of rabbit nipple-search pheromone. *Physiology & Behavior*, **47**, 525–529.
- Klein DC (2004) The 2004 Aschoff / Pittendrigh Lecture : Theory of the Origin of the Pineal Gland — A Tale of Conflict and Resolution. *Health (San Francisco)*, **19**, 264–279.
- Ko CH, Takahashi JS (2006) Molecular components of the mammalian circadian clock. *Human Molecular Genetics*, **15**, R271-77.
- Konopka RJ, Benzer S (1971) Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National*

*Academy of Sciences of the United States of America*, **68**, 2112–6.

- Korf H-W, von Gall C (2013) Circadian Physiology. In: *Neuroscience in the 21st Century: From Basic to Clinical* (ed Pfaff DW), pp. 1813–1845. Springer New York, New York.
- Kováčiková Z, Sládek M, Bendová Z, Illnerová H, Sumová A (2006) Expression of clock and clock-driven genes in the rat suprachiasmatic nucleus during late fetal and early postnatal development. *Journal of biological rhythms*, **21**, 140–8.
- Kriegsfeld LJ, LeSauter J, Silver R (2004) Targeted microlesions reveal novel organization of the hamster suprachiasmatic nucleus. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, **24**, 2449–57.
- Krout KE, Kawano J, Mettenleiter TC, Loewy AD (2002) CNS inputs to the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Neuroscience*, **110**, 73–92.
- Kuhlman SJ, Mackey SR, Duffy JF (2007) Biological rhythms workshop I: Introduction to chronobiology. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **72**, 1–6.
- Lakin-Thomas PL, Brody S (2004) Circadian rhythms in microorganisms: new complexities. *Annual review of microbiology*, **58**, 489–519.
- Landgraf D, Achten C, Dallmann F, Oster H (2015) Embryonic development and maternal regulation of murine circadian clock function. *Chronobiology International*, **32**, 416–427.
- Li X, Davis FC (2005) Developmental expression of clock genes in the Syrian hamster. *Developmental Brain Research*, **158**, 31–40.
- Liu AC, Welsh DK, Ko CH et al. (2007) Intercellular coupling confers robustness against mutations in the SCN circadian clock network. *Cell*, **129**, 605–16.
- Michel S, Itri J, Han JH, Gniotczynski K, Colwell CS (2006) Regulation of glutamatergic signalling by PACAP in the mammalian suprachiasmatic nucleus. *BMC neuroscience*, **7**, 15.
- Mikkelsen JD, Vrang N (1994) A direct pretectosuprachiasmatic projection in the rat. *Neuroscience*, **62**, 497–505.
- Miller J-EK, Granados-Fuentes D, Wang T, Marpegan L, Holy TE, Herzog ED (2014) Vasoactive intestinal polypeptide mediates circadian rhythms in mammalian olfactory bulb and olfaction. *The Journal of neuroscience*, **34**, 6040–6.
- Mirmiran M, Bernardo L, Jenkins SL, Ma XH, Brenna JT, Nathanielsz PW (2001) Growth, Neurobehavioral and Circadian Rhythm Development in Newborn Baboons. *Pediatric Research*, **49**, 673–677.
- Mohawk JA, Green CB, Takahashi JS (2012) Central and Peripheral Circadian Clocks in Mammals. *Annual Review of Neuroscience*, **35**, 445–462.

- Moncomble A-S, Coureaud G, Quennedey B, Langlois D, Perrier G, Schaal B (2005) The mammary pheromone of the rabbit: from where does it come? *Animal Behaviour*, **69**, 29–38.
- Montúfar-Chaveznavá R, Hernández-Campos O, Hudson R, Caldelas I (2012) Differential maturation of the molecular clockwork in the olfactory bulb and suprachiasmatic nucleus of the rabbit. *Neuroscience*, **207**, 198–207.
- Montúfar-Chaveznavá R, Trejo-Muñoz L, Hernández-Campos O, Navarrete E, Caldelas I (2013) Maternal olfactory cues synchronize the circadian system of artificially raised newborn rabbits. *PloS one*, **8**, e74048.
- Moore-Ede MC, Sulzman FM, Fuller CA (1982) *The clocks that time us: physiology of the circadian timing system*. Harvard University Press, 464 pp.
- Moore RY (2013) *The suprachiasmatic nucleus and the circadian timing system*, 1a edn, Vol. 119. Elsevier Inc., 1-28 pp.
- Moore RY, Bernstein ME (1989) Synaptogenesis in the rat suprachiasmatic nucleus demonstrated by electron microscopy and synapsin I immunoreactivity. *The Journal of Neuroscience*, **9**, 2151 LP-2162.
- Moore RY, Eichler VB (1972) Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Research*, **42**, 201–206.
- Moore RY, Lenn NJ (1972) A retinohypothalamic projection in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, **146**, 1–14.
- Moore RY, Speh JC, Leak RK (2002) Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell and tissue research*, **309**, 89–98.
- Morin LP (2007) SCN organization reconsidered. *Journal of biological rhythms*, **22**, 3–13.
- Morin LP (2013) Neuroanatomy of the extended circadian rhythm system. *Experimental Neurology*, **243**, 4–20.
- Morin LP, Allen CN (2006) The circadian visual system, 2005. *Brain Research Reviews*, **51**, 1–60.
- Munekawa K, Tamada Y, Iijima N et al. (2000) Development of Astroglial Elements in the Suprachiasmatic Nucleus of the Rat: With Special Reference to the Involvement of the Optic Nerve. *Experimental Neurology*, **166**, 44–51.
- Nagai K, Nijima A, Horii Y, Shen J, Tanida M (2014) Olfactory stimulatory with grapefruit and lavender oils change autonomic nerve activity and physiological function. *Autonomic Neuroscience*, **185**, 29–35.
- Nagoshi E, Saini C, Bauer C, Laroche T, Naef F, Schibler U (2004) Circadian Gene Expression in Individual Fibroblasts: Cell-Autonomous and Self-Sustained Oscillators Pass Time to Daughter Cells. *Cell*, **119**, 393–705.

