

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA
UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE DOCENCIA E INVESTIGACIÓN

EFFECTO DE LA EXPOSICIÓN PROLONGADA A UN FOTOPERIODO
IRREGULAR SOBRE LA ACTIVIDAD LOCOMOTRIZ, LA INGESTA DE
ALIMENTO Y LA EXPRESIÓN RELATIVA DE GENES DE PREPRO-OREXINAS,
PER1 Y BMAL1 EN DIENCÉFALO DE *Neotomodon alstoni*.

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:
MARÍA FERNANDA REVUELTAS GUILLÉN

TUTOR PRINCIPAL
DR. MANUEL MIRANDA ANAYA
UMDI, FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DRA. ISABEL CRISTINA MÉNDEZ HERNÁNDEZ. INB, UNAM
DR. LEONARDO RODRÍGUEZ SOSA. FM, UNAM

Querétaro, Querétaro noviembre 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Dedicatoria

*A Roberto Molina, que a pesar de tu viaje épico hacia la nada
seguiremos siendo mejores amigos.*

A Laika, la mejor compañía

Agradecimientos

Al Proyecto UMDI 104419, PAPIIT IN201424 por el apoyo económico para la realización de esta tesis. Así como a la beca otorgada durante la maestría (CVU: 1146130) en la Convocatoria de Becas Nacionales 2021 de CONAHCYT.

Al Dr. Manuel Miranda Anaya por brindarme de nuevo la oportunidad de trabajar en su laboratorio y continuar aprendiendo sobre un tema tan apasionante. Gracias siempre por el apoyo y la amistad.

A la Dra. Isabel Cristina Méndez Hernández y el Dr. Leonardo Rodríguez Sosa por el apoyo y la tutoría a lo largo de la maestría, sus comentarios y opiniones fueron fundamentales para la consolidación del proyecto.

A la Dra. Yazmín Macotela Guzmán, al Dr. Luis Alberto Téllez Lima y al Dr. Moisés Pérez Mendoza por sus enriquecedoras contribuciones a la escritura de esta tesis.

A la Dra. Elvira del Carmen Arellanes Licea por su inmensa paciencia, su enorme capacidad de transmitir conocimiento y todo el apoyo en la estandarización de la técnica de PCR. Son enseñanzas de trabajo en el laboratorio que me van a servir para el resto de mi desarrollo profesional.

A Agustín Carmona Castro por el apoyo brindado en la crianza de ratones en el bioterio de la facultad de ciencias UNAM.

A mis amigos, que este año más que nunca me demostraron lo afortunada que soy de tenerlos en mi vida.

A mi familia, por que como siempre han sido un apoyo incondicional durante todo el proceso y también una ligera presión para terminar este trabajo, siempre con mucho cariño.

A mis padres, por siempre estar ahí para mí, por la paciencia, el cariño y el apoyo. A Alba por aguantar las desveladas y el estrés siempre con un amor inmenso. A mis hermanos por ser unos tipazos.

Índice

Resumen.....	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
-Características generales de los ritmos circadianos.....	3
-Sincronización externa e interna.....	9
-Sincronización fótica.....	11
-Sincronización no fótica.....	13
-Alteración del ciclo natural de iluminación y la desincronización circadiana.....	15
-Modelos de desincronización.....	17
-Orexinas, reguladoras de ciclo de sueño-vigilia e ingesta de alimento.....	19
- <i>Neotomodon alstoni</i> como modelo de desincronización circadiana.....	23
Justificación.....	26
Preguntas de investigación.....	27
Hipótesis.....	27
Objetivos.....	27
Métodos.....	28
-Mantenimiento de animales.....	28
-Curva de tolerancia a la glucosa.....	28
-Protocolo de fotoperiodo irregular.....	29
-Registro de actividad y consumo de alimento.....	30
-Obtención de los tejidos.....	31
-Extracción de ARN total y síntesis de ADNc.....	31
-RT-qPCR.....	32
-Análisis estadísticos.....	33
Resultados y discusión.....	34
-Peso corporal y consumo de alimento.....	34
-Curva de tolerancia a la glucosa.....	39
-Registro de la actividad locomotora.....	40
-Expresión génica.....	46
Conclusiones.....	50

Referencias.....	51
------------------	----

Índice de tablas y figuras:

Figura 1. Parámetros a medir en un ritmo biológico.....	4
Figura 2. Mecanismo molecular del reloj circadiano.....	2
Figura 3. Esquema del núcleo supraquiasmático.....	8
Figura 4: Sistema circadiano en mamíferos	10
Figura 5: Esquema de curva de respuesta de fase	12
Figura 6: Esquema del mecanismo de las neuronas orexigénicas	20
Figura 7: Ratón macho delgado <i>Neotomodon alstoni</i>	23
Tabla 1: Calendarización del encendido y apagado de las luces	30
Figura 8: Representación gráfica de 48 horas, del encendido y apagado de las luces durante el protocolo de fotoperiodo irregular.....	30
Tabla 2: Secuencias de oligonucleótidos.....	33
Figura 9: Promedio \pm EE del peso corporal a lo largo del experimento	34
Figura 10: Consumo total en gramos de alimento durante 24 horas.....	36
Figura 11: Perfil de consumo de alimento durante 24 horas	37
Figura 12: Grafica de frecuencia de consumo durante 24 horas	37
Figura 13: Perfil promedio de la curva de tolerancia a la glucosa y análisis de unidades relativas del área bajo la curva.....	39
Figura 14: Promedio de eventos de actividad locomotriz y actogramas en condición control y experimental.....	42
Figura 14: Promedio de eventos de actividad locomotriz y actogramas del grupo control externo.....	43
Figura 16: Frecuencia de componentes ultradianos obtenidos por el periodograma de Lomb Scargle	44
Figura 17: Expresión relativa del gen de Prepro-orexinas, Per1 y Bmal1 en diencéfalo...47	