- Navarrete E, Ortega-Bernal JR, Trejo-Muñoz L, Díaz G, Montúfar-Chaveznava R, Caldelas I (2016) Participation of the olfactory bulb in circadian organization during early postnatal life in rabbits. *PLoS ONE*, **11**, 1–20.
- Ohta H, Honma S, Abe H, Honma K (2002) Effects of nursing mothers on rPer1 and rPer2 circadian expressions in the neonatal rat suprachiasmatic nuclei vary with developmental stage. *European Journal of Neuroscience*, **15**, 1953–1960.
- Ohta H, Honma S, Abe H, Honma K (2003) Periodic absence of nursing mothers phase-shifts circadian rhythms of clock genes in the suprachiasmatic nucleus of rat pups. *European Journal of Neuroscience*, **17**, 1628–1634.
- Ohta H, Xu S, Moriya T et al. (2008) Maternal feeding controls fetal biological clock. *PloS one*, **3**, e2601.
- Ortega-Bernal JR (2016) *Efectos de las lesiones del bulbo olfativo sobre la expresión de la ritmicidad circadiana a nivel fisiológico y conductual en conejos en desarrollo*. Universidad Nacional Autónoma de México, 1-96 pp.
- Pacheco-Cobos L, Rosetti M, Distel H, Hudson R (2003) To stay or not to stay: the contribution of tactile and thermal cues to coming to rest in newborn rabbits. *Journal of Comparative Physiology. A*, **189**, 383–389.
- Panda S, Hogenesch JB, Kay S a (2002) Circadian rhythms from flies to human. *Nature*, **417**, 329–35.
- Pittendrigh CS (1960) Circadian Rhythms and the Circadian Organization of Living Systems. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **25**, 159–184.
- Pittendrigh CS (1981a) Circadian Systems: General Perspective. In: *Handbook of behavioral neurobiology. Volume 4. Biological rhythms*, Vol. 4 (ed Aschoff J), pp. 57–80. Plenum Press, New York.
- Pittendrigh CS (1981b) Circadian systems: entrainment. In: *Handbook of behavioral neurobiology. Volume 4. Biological rhythms* (ed Aschoff J), pp. 95–124. Plenum Press., New York.
- Pittendrigh CS (1993) Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. *Annual Review of Physiology*, **55**, 16–54.
- Pittendrigh CS, Caldarola PC (1973) General homeostasis of the frequency of circadian oscillations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **70**, 2697–2701.
- Possidente B, Lumia AR, McGinnis MY, Teicher MH, deLemos E, Sterner L, Deros L (1990) Olfactory bulb control of circadian activity rhythm in mice. *Brain Research*, **513**, 325–328.
- Ralph MR, Foster RG, Davis FC, Menaker M (1990) Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science*, **247**, 975–978.
- Reppert SM, Schwartz WJ (1984) The suprachiasmatic nuclei of the fetal rat: characterization of a functional circadian clock using <sup>14</sup>C-labeled deoxyglucose. *The Journal of Neuroscience*, **4**, 1677 LP-1682.

- Reppert SM, Schwartz WJ (1986a) Maternal suprachiasmatic nuclei are necessary for maternal coordination of the developing circadian system. *The Journal of neuroscience*, **6**, 2724–2729.
- Reppert SM, Schwartz WJ (1986b) Maternal Endocrine Extirpations Do Not Abolish Maternal Coordination of the Fetal Circadian Clock\*. *Endocrinology*, **119**, 1763–1767.
- Reppert SM, Weaver DR (2002) Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*, **418**, 935–941.
- Rivkees SA (2003) Developing Circadian Rhythmicity in Infants. *Pediatrics*, **112**, 373–382.
- Rivkees SA, Fox CA, Jacobson CD, Reppert SM (1988) Anatomic and Functional Development in the Gray Short-Tailed Opossum of the Suprachiasmatic Nuclei. *Development*, **8**.
- Roenneberg T, Daan S, Mrosovsky M (2003) The art of entrainment. *Journal of Biological Rhythms*, **18**, 183–194.
- Rovinsky MJ, Levine S, Gordon MK, Caba M (2005) Circadian rhythm of corticosterone secretion in the neonatal rabbit. *Developmental Brain Research*, **158**, 92–96.
- Salazar-Juárez A, Escobar C, Aguilar-Roblero R (2002) Anterior paraventricular thalamus modulates light-induced phase shifts in circadian rhythmicity in rats. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, **283**, R897–R904.
- Saper CB (2013) The central circadian timing system. *Current Opinion in Neurobiology*, **23**, 747–751.
- Saper CB, Lu J, Chou TC, Gooley J (2005) The hypothalamic integrator for circadian rhythms. *Trends in neurosciences*, **28**, 152–7.
- Schaal B, Coureaud G, Langlois D, Giniès C, Sémon E, Perrier G (2003) Chemical and behavioural characterization of the rabbit mammary pheromone. *Nature*, **424**, 68–72.
- Schaal B, Coureaud G, Doucet S et al. (2009) Mammary olfactory signalisation in females and odor processing in neonates: Ways evolved by rabbits and humans. *Behavioural Brain Research*, **200**, 346–358.
- Schaeren WN, Gerfin MA (1993) A single protocol to detect transcripts of various types and expression levels in neural tissue and cultured cells: in situ hybridization using digoxigenin-labelled cRNA probes. *Histochemistry*, **100**, 431–440.
- Schwartz WJ, Daan S (2017) Origins: A Brief Account of the Ancestry of Circadian Biology. In: *Biological Timekeeping: Clocks, Rhythms and Behaviour* (ed Kumar V), pp. 3–22. Springer India, New Delhi.
- Schwartz WJ, Gainer H (1977) Suprachiasmatic nucleus: use of <sup>14</sup>C-labeled deoxyglucose uptake as a functional marker. *Science*, **197**, 1089 LP-1091.
- Sekaran S, Lupi D, Jones SL et al. (2005) Melanopsin-Dependent Photoreception Provides Earliest Light Detection in the Mammalian Retina. *Current Biology*, **15**, 1099–1107.