Resumen

La desincronización circadiana está vinculada a patrones irregulares de actividad e ingesta y estos a su vez se vinculan con el desarrollo de obesidad. En el ratón *Neotomodon alstoni* existen subpoblaciones que se mantienen delgadas y otros que desarrollan obesidad. En los obesos está alterada la organización del sistema circadiano que se refleja en cambios en los patrones de actividad motora e ingesta. Este trabajo buscó determinar si en ratones machos delgados *N. alstoni* la exposición a un fotoperiodo irregular induce alteraciones en la distribución de actividad locomotriz en foto y escotofase, patrones alterados de ingesta y su relación con la curva de tolerancia a la glucosa (CTG), así como en la expresión relativa de genes de prepro-orexinas, *Per1* y *Bmal1* en tejido diencefálico.

Los resultados indican que la exposición durante doce semanas a ciclos irregulares de iluminación no causa efecto significativo en el peso corporal, ni en la expresión relativa del gen de prepro-orexinas. Sin embargo, los ratones mostraron reducción en la cantidad de actividad locomotriz, mejor movilización de la glucosa al minuto 60 en la curva de tolerancia a la glucosa, reducción de la expresión relativa en la fase nocturna de *Per1* y *Bmal1* en diencefalo y mayor ingesta de alimento durante la fase diurna. Esto sugiere la posible existencia de algún mecanismo compensatorio que evita que el fotoperiodo irregular cause aumento en el peso.

Palabras clave: ritmos circadianos, desincronización, fotoperiodo irregular, *Neotomodon alstoni*.

Abstract

Circadian desynchronization is linked to irregular patterns of activity and intake, which in turn are associated with the development of obesity. In the *Neotomodon alstoni* mouse, there are subpopulations; some remain lean while others develop obesity. The obese individuals have altered organization of the circadian system, reflected in changes in patterns of motor activity and intake. This study aimed to determine whether exposure to an irregular photoperiod induces alterations in the distribution of locomotor activity during light and dark phases, altered intake patterns, and their relationship with glucose tolerance curve (GTC), as well as the relative expression of prepro-orexin genes, Per1, and Bmal1 in diencephalic tissue in lean male *N. alstoni* mice.

The results indicate that exposure to irregular lighting cycles for twelve weeks does not have a significant effect on body weight, nor on the relative expression of the prepro-orexin gene. However, the mice showed a reduction in the amount of locomotor activity, improved glucose mobilization at the 60-minute mark in the glucose tolerance curve, reduced relative expression of Per1 and Bmal1 during the nocturnal phase in the diencephalon, and increased food intake during the diurnal phase. This suggests the possible existence of a compensatory mechanism that prevents irregular photoperiods from causing weight gain.

Keywords: circadian rhythms, desynchronization, irregular photoperiod, *Neotomodon alstoni*.

Introducción

Características generales de los ritmos circadianos

Las funciones fisiológicas de los seres vivos oscilan a lo largo del día según un programa temporal interno conocido como “el reloj circadiano”. Estos mecanismos endógenos permiten anticipar ciertas condiciones periódicas del ambiente, lo que brinda una ventaja para adaptarse al entorno (Aguilar-Roblero *et al.*, 2015; Madrid, 2013). Estos ritmos presentan 3 características fundamentales: deben ser producidos por procesos endógenos, se deben sincronizar con los ciclos diarios del medio externo (zeitgeber) y el periodo del reloj se mantiene con poca variación si los ritmos se observan en condiciones constantes a distintas temperaturas (Aguilar-Roblero *et al.*, 2015; Buhr *et al.*, 2013).

Los parámetros a medir en un ritmo biológico son equivalentes a los usados para estimar una senoide (Fig. 1), como su periodo que corresponde al tiempo en que tarda en completarse el ciclo; la frecuencia, que es inverso del periodo y corresponde al número de veces en que se repite un ciclo completo en un intervalo de tiempo definido; la amplitud, definida como la variación de la intensidad de la oscilación entre el valor más alto, o del mesor, que es el valor medio del ajuste sinusoidal de todos los valores medidos en un ritmo; y la fase, que representa al valor dado de amplitud que corresponde a un instante del ciclo, donde al valor más alto se le denomina acrofase y al más bajo batifase (Aguilar-Roblero *et al.*, 2015).