- Seron-Ferre M, Valenzuela GJ, Torres-Farfan C (2007) Circadian clocks during embryonic and fetal development. *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews*, **81**, 204–214.
- Serón-Ferré M, Mendez N, Abarzua-Catalan L et al. (2012) Circadian rhythms in the fetus. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **349**, 68–75.
- Shen J, Nijijima A, Tanida M, Horii Y, Nakamura T, Nagai K (2007) Mechanism of changes induced in plasma glycerol by scent stimulation with grapefruit and lavender essential oils. *Neuroscience letters*, **416**, 241–6.
- Shibata S, Moore RY (1987) Development of neuronal activity in the rat suprachiasmatic nucleus. *Developmental Brain Research*, **34**, 311–315.
- Shimogori T, Lee DA, Miranda-Angulo A et al. (2010) A genomic atlas of mouse hypothalamic development. *Nature Neuroscience*, **13**, 767–775.
- Silver R, Lehman MN, Gibson M, Gladstone WR, Bittman EL (1990) Dispersed cell suspensions of fetal SCN restore circadian rhythmicity in SCN-lesioned adult hamsters. *Brain Research*, **525**, 45–58.
- Sládek M, Sumová A, Kováčiková Z, Bendová Z, Laurinová K, Illnerová H (2004) Insight into molecular core clock mechanism of embryonic and early postnatal rat suprachiasmatic nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 6231–6.
- Spiers DE, Adair ER (1986) Ontogeny of homeothermy in the immature rat: metabolic and thermal responses. *Journal of applied physiology*, **60**, 1190–7.
- Stephan FK (2011) Food as a Zeitgeber. *Journal of Biological Rhythms*, **17**, 284–292.
- Stephan FK, Zucker I (1972) Circadian Rhythms in Drinking Behavior and Locomotor Activity of Rats Are Eliminated by Hypothalamic Lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **69**, 1583–1586.
- Sumová A, Bendová Z, Sládek M, El-Hennamy R, Laurinová K, Jindráková Z, Illnerová H (2006) Setting the biological time in central and peripheral clocks during ontogenesis. *FEBS letters*, **580**, 2836–42.
- Sumová A, Bendová Z, Sládek M et al. (2008) Circadian molecular clocks tick along ontogenesis. *Physiological research*, **57**, S139-48.
- Takahashi JS (2016) Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. *Nature Reviews Genetics*, **18**, 164–179.
- Takahashi JS, Hong H-K, Ko CH, McDearmon EL (2008) The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. *Nature Reviews Genetics*, **9**, 764–775.
- Tanida M, Nijijima A, Shen J, Nakamura T, Nagai K (2006) Olfactory stimulation with scent of lavender oil affects autonomic neurotransmission and blood pressure in rats. *Neuroscience letters*, **398**, 155–60.

- Tanida M, Shen J, Nakamura T, Nijima A, Nagai K (2008) Day-night difference in thermoregulatory responses to olfactory stimulation. *Neuroscience Letters*, **439**, 192–197.
- Torres-Farfan C, Rocco V, Monsó C et al. (2006) Maternal melatonin effects on clock gene expression in a nonhuman primate fetus. *Endocrinology*, **147**, 4618–4626.
- Tosini G, Menaker M (1996) Circadian Rhythms in Cultured Mammalian Retina. *Science*, **272**, 419–420.
- Trejo-Muñoz L, Navarrete E, Montúfar-Chaveznava R, Caldelas I (2012) Determining the period, phase and anticipatory component of activity and temperature patterns in newborn rabbits that were maintained under a daily nursing schedule and fasting conditions. *Physiology and Behavior*, **106**, 587–596.
- Trejo-Muñoz L, Navarrete E, Montúfar-Chaveznava R, Caldelas I (2014) Temporal modulation of the canonical clockwork in the suprachiasmatic nucleus and olfactory bulb by the mammary pheromone 2MB2 in pre-visual rabbits. *Neuroscience*, **275**, 170–183.
- Tso CF, Simon T, Greenlaw AC, Puri T, Mieda M, Herzog ED (2017) Astrocytes Regulate Daily Rhythms in the Suprachiasmatic Nucleus and Behavior. *Current Biology*, **27**, 1055–1061.
- Vansteensel MJ, Michel S, Meijer JH (2008) Organization of cell and tissue circadian pacemakers: A comparison among species. *Brain Research Reviews*, **58**, 18–47.
- Viswanathan N, Davis FC (1997) Single prenatal injections of melatonin or the D1-dopamine receptor agonist SKF 38393 to pregnant hamsters sets the offsprings' circadian rhythms to phases 180 degrees apart. *Journal of comparative physiology. A, Sensory, neural, and behavioral physiology*, **180**, 339–46.
- Viswanathan N, Weaver DR, Reppert SM, Davis FC (1994) Entrainment of the Fetal Hamster Circadian Pacemaker by Prenatal Injections of the Dopamine Agonist SKF 38393. *The Journal of neuroscience*, **14**, 5393–98.
- Vrang N, Mrosovsky N, Mikkelsen JD (2003) Afferent projections to the hamster intergeniculate leaflet demonstrated by retrograde and anterograde tracing. *Brain research bulletin*, **59**, 267–88.
- Watts AG, Swanson LW, Sanchez-Watts G (1987) Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: I. Studies using anterograde transport of Phaseolus vulgaris leucoagglutinin in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, **258**, 204–229.
- Weaver DR, Rivkees SA, Reppert SM (1992) D1- dopamine receptors activate c-fos expression in the fetal suprachiasmatic nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 9201–9204.
- Webb AB, Oates AC (2016) Timing by rhythms: Daily clocks and developmental rulers. *Development, Growth & Differentiation*, **58**, 43–58.
- Welsh DK, Logothetis DE, Meister M, Reppert SM (1995) Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron*, **14**, 697–

706.