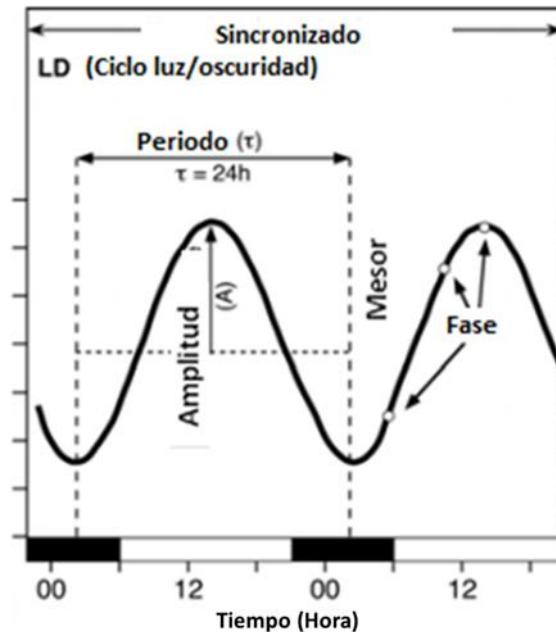


Figura 1: Parámetros a medir en un ritmo biológico sincronizado. En el eje de las abscisas está representado con barras oscuras los periodos de oscuridad y con barras claras los periodos de luz, además de las unidades de tiempo (horas) correspondientes. El periodo, la frecuencia, la amplitud, el mesor, la fase, la acrofase, y la batifase. Figura modificada de (Koukkari et al. 2006).

A nivel molecular, los ritmos circadianos ocurren en todas las células nucleadas del cuerpo, su función ocurre mediante una doble asa transcripcional-traduccional de activación e inhibición entre distintos “genes del reloj circadiano” y sus correspondientes proteínas. En mamíferos este proceso se puede separar en dos vías principales. La primera que actúa como el asa positiva comienza con la unión del heterodímero de factores de transcripción que forman las proteínas CLOCK y BMAL1, a la caja E presente en los promotores para activar la transcripción de los genes *Per1*, *2* y *3* y *Cry1* y *2*. Las proteínas traducidas de estos genes constituyen el asa negativa; fuera del núcleo celular se acumulan y como un heterodímero que, se fosforila, se transloca al núcleo e inhibe la actividad del heterodímero

CLOCK/BMAL1, lo que induce la represión de la transcripción, y por lo tanto, la traducción de PERs y CRYs. Una vez que se reducen los niveles del dímero PER/CRY, la represión de CLOCK/BMAL1 disminuye y se activa de nuevo su síntesis. La expresión de Bmal1 depende de una segunda asa de retroalimentación, sin embargo, la expresión del Clock es constitutiva (Weaver, 2016; Patke, *et al.*, 2019).

En la segunda vía CLOCK/BMAL1 actúan también como factores de transcripción positivos de los genes de Dbp y de los receptores nucleares *Reverba* y *Reverb β* . La proteína *REVER α* y *β* funcionan como inhibidores de la expresión de Bmal1, generando retroalimentación negativa; mientras tanto las proteínas de los genes de Dbp regulan positivamente la expresión del receptor huérfano α relacionado con retinoides *ROR α* , *ROR β* y *ROR γ* que son factores positivos de transcripción de Bmal1, asegurando así la ritmicidad en su expresión (Fig. 2). En esta vía también participa el gen E4BP4, cuya proteína NFIL3 inhibe la transcripción de los genes que contienen caja D (Buhr, *et al.*, 2013, Mitsui, *et al.*, 2001; Patke, *et al.*, 2019). Estas asas de retroalimentación entrelazadas y cooperativas controlan la transcripción de cerca del 10% del genoma y optimizan el tiempo de expresión génica al mantener robustez en los ritmos circadianos de diversas funciones fisiológicas, mediante el control de la expresión de otros genes también “controlados por reloj” (Hardin *et al.*, 2013; Partch *et al.*, 2014).

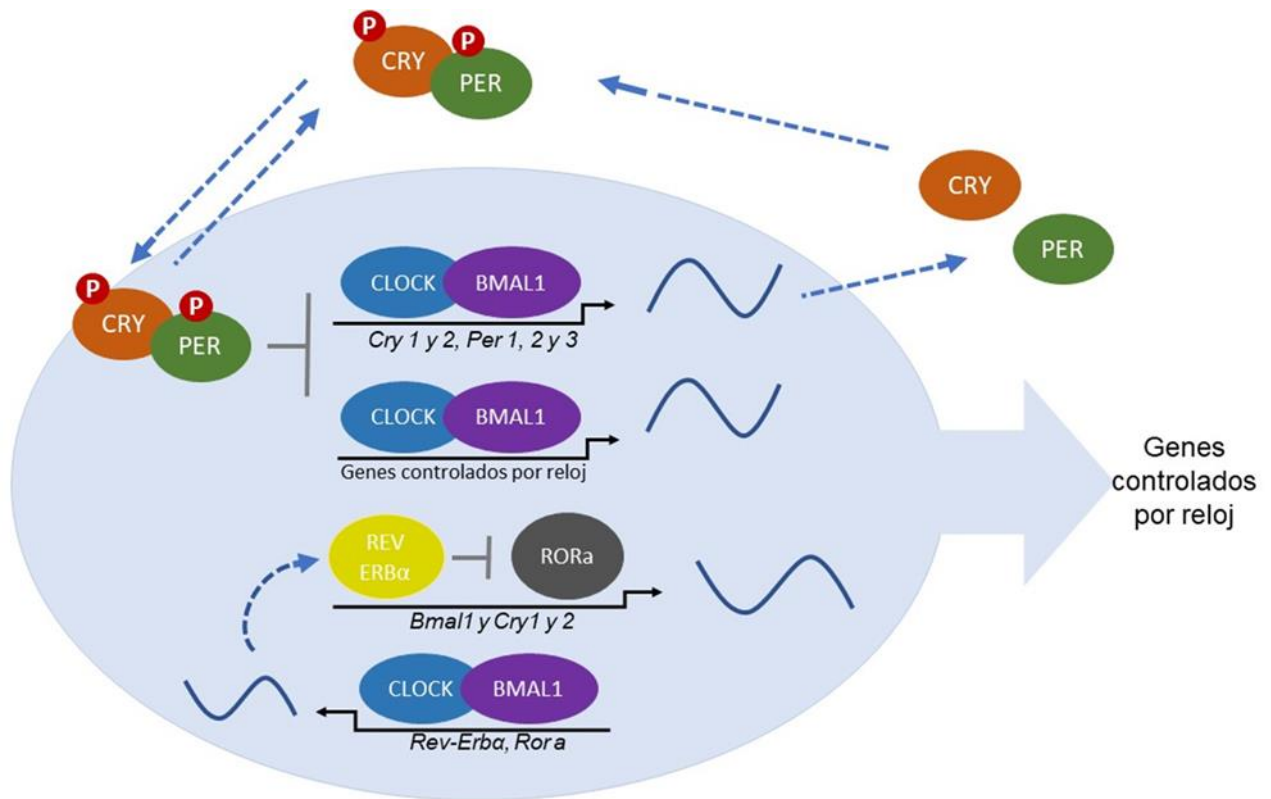


Figura 2: Mecanismo molecular del reloj circadiano. El dímero CLOCK y BMAL1 se une a la E-box y activa la transcripción de los genes *Per1*, *2* y *3* y *Cry1* y *2*. El asa negativa se forma fuera del núcleo celular con el heterodímero de PER y CRY e interactúa con el dímero de CLOCK y BMAL1 reprimiendo la transcripción de sus genes blanco. En una segunda vía, CLOCK/BMAL1 regulan la transcripción de *Reverba*. REVERB inhibe la expresión de *Bmal1*. *RORα*, *RORβ* y *RORγ* (*RORα/β/γ*) activan la transcripción de *Bmal1*. *Period* (*Per*), *Criptocromo* (*Cry*), *Receptor huérfano relacionado con retinoides α, β o γ* (*RORα/β/γ*). (Modificado de: Partch et al., 2014).

Aunque la maquinaria molecular del reloj circadiano se encuentra en todas las células nucleadas del organismo, existen tejidos que dominan en la organización circadiana. Estos tejidos tienen la capacidad de generar ciclos circadianos regulares, por lo que se les denomina osciladores periféricos. En mamíferos la estructura que funge como el principal oscilador circadiano es el núcleo supraquiasmático (NSQ) ubicado en la base del hipotálamo. En condiciones adecuadas de cultivo, neuronas que conforman el NSQ pueden mantener de

manera autónoma ciclos circadianos dependientes de disparos de potenciales de acción espontáneos.

El NSQ aislado oscila en su actividad eléctrica de forma independiente, pero en conjunto con los núcleos hipotalámicos asociados tiene la capacidad de sincronizarse con señales del entorno y proveer diferentes señales de fase a otros tejidos vía el sistema neuroendocrino (Morgado *et al.*, 2014; Okamura *et al.*, 2002; Welsh *et al.* 2010). El NSQ (Fig. 3) se puede dividir en dos subregiones: 1) la zona del núcleo o médula, que recibe la información fótica del tracto retinohipotalámico (TRH) y donde se expresan varios neuropéptidos como el péptido vasoactivo intestinal (VIP) y el péptido liberador de gastrina (GRP) y 2) la corteza, que es la zona con oscilaciones más robustas, con numerosas proyecciones eferentes y poblado principalmente de neuronas que expresan arginina vasopresina (AVP) (Hastings, *et al.*, 2018; Mieda, 2020). Esta clasificación está dada por los principales neurotransmisores que participan en estas zonas, sin embargo, no son los únicos. El más abundante en el NSQ es el ácido gamma-aminobutírico (GABA), presente en todas sus células, también en menor cantidad se presentan neurotensina (NT), somatostatina (SS), calretinina (CALR), encefalina (ENK) y el neuromodulador péptido activador de la adenilil ciclasa hipofisaria (PACAP). Las interacciones entre las neuronas que producen estos neurotransmisores son complejas, específicas y jerárquicas, tal como el neuropéptido VIP que al dictar la respuesta a la luz también modula en gran medida las demás interacciones neuronales en el NSQ (Moore, *et al.*, 2002; Varadarajan, *et al.*, 2018).