- Welsh DK, Imaizumi T, Kay SA (2005) Real-time reporting of circadian-regulated gene expression by luciferase imaging in plants and mammalian cells. *Methods in Enzymology*, **393**, 269–288.
- Welsh DK, Takahashi JS, Kay SA (2010) Suprachiasmatic Nucleus: Cell Autonomy and Network Properties. *Annual Review of Physiology*, **72**, 551–577.
- Wreschnig D, Dolatshad H, Davis FC (2014) Embryonic Development of Circadian Oscillations in the Mouse Hypothalamus. *Journal of Biological Rhythms*, **29**, 299–310.
- Wyatt TD (2003) Animals in a chemical world. In: *Pheromones and Animal Behaviour: Communication by Smell and Taste*, Vol. 13 (ed Wyatt TD), pp. 1–22. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Wyatt TD (2010) Pheromones and signature mixtures: defining species-wide signals and variable cues for identity in both invertebrates and vertebrates. *Journal of comparative physiology. A, Neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology*.
- Yamamoto T, Nakahata Y, Soma H, Akashi M, Mamine T, Takumi T (2004) Transcriptional oscillation of canonical clock genes in mouse peripheral tissues. *BMC Molecular Biology*, **5**, 18.
- Yamazaki S, Numano R, Abe M et al. (2000) Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science*, **288**, 682–685.
- Yan L, Silver R (2002) Differential induction and localization of mPer1 and mPer2 during advancing and delaying phase shifts. *European Journal of Neuroscience*, **16**, 1531–1540.
- Yoo S-H, Yamazaki S, Lowrey PL et al. (2004) PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 5339–46.
- Zarrow MX, Denenberg VH, Anderson CO (1965) Rabbit: Frequency of Suckling in the Pup. *Science*, **150**, 1835–36.
- Zheng X, Sehgal A (2012) Speed control: Cogs and gears that drive the circadian clock. *Trends in Neurosciences*, **35**, 574–585.

# ANEXO

---

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Enzimas de restricción y polimeras usadas con respecto al sentido del corte del plásmido y la transcripción del ARN mensajero deseado.....	52
<b>Tabla 2.</b> Resultados del análisis COSINOR en el perfil de expresión del gen <i>Per1</i> en el NSQ de conejos de 7 días de edad, se muestran los valores del mesor, amplitud, acrofase en horas: minutos del tiempo local, porcentaje de ritmicidad y el valor de p, para un ritmo de 24 horas.....	83
<b>Tabla 3.</b> Resultados del análisis COSINOR en el perfil de expresión del gen <i>Per1</i> en la capa glomerular del BO de conejos de 7 días de edad, se muestran los valores del mesor, amplitud, acrofase en horas: minutos del tiempo local, porcentaje de ritmicidad y el valor de p, para un ritmo de 24 horas.....	86
<b>Tabla 4.</b> Resultados del análisis COSINOR en el perfil de expresión del gen <i>Per1</i> en la capa mitral del BO de conejos de 7 días de edad, se muestran los valores del mesor, amplitud, acrofase en horas: minutos del tiempo local, porcentaje de ritmicidad y el valor de p, para un ritmo de 24 horas.....	89
<b>Tabla 5.</b> Resultados del análisis COSINOR en el perfil de expresión del gen <i>Per1</i> en la capa granular del BO de conejos de 7 días de edad, se muestran los valores del mesor, amplitud, acrofase en horas: minutos del tiempo local, porcentaje de ritmicidad y el valor de p, para un ritmo de 24 horas.....	92
<b>Tabla 6.</b> Resultados del análisis COSINOR en el perfil de expresión del gen <i>Bmal1</i> en el NSQ de conejos de 7 días de edad, se muestran los valores del mesor, amplitud, acrofase en horas: minutos del tiempo local, porcentaje de ritmicidad y el valor de p, para un ritmo de 24 horas.....	97
<b>Tabla 7.</b> Resultados del análisis COSINOR en el perfil de expresión del gen <i>Bmal1</i> en la capa glomerular del BO de conejos de 7 días de edad, se muestran los valores del mesor, amplitud, acrofase en horas: minutos del tiempo local, porcentaje de ritmicidad y el valor de p, para un ritmo de 24 horas.....	100
<b>Tabla 8.</b> Resultados del análisis COSINOR en el perfil de expresión del gen <i>Bmal1</i> en la capa mitral del BO de conejos de 7 días de edad, se muestran los valores del mesor, amplitud, acrofase en horas: minutos del tiempo local, porcentaje de ritmicidad y el valor de p, para un ritmo de 24 horas.....	103
<b>Tabla 9.</b> Resultados del análisis COSINOR en el perfil de expresión del gen <i>Bmal1</i> en la capa granular del BO de conejos de 7 días de edad, se muestran los valores del mesor, amplitud, acrofase en horas: minutos del tiempo local, porcentaje de ritmicidad y el valor de p, para un ritmo de 24 horas.....	106