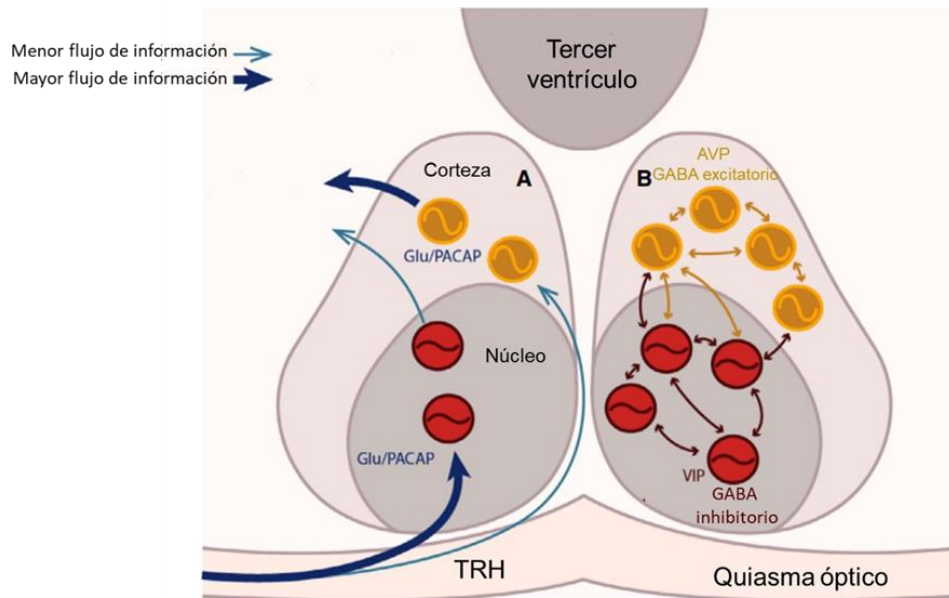


Figura 3: Esquema del NSQ. La corteza, con neuronas que expresan AVP y GABA como neurotransmisor excitador, que tiene las proyecciones de salida del NSQ. La zona del núcleo, recibe información fótica del TRH y expresa VIP, GLU, PACAP y GABA inhibitorio. Las flechas amarillas corresponden a la vía excitatoria y las rojas a la inhibitoria. Arginina vasopresina (AVP), tracto retinohipotalámico (TRH), péptido vasoactivo intestinal (VIP), glutamato (GLU). Modificado de: Lu, *et al.*, 2021).

El NSQ tiene conexiones multisinápticas con neuronas motoras y del sistema simpático y parasimpático de diferentes tejidos, mediante las cuales sincroniza a los órganos periféricos, así como obtiene retroalimentación de ellos (Buijs, *et al.*, 2016). Las principales salidas aferentes del NSQ se transmiten a través del núcleo subparaventricular (sPVN) y el núcleo dorsomedial del hipotálamo (DMH), donde se regula en buena parte el ciclo de sueño/vigilia mediante las proyecciones excitatorias a las neuronas de orexina y las inhibitorias al área preóptica (POA). Dentro del hipotálamo medial existen 3 tipos de neuronas blanco del NSQ, las primeras son neuronas endocrinas, como las liberadoras de hormona de corticotropina (CRH), la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) y la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH). El segundo grupo son las neuronas del

sistema nervioso autónomo (SNA) y el tercero son las neuronas intermedias del área preóptica medial (MPOA), sPVN y DMH a las que llegan eferentes del sistema nervioso central (SNC) (Buijs, *et al.*, 2001; Kalsbeek, *et al.*, 2002, 2011; Scammell, *et al.*, 2017). Asimismo, el NSQ también tiene proyecciones directas de núcleos sensoriales como el del tracto solitario, MPOA y el arcuato (ARC), este último regula la ritmicidad de las funciones metabólicas (Buijs, *et al.*, 2017).

La interacción NSQ-ARC es necesaria para conservar los ritmos de la ingesta de alimento, donde el Neuropeptido Y (NPY) tiene una liberación circadiana del ARC hacia el núcleo paraventricular (PVN) (Bechtold, *et al.*, 2013). También participa en la regulación de la temperatura corporal, con la liberación de AVP durante la fase de luz, lo que produce una disminución en la temperatura, mientras que, en la fase oscura, por el incremento de la hormona estimulante de los melanocitos alfa (α -MSH) ocurre el efecto contrario (Guzmán-Ruiz, *et al.*, 2015). De igual forma, el ARC tiene receptores de glucocorticoides (GC) que censan sus niveles en plasma, pero su sensibilidad varía a lo largo del día, probablemente debido a la influencia del NSQ (Leon-Mercado, *et al.*, 2017).

Sincronización externa e interna

Dado que el asa molecular circadiana existe en diferentes tejidos que funcionan como osciladores circadianos (Fig. 4), también estos pueden integrar señales del medio externo. Las señales eferentes de los osciladores dan lugar a una organización jerárquica interna, a lo que se le denomina sistema circadiano (Madrid, 2013). Estos relojes internos no tienen periodo de 24 horas exactamente, sino que se ajustan diariamente con estímulos cíclicos que le brindan al organismo

señales del tiempo externo denominadas “zeitgebers” (Pittendrigh, 1993). Para los mamíferos, los ciclos de la luz son la principal señal externa sincronizadora, la cual se recibe en retina y se integra en el NSQ mediante el tracto retinohipotalámico (TRH). La luz en conjunto con otros zeitgebers como la ingesta de alimento, la temperatura, la actividad física y el sueño ayudan a ajustar el tiempo del sistema circadiano con el tiempo externo (Mohawk, J. *et al.*, 2012).