## Índice de figuras

- Figura 1.** Esquema representativo de la organización del sistema circadiano. La información temporal de las señales ambientales es comunicada al marcapasos a través de las vías de entrada, el marcapasos es el encargado de generar la ritmicidad circadiana y sincronizarla a la ocurrencia de las señales ambientales mediante la comunicación de las señales rítmicas a las eferencias, finalmente la ritmicidad se expresa en el organismo a nivel conductual, fisiológico y molecular. A su vez está salida de información rítmica también coordina la actividad del marcapasos (Modificado de Gardner et al., 2006)..... 9
- Figura 2.** Microfotografía de un corte coronal del cerebro de un lagomorfo adulto con una tinción de Nissl mostrando la ubicación del NSQ. La imagen izquierda muestra un acercamiento al hipotálamo, QO: quiasma óptico, IIV: Tercer ventrículo, NSQ: Núcleo supraquiasmático..... 15
- Figura 3.** Mecanismo molecular propuesto para la generación de la ritmicidad circadiana en mamíferos: Asa de retroalimentación transcripcional y traduccional que involucra al activador transcripcional CLOCK-BMAL1 y a sus genes blanco *Per*, *Cry* cuyos productos regulan negativamente la acción del dímero, y a los genes *Rev-Erb $\alpha$*  y *Rora* cuyos productos ejercen una regulación negativa y positiva respectivamente sobre *Bmal1*, regulando así su propia transcripción. (Modificado de Bell-pedersen et al., 2005). ..... 19
- Figura 4.** Resumen de las principales conexiones del NSQ. BST, núcleo del lecho de la estría terminal; DMH, núcleo dorsomedial del hipotálamo; LSN, núcleo septal lateral; POA, área preóptica; PT, núcleo paratenial; PSCN, núcleo perisupraquiasmático; PVH, núcleo paraventricular del hipotálamo; PVT, núcleo paraventricular del tálamo; RE, núcleo reuniens; LSPVZ, área subparaventricular lateral; MSPVZ, área subparaventricular medial; VTA, área tuberal ventral; ZI, zona incerta. (Modificado de Moore, 2013). ..... 21
- Figura 5.** Patrón temporal característico de la temperatura corporal de un conejo neonato de 7 días de edad. El área roja representa el incremento anticipatorio que ocurre aproximadamente 2 horas previas a la llegada de la madre al nido. Durante el evento de amamantamiento, representado por la barra vertical amarilla, se presenta el valor máximo de temperatura, señalado por la fecha naranja. Posteriormente la temperatura corporal desciende súbitamente por debajo de la media diaria, representada por la línea punteada gris y permanece así por aproximadamente 4 horas, a este evento se le conoce como pos-prandio, representado por el área azul. El resto del ciclo la temperatura permanece cercana a la media diaria..... 32
- Figura 6.** Patrón promedio de la actividad locomotora de conejos (n=7) en el día P7, alimentados diariamente en un horario fijo, por una hembra lactante (Natural) o estimulados olfativamente con leche de coneja (Leche), 2-metilbut-2-enal (2MB2) o agua destilada (Sin feromona). Los tres grupos que recibieron estimulación olfativa presentan un patrón similar. Modificado de (Montúfar-Chaveznava *et al.*, 2013)..... 36
- Figura 7.** Promedio diario de la temperatura corporal del día posnatal 2 al 7, de conejos neonatos, amamantados por una hembra lactante (NAT MF morado) o estimulados olfativamente con agua destilada (H<sub>2</sub>O MF azul), etilisobutirato (ETIL MF naranja) o 2-metilbut-2-enal (2MB2 MF rojo), en un horario fijo (9:00 horas del tiempo local) cada 24 horas. Los valores se expresan como media  $\pm$  error estándar. NAT MF, r<sub>2</sub>= 0.953; H<sub>2</sub>O MF, r<sub>2</sub>= 0.260; ETIL MF, r<sub>2</sub>= 0.043; 2MB2 MF, r<sub>2</sub>= 0.560. .... 57
- Figura 8.** Ejemplos representativos del patrón temporal diario individual de la temperatura corporal del día posnatal 2 al 7 de conejos neonatos, amamantados por una hembra lactante (NAT MF) o estimulados olfativamente con agua destilada (H<sub>2</sub>O MF), etilisobutirato (ETIL MF) o 2-metilbut-2-enal (2MB2), en un horario fijo (tiempo local 9:00 horas) cada 24 horas. La barra gris vertical indica el momento del ciclo en el que tuvo lugar la manipulación experimental, la línea roja horizontal representa la media del día. En la parte baja se representa el promedio del patrón temporal del grupo de los días posnatales 3 y 7. Los valores se expresan como media  $\pm$  error estándar y temperatura en °C..... 59