También existen otras estructuras que funcionan como osciladores periféricos, que a pesar de poder sincronizarse con señales de tiempo externas, como la luz, la temperatura, la actividad física, el sueño o la ingesta de alimento, se acoplan a la fase marcada por el NSQ, que funge como oscilador maestro y así se genera una sincronización interna que se vuelve susceptible a la combinación de múltiples zeitgebers (Ashton, *et al.*, 2022; Healy, *et al.*, 2021; Tahara, *et al.*, 2016).

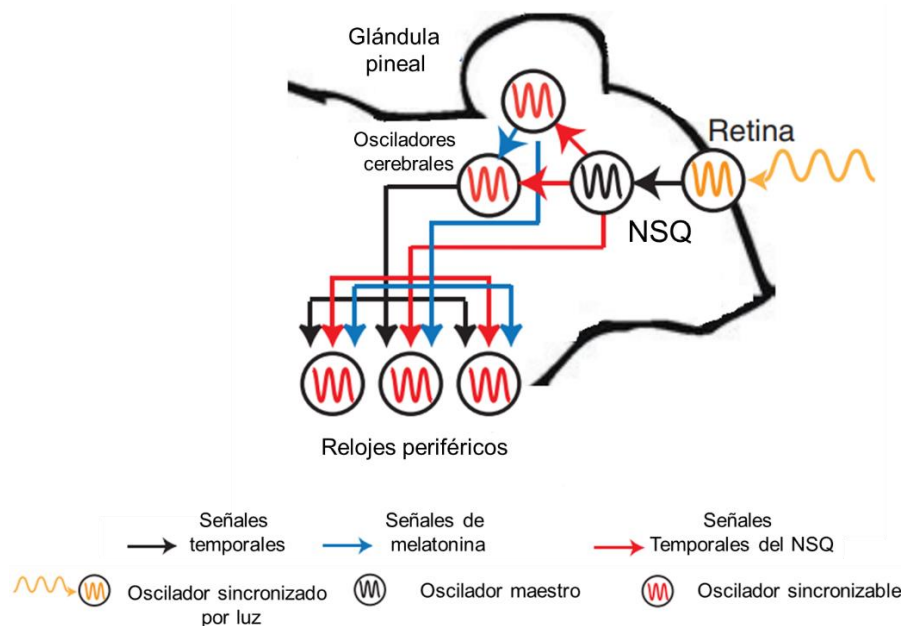


Figura 4: Sistema circadiano en mamíferos. Esquema del sistema circadiano en mamíferos con el NSQ como oscilador maestro sincronizado por los estímulos fóticos captados a través de la retina y coordinando los osciladores periféricos (Modificada de Hastings *et al.*, 2018).

Sincronización fónica

Existen dos modelos propuestos para explicar el mecanismo mediante el cual el reloj circadiano se sincroniza con la luz, estos son el modelo paramétrico y el no paramétrico. El primero propone que el sistema circadiano responde de una manera continua al nivel e intensidad de la luz (la intensidad de la luz como parámetro) lo que ejerce una acción continua sobre la velocidad en la frecuencia de los ritmos; mientras el segundo plantea que pulsos cortos de luz u oscuridad en puntos específicos del ciclo pueden generar cambios de fase, esto es que la respuesta del marcapasos al zeitgeber no es la misma durante toda la oscilación del ciclo (Aschoff 1960, 1999). Ambos modelos funcionan en la práctica, pues según la intensidad de la luz y la fase en la que incide tienen efectos sobre el periodo del oscilador circadiano.

Para estudiar el proceso no paramétrico o discreto se utiliza la curva de respuesta de fases (CRF) (Fig. 5), que es la gráfica del cambio de dirección de la fase inducido por el estímulo por luz en puntos específicos del ciclo (Foster, *et al.*; 2020). La CRF puede ser diferente entre especies, sin embargo, conserva 3 zonas características para todas: la zona insensible o muerta (Fig. 5A), donde no hay respuesta al pulso de luz y ocurre durante el día subjetivo; la zona de retrasos (Fig. 5B), en donde después del pulso de luz la actividad ocurre más tarde y la zona de adelantos (Fig. 5C), en la que el pulso de luz genera un avance de fase de la actividad (Aguilar-Roblero *et al.*, 2015; Ashton, *et al.*, 2022).