- Figura 9.** Promediario del horario de presentación de la temperatura corporal máxima (triángulos apuntando hacia arriba) y temperatura mínima (triángulos apuntando hacia abajo) diaria del día 2 al 7 posnatal, morado azul), naranja MF rojo),(tiempo local 9:00 horas) La barra gris vertical indica el momento del ciclo en el que tuvo lugar la estimulación olfativa. .... 60
- Figura 10.** Análisis del componente anticipatorio de la temperatura corporal en el día posnatal 3 y 7 olfativamente con H<sub>2</sub>O), MF(tiempo local 9:00 horas) de la anticipación, e representa como con respecto a la media el , indica diferencia significativa , # vs H<sub>2</sub>O, %vs ETIL  $p < 0.05$ . .... 62
- Figura 11.** Promedio diario de la temperatura corporal del día posnatal 2 al 7, de conejos neonatos, amamantados por una hembra lactante (NAT CF morado) o estimulados olfativamente con agua destilada (H<sub>2</sub>O CF azul), etilisobutirato (ETIL CF naranja) o 2-metil-2butenal (2MB2 CF rojo), en un horario fijo (9:00 horas del tiempo local) cada 24 horas. En P2-P3 la estimulación olfativa se realizó a las 9:00 horas y a partir del día P4-P7 se retrasó 6 horas en el ciclo, realizándose a las 15:00 horas. Los valores se expresan como media  $\pm$  error estándar. NAT CF,  $r^2 = 0.930$ ; H<sub>2</sub>O CF,  $r^2 = 0.036$ ; ETIL CF,  $r^2 = 0.080$ ; 2MB2 CF,  $r^2 = 0.293$ . .... 65
- Figura 12.** temperatura corporal H<sub>2</sub>O CF) CF (9:00 horas del tiempo local) nPa manipulación experimental se 9:00 horas y a partir del día P4 se retrasó 6 horas en el ciclo, realizándose a las 15:00 horas La barra gris vertical indica el momento del ciclo en el que tuvo lugar la manipulación experimental, la línea roja horizontal representa la media del día. En la parte baja se representa el promedio del patrón temporal del grupo de los días posnatales 3 y 7. Los valores se expresan como media  $\pm$  error estándar temperatura en °C. .... 66
- Figura 13.** Promedio diario del horario de presentación de la temperatura corporal máxima (triángulos apuntando hacia arriba) y temperatura mínima (triángulos apuntando hacia abajo) diaria del día 2 al 7 posnatal, de conejos neonatos, amamantados por una hembra lactante (NAT CF morado) o estimulados olfativamente con agua destilada (H<sub>2</sub>O CF azul), etilisobutirato (ETIL CF naranja) o 2-metilbut-2-enal (2MB2 CF rojo), en un horario fijo cada 24 horas. En P2-P3, la manipulación experimental se realizó a las 9:00 horas y a partir del día P4 se retrasó 6 horas en el ciclo, realizándose a las 15:00 horas. La barra gris vertical indica el momento del ciclo en el que tuvo lugar la manipulación experimental. Los valores se expresan como media  $\pm$  error estándar. .... 67
- Figura 14.** Análisis del componente anticipatorio de la temperatura corporal en el día posnatal 3 y 7 olfativamente con H<sub>2</sub>O), CF(tiempo local 9:00 horas) En P2-P3, la manipulación experimental se realizó a las 9:00 horas y a partir del día P4 se retrasó 6 horas en el ciclo, realizándose a las 15:00 horas. de la anticipación, e representa como con respecto a la media el , indica diferencia significativa , # vs H<sub>2</sub>O, %vs ETIL  $p < 0.05$ . .... 69
- Figura 15.** Promedio diario de la actividad locomotora del día posnatal 2 al 7, de conejos neonatos, amamantados por una hembra lactante (NAT MF: morado) o estimulados olfativamente con agua destilada (H<sub>2</sub>O MF: azul), etilisobutirato (ETIL MF: naranja) o 2-metilbut-2-enal (2MB2: rojo), en un horario fijo (9:00 horas del tiempo local) cada 24 horas. Los valores se expresan como media  $\pm$  error estándar. NAT CF,  $r^2 = 0.880$ ; H<sub>2</sub>O CF,  $r^2 = 0.879$ ; ETIL CF,  $r^2 = 0.863$ ; 2MB2 CF,  $r^2 = 0.897$ . .... 71
- Figura 16.** Ejemplos representativos del patrón temporal diario individual de actividad locomotora del día posnatal 2 al 7 de conejos neonatos, amamantados por una hembra lactante (NAT MF) o estimulados olfativamente con agua destilada (H<sub>2</sub>O MF), etilisobutirato (ETIL MF) o 2-metilbut-2-enal (2MB2), en un horario fijo (9:00 horas del tiempo local) cada 24 horas. La barra gris vertical indica el momento del ciclo en el que tuvo lugar la manipulación experimental. La línea roja horizontal representa la media del día. En la parte baja se representa el promedio del patrón temporal del grupo de los días posnatales 3 y 7. Los valores se expresan como media  $\pm$  error estándar y movimientos en 2 minutos. .... 72
- Figura 17.** Promedio diario del horario de presentación de la actividad locomotora máxima (triángulos apuntando hacia arriba) y la actividad mínima (triángulos apuntando hacia abajo) diaria del día 2 al 7 posnatal, de conejos neonatos, amamantados por una hembra lactante (NAT MF morado) o estimulados olfativamente con agua destilada (H<sub>2</sub>O MF azul), etilisobutirato (ETIL MF naranja) o 2-metilbut-2-enal (2MB2 MF rojo), en un horario fijo (9:00 horas del tiempo local) cada 24 horas. La barra gris vertical indica el momento del ciclo en el que tuvo lugar la estimulación olfativa. Los valores se expresan como media  $\pm$  error estándar. .... 73

**Figura 18.** Análisis del componente anticipatorio de la actividad locomotora en el día posnatal 3 y 7 de conejos neonatos, amamantados por una hembra lactante (NAT MF) o estimulados olfativamente con agua destilada (H<sub>2</sub>O MF), etilisobutirato (ETIL MF) o 2-metilbut-2-enal (2MB2 MF), en un horario fijo (9:00 horas del tiempo local) cada 24 horas. En las dos graficas superiores se muestra el promedio de la intensidad de la anticipación, se representa como el incremento en movimientos/ 2 minutos con respecto a la media del día. En el par de graficas inferiores se muestra el promedio de la duración del incremento anticipatorio, se representa en minutos. Los valores se expresan como media ± error estándar, \* indica diferencia significativa vs NAT, # vs H<sub>2</sub>O, %vs ETIL  $p < 0.05$ . ..... 75

**Figura 19.** Promedio diario de la actividad locomotora del día posnatal 2 al 7, de conejos neonatos, amamantados por una hembra lactante (NAT CF morado) o estimulados olfativamente con agua destilada (H<sub>2</sub>O CF azul), etilisobutirato (ETIL CF naranja) o 2-metilbut-2-enal (2MB2 CF rojo), en un horario fijo (9:00 horas del tiempo local) cada 24 horas. En P2-P3 la manipulación experimental se realizó a las 9:00 horas y a partir del día P4-P7 se retrasó 6 horas en el ciclo, realizándose a las 15:00 horas. Los valores se expresan como media ± error estándar. NAT CF,  $r^2 = 0.880$ ; H<sub>2</sub>O CF,  $r^2 = 0.654$ ; ETIL CF,  $r^2 = 0.956$ ; 2MB2 CF,  $r^2 = 0.672$ . ..... 77

**Figura 20.** Ejemplos representativos del patrón temporal diario individual de actividad locomotora del día posnatal 2 al 7 de conejos neonatos, amamantados por una hembra lactante (NAT CF) o estimulados olfativamente con agua destilada (H<sub>2</sub>O CF) etilisobutirato (ETIL CF) o 2-metilbut-2-enal (2MB2 CF), en un horario fijo (9:00 horas del tiempo local) cada 24 horas. En P2-P3, la manipulación experimental se realizó a las 9:00 horas y a partir del día P4 se retrasó 6 horas en el ciclo, realizándose a las 15:00 horas. La barra gris vertical indica el momento del ciclo en el que tuvo lugar la manipulación experimental, la línea roja horizontal representa la media del día. En la parte baja se representa el promedio del patrón temporal del grupo de los días posnatales 3 y 7. Los valores se expresan como media ± error estándar y movimientos en 2 minutos. .... 78