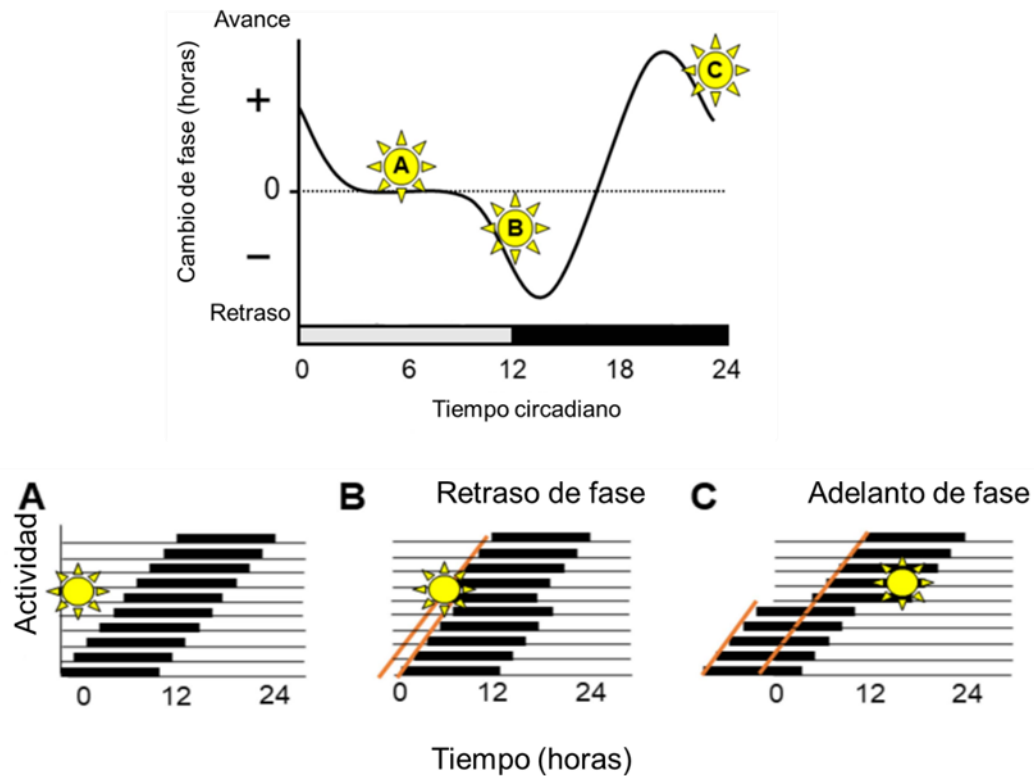


Figura 5: Esquema de curva de respuesta de fase. La CRF muestra el efecto de la exposición a la luz en diferentes puntos temporales del ciclo circadiano. En actogramas de libre curso (A) pulsos de luz durante el día subjetivo no tienen efecto en la fase del reloj (B) pulsos de luz al inicio de la noche subjetiva provoca retrasos en la fase del reloj (C) pulsos de luz al final de la noche subjetiva induce avances de fase. En la gráfica, la barra negra representa el ciclo oscuro o noche subjetiva y la barra blanca el ciclo de luz o día subjetivo. En los actogramas, las barras negras representan períodos de actividad y las líneas negras indican descanso (Modificada de Ashton, *et al.*; 2022).

El NSQ recibe información fótica de proyecciones monosinápticas del TRH que se originan en células ganglionares fotosensibles de la retina (revisado en Buhr, *et al.*, 2013; Madrid, 2013). El estímulo lumínico en el TRH provoca la liberación del neurotransmisor de la adenilato ciclasa de la pituitaria (PACAP) y de glutamato, que actúa a través de sus receptores tipo NMDA y AMPA para despolarizar las neuronas internas del NSQ aumentando su velocidad de activación (Ashton, *et al.*, 2022). Esta interacción intracelular genera una cascada de segundos mensajeros y una entrada de calcio extracelular, seguido por el aumento de la actividad

catalítica de la calmodulina cinasa y óxido nítrico sintasa. A su vez también se activa la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) junto con el adenosín monofosfato cíclico (cAMP), el elemento en respuesta de cAMP (CRE) y las proteínas de unión de CRE (CREB). Estos últimos actuando como factores de transcripción modifican la expresión de los genes *Per1* y *2* entre otros genes reguladores del ciclo circadiano (Aguilar-Roblero *et al.*, 2015; Foster, *et al.*, 2020).

Sincronización no fótica

Además de la entrada de información fótica a través del TRH, el NSQ puede sincronizarse con estímulos no fóticos ya que recibe retroalimentación de órganos periféricos. Esto ocurre por medio de dos vías principales, los factores circulantes, a través de los órganos circunventriculares (CVO), lo que integra la información humoral y mediante la vía de las aferentes vagales y espinales, que integran la información visceral (Buijs, *et al.*, 2019). En la integración de esta información participan la ruta de señalización serotoninérgica del núcleo del rafe dorsal (DRN) y el núcleo del rafe medio (MRN), el sistema GABAérgico del NSQ y la hojuela intergeniculada (Dibner, *et al.*, 2010; Rosenwasser, *et al.*, 2015).

Los osciladores periféricos también pueden ser modulados por estímulos no fóticos a través de mecanismos independientes del NSQ. En mamíferos estas señales son principalmente la ingesta de alimento y la actividad locomotriz, ya que son capaces de provocar un cambio de fase en los osciladores periféricos sin afectar los ritmos del NSQ (Boulos, *et al.*, 1980; Bechtold, *et al.*, 2013).

Numerosas funciones metabólicas y fisiológicas se ajustan a la disponibilidad de recursos, por ello los horarios de alimentación actúan como un zeitgeber para el sistema circadiano. Si el alimento ocurre en una fase restringida del día, por ejemplo, durante la fase de reposo, surge un oscilador sincronizado por el alimento (FEO de las siglas en inglés de Food Entrained Oscillator) independiente del NSQ. Parte de esta sincronización está caracterizada, de manera conductual por un incremento en la actividad locomotriz antes de que se presente el alimento (actividad anticipatoria al alimento, AAA) (Pendergast, *et al.*, 2018; Stephan, *et al.*, 1979).

De igual forma, señales metabólicas y fisiológicas como los niveles de glucosa, GC, de leptina y de grelina en el suero, la secreción de enzimas gástricas y la temperatura corporal, presentan oscilaciones circadianas que robustecen y modulan las señales del FEO (Carneiro, *et al.*, 2009). Este oscilador es capaz de influir o cambiar las relaciones de fase entre los tejidos periféricos, sin embargo, esta señal es más fuerte en animales que han sufrido lesiones en el NSQ o que no están sometidos a un ciclo de luz/oscuridad (LO) (Hara, *et al.*, 2001; Pezuk, *et al.*, 2010), lo que sugiere que a pesar que la llegada de alimento en ciertos horarios repetidos diariamente es un potente sincronizador, el NSQ tiene una influencia inhibitoria sobre el FEO para mantener al organismo sincronizado internamente con el ciclo LO (Angeles-Castellanos, *et al.*, 2010; Stephan, *et al.*, 1979).

De la misma forma, la actividad física es capaz de sincronizar los relojes metabólicos mediante diferentes vías, como la activación del sistema nervioso simpático y el eje hipotálamo-pituitaria-adrenales (HPA) (Mrosovsky, 1996;

Tahara, *et al.*, 2016). La actividad física inducida presenta una respuesta similar al estrés, con un incremento de los niveles de GC y norepinefrina en sangre. Los GC son capaces de promover la expresión de genes involucrados en la maquinaria molecular del reloj circadiano como *Per1*, *Per2* mediante el sitio de unión de su promotor, lo que puede inducir cambios de fase (Cheon, *et al.*, 2013).

Otros estímulos metabólicos como los niveles de glucosa también desempeñan un papel en la regulación del ritmo circadiano molecular en el músculo, ya que este debe anticipar y promover los cambios en la oxidación y captación de glucosa durante el ciclo sueño-vigilia (Dyar, *et al.*, 2014; Gabriel, *et al.*, 2022). Así, el metabolismo de la glucosa sufre alteraciones a lo largo del día y esto tendrá consecuencias en el estado metabólico y el desempeño físico de los músculos (revisado en Healy *et al.*, 2021).

Un zeitgeber para el músculo es la propia contracción muscular, que al aumentar los niveles calcio intracelular desencadena la unión de CREB al promotor de *Per2*, reajustando la expresión oscilante de este gen. Estos cambios mediados por la contracción pueden ocurrir solo durante un periodo específico para cada gen, esto lo hace un zeitgeber relativamente débil en comparación con el ciclo de LO y el alimento (Kemler, *et al.*, 2020; Small, *et al.*, 2020).

Alteración del ciclo natural de iluminación y la desincronización circadiana

Una alteración en la sincronización circadiana consiste en un desajuste entre el tiempo interno de los ritmos fisiológicos y conductuales con el ambiente externo, ya sea por la incapacidad para procesar la información del estímulo o por

conflictos entre éste y el ritmo interno (Golombek, *et al.*, 2013; Reiter, *et al.*, 2012), este desacople de señales puede ocurrir a diferentes niveles organizacionales.

A nivel del organismo completo esta interrupción circadiana puede deberse a un desacople interno, ya sea entre el reloj central y los osciladores periféricos o los relojes de diferentes órganos entre sí. A nivel de tejido, es causada por la desincronización entre las células que lo conforman y a nivel celular ocurre cuando se alteran la fase y/o la amplitud de la expresión de genes reloj u otras alteraciones, que podrían atribuirse al equilibrio redox en células no nucleadas (Henslee, E., *et al.* 2017; Hoyle, N. *et al.*, 2015; revisado en Qian *et al.*, 2016; Vetter 2018).

Los estímulos externos que puedan llevar más fácilmente a la desincronización circadiana dependerán de la historia evolutiva del organismo. En el caso de los mamíferos son los ciclos irregulares de luz, que sincroniza al NSQ, y los ciclos de alimentación que estimula a los osciladores periféricos, desencadenando vías de señalización importantes para la regulación del metabolismo (Evans, *et al.*, 2013; Hardin *et al.*, 2013; Morgado, *et al.*, 2014).

Varias funciones fisiológicas, metabólicas y conductuales están distribuidas a ciertas horas específicas de la fase oscura o de luz para que su función sea más eficiente. Existen varias hormonas como el cortisol y la melatonina que están fuertemente reguladas por los ciclos de luz. La exposición a luz artificial durante la noche puede alterar procesos fisiológicos al suprimir sus ritmos de secreción y síntesis (Hardeland, *et al.*, 2012). Así mismo, se ven alterados los relojes moleculares, donde se afecta directamente la expresión de Per1 y 2 en el núcleo

supraquiasmático y otros genes reloj en tejidos periféricos (Shuboni *et al.*, 2010; Walker *et al.*, 2020). Dado que los genes de reloj circadiano tienen influencia sobre aproximadamente el 20% del genoma, la alteración en los mecanismos moleculares del reloj circadiano tiene consecuencias sobre múltiples procesos fisiológicos a nivel de la célula y por lo tanto de las funciones en tejidos y órganos (Fagiani, *et al.*, 2022). El desajuste entre los estímulos externos y las respuestas internas se han vinculado a condiciones