**Figura 21.** Promedio diario del horario de presentación de la actividad locomotora máxima (triángulos apuntando hacia arriba) y actividad mínima (triángulos apuntando hacia abajo) diaria del día 2 al 7 posnatal, de conejos neonatos, amamantados por una hembra lactante (NAT CF morado) o estimulados olfativamente con agua destilada (H<sub>2</sub>O CF azul), etilisobutirato (ETIL CF naranja) o 2-metilbut-2-enal (2MB2 CF rojo), en un horario fijo cada 24 horas. En P2-P3, la manipulación experimental se realizó a las 9:00 horas y a partir del día P4 se retrasó 6 horas en el ciclo, realizándose a las 15:00 horas. La barra gris vertical indica el momento del ciclo en el que tuvo lugar la manipulación experimental. Los valores se expresan como media ± error estándar. .... 79

**Figura 22.** Análisis del componente anticipatorio de la actividad locomotora en el día posnatal 3 y 7 de conejos neonatos, amamantados por una hembra lactante (NAT CF) o estimulados olfativamente con agua destilada (H<sub>2</sub>O CF), etilisobutirato (ETIL CF) o 2-metilbut-2-enal (2MB2 CF), en un horario fijo (tiempo local 9:00 horas) cada 24 horas. En P2-P3, la manipulación experimental se realizó a las 9:00 horas y a partir del día P4 se retrasó 6 horas en el ciclo, realizándose a las 15:00 horas. En las dos graficas superiores se muestra el promedio de la intensidad de la anticipación, se representa como el incremento en movimientos/ 2 minutos con respecto a la media. En el par de graficas inferiores se muestra el promedio de la duración del incremento anticipatorio, se representa en minutos. Los valores se expresan como media ± error estándar, \* indica diferencia significativa vs NAT, # vs H<sub>2</sub>O, %vs ETIL  $p < 0.05$ . ..... 81

**Figura 23.** Patrón temporal de expresión del gen *Per1* en el NSQ de conejos de 7 días de edad (P7), amamantados por una hembra lactante grupo NAT o estimulados olfativamente con agua destilada grupo H<sub>2</sub>O, o etilisobutirato grupo ETIL, o 2-metilbut-2-enal grupo 2MB2 en un horario fijo, cada 24 horas. Para los grupos del bloque izquierdo la manipulación experimental se realizó de P2-P7 a las 9:00 horas del tiempo local, para los grupos del bloque derecho la manipulación experimental se realizó en P2- P3, a las 9:00 horas y de P4-P7 a las 15:00 horas. Los círculos negros representan densidad óptica relativa media (DOR) ± error estándar, la línea continua representa el ajuste a una función cosenosoidal de 24 horas, cuando el porcentaje de ritmicidad fue superior al 50% y  $p < 0.05$ , la línea discontinua indica cuando las condiciones anteriores no se cumplieron. .... 84

**Figura 24.** Patrón temporal de expresión del gen *Per1* en la capa glomerular del BO de conejos de 7 días de edad (P7), amamantados por una hembra lactante grupo NAT o estimulados olfativamente con agua destilada grupo H<sub>2</sub>O, o etilisobutirato grupo ETIL, o 2-metilbut-2-enal grupo 2MB2 en un horario fijo, cada 24 horas. Para los grupos del bloque izquierdo la manipulación experimental se realizó de P2-P7 a las 9:00 horas del tiempo local, para los grupos del bloque derecho la manipulación experimental se realizó en P2 y P3, a las 9:00 horas y de P4-P7 a las 15:00 horas. Los círculos negros representan densidad óptica relativa media (DOR) ± error estándar, la línea continua representa el ajuste a una función cosenosoidal de 24 horas, cuando el porcentaje de ritmicidad

fue superior al 50% y  $p < 0.05$ , la línea discontinua indica cuando las condiciones anteriores no se cumplieron.  
..... 87

**Figura 25.** Patrón temporal de expresión del gen *Per1* en la capa mitral del BO de conejos de 7 días de edad (P7), amamantados por una hembra lactante grupo NAT o estimulados olfativamente con agua destilada grupo H<sub>2</sub>O, o etilisobutirato grupo ETIL, o 2-metilbut-2-enal grupo 2MB2 en un horario fijo, cada 24 horas. Para los grupos del bloque izquierdo la manipulación experimental se realizó de P2-P7 a las 9:00 horas del tiempo local, para los grupos del bloque derecho la manipulación experimental se realizó en P2 y P3, a las 9:00 horas y de P4-P7 a las 15:00 horas. Los círculos negros representan densidad óptica relativa media (DOR)  $\pm$  error estándar, la línea continua representa el ajuste a una función cosenosoidal de 24 horas, cuando el porcentaje de ritmicidad fue superior al 50% y  $p < 0.05$ , la línea discontinua indica cuando las condiciones anteriores no se cumplieron.  
..... 90

**Figura 26.** Patrón temporal de expresión del gen *Per1* en la capa granular del BO de conejos de 7 días de edad (P7), amamantados por una hembra lactante grupo NAT o estimulados olfativamente con agua destilada grupo H<sub>2</sub>O, o etilisobutirato grupo ETIL, o 2-metilbut-2-enal grupo 2MB2 en un horario fijo, cada 24 horas. Para los grupos del bloque izquierdo la manipulación experimental se realizó de P2-P7 a las 9:00 horas del tiempo local, para los grupos del bloque derecho la manipulación experimental se realizó en P2 y P3, a las 9:00 horas y de P4-P7 a las 15:00 horas. Los círculos negros representan densidad óptica relativa media (DOR)  $\pm$  error estándar, la línea continua representa el ajuste a una función cosenosoidal de 24 horas, cuando el porcentaje de ritmicidad fue superior al 50% y  $p < 0.05$ , la línea discontinua indica cuando las condiciones anteriores no se cumplieron.  
..... 93

**Figura 27.** Microfotografías representativas que muestran la expresión de los genes reloj *Per1* a las 1:00 horas (tiempo local) y *Bmal1* a las 17:00 horas (tiempo local), en el núcleo supraquiasmático de conejos de 7 días de edad. Los animales fueron amamantados por una hembra lactante (NAT) en un horario fijo, cada 24 horas. Para los grupos MF la manipulación experimental se realizó de P2-P7 a las 9:00 horas del tiempo local. Para los grupos CF la manipulación experimental se realizó en P2 y P3, a las 9:00 horas y de P4-P7 a las 15:00 horas. S: control hibridado con sonda sentido, B: control hibridado con medio de hibridación, NSQ: núcleo supraquiasmático, IIIV: tercer ventrículo, QO: quiasma óptico, barra de escala= 200 $\mu$ m..... 94

**Figura 28.** Microfotografías representativas que muestran la expresión de los genes reloj *Per1* a las 1:00 horas (tiempo local) y *Bmal1* a las 9:00 horas (tiempo local), en las capas glomerular, mitral y granular del bulbo olfativo de conejos de 7 días de edad. Los animales fueron amamantados por una hembra lactante (NAT) en un horario fijo, cada 24 horas. Para los grupos MF la manipulación experimental se realizó de P2-P7 a las 9:00 horas del tiempo local. Para los grupos CF la manipulación experimental se realizó en P2 y P3, a las 9:00 horas y de P4-P7 a las 15:00 horas. S: control hibridado con sonda sentido, B: control hibridado con medio de hibridación, GLO: capa glomerular, MIT: capa mitral, GRA: capa granular, barra de escala= 400 $\mu$ m. .... 95

**Figura 29.** Patrón temporal de expresión del gen *Bmal1* en el NSQ de conejos de 7 días de edad (P7), amamantados por una hembra lactante grupo NAT o estimulados olfativamente con agua destilada grupo H<sub>2</sub>O, o etilisobutirato grupo ETIL, o 2-metilbut-2-enal grupo 2MB2 en un horario fijo, cada 24 horas. Para los grupos del bloque izquierdo la manipulación experimental se realizó de P2-P7 a las 9:00 horas del tiempo local, para los grupos del bloque derecho la manipulación experimental se realizó en P2 y P3, a las 9:00 horas y de P4-P7 a las 15:00 horas. Los círculos negros representan densidad óptica relativa media (DOR)  $\pm$  error estándar, la línea continua representa el ajuste a una función cosenosoidal de 24 horas, cuando el porcentaje de ritmicidad fue superior al 50% y  $p < 0.05$ , la línea discontinua indica cuando las condiciones anteriores no se cumplieron. .... 98

**Figura 30.** Patrón temporal de expresión del gen *Bmal1* en la capa glomerular de conejos de 7 días de edad (P7), amamantados por una hembra lactante grupo NAT o estimulados olfativamente con agua destilada grupo H<sub>2</sub>O, o etilisobutirato grupo ETIL, o 2-metilbut-2-enal grupo 2MB2 en un horario fijo, cada 24 horas. Para los grupos del bloque izquierdo la manipulación experimental se realizó de P2-P7 a las 9:00 horas del tiempo local, para los grupos del bloque derecho la manipulación experimental se realizó en P2 y P3, a las 9:00 horas y de P4-P7 a las 15:00 horas. Los círculos negros representan densidad óptica relativa media (DOR)  $\pm$  error estándar, la línea continua representa el ajuste a una función cosenosoidal de 24 horas, cuando el porcentaje de ritmicidad fue superior al 50% y  $p < 0.05$ , la línea discontinua indica cuando las condiciones anteriores no se cumplieron.  
..... 101



**Figura 31.** Patrón temporal de expresión del gen *Bmal1* en la capa mitral del BO de conejos de 7 días de edad (P7), amamantados por una hembra lactante grupo NAT o estimulados olfativamente con agua destilada grupo H<sub>2</sub>O, o etilisobutirato grupo ETIL, o 2-metilbut-2-enal grupo 2MB2 en un horario fijo, cada 24 horas. Para los grupos del bloque izquierdo la manipulación experimental se realizó de P2-P7 a las 9:00 horas del tiempo local, para los grupos del bloque derecho la manipulación experimental se realizó en P2 y P3, a las 9:00 horas y de P4-P7 a las 15:00 horas. Los círculos negros representan densidad óptica relativa media (DOR) ± error estándar, la línea continua representa el ajuste a una función cosenosoidal de 24 horas, cuando el porcentaje de ritmicidad fue superior al 50% y  $p < 0.05$ , la línea discontinua indica cuando las condiciones anteriores no se cumplieron.  
..... 104

**Figura 32.** Patrón temporal de expresión del gen *Bmal1* en la capa granular del BO de conejos de 7 días de edad (P7), amamantados por una hembra lactante grupo NAT o estimulados olfativamente con agua destilada grupo H<sub>2</sub>O, o etilisobutirato grupo ETIL, o 2-metilbut-2-enal grupo 2MB2 en un horario fijo, cada 24 horas. Para los grupos del bloque izquierdo la manipulación experimental se realizó de P2-P7 a las 9:00 horas del tiempo local, para los grupos del bloque derecho la manipulación experimental se realizó en P2 y P3, a las 9:00 horas y de P4-P7 a las 15:00 horas. Los círculos negros representan densidad óptica relativa media (DOR) ± error estándar, la línea continua representa el ajuste a una función cosenosoidal de 24 horas, cuando el porcentaje de ritmicidad fue superior al 50% y  $p < 0.05$ , la línea discontinua indica cuando las condiciones anteriores no se cumplieron.  
..... 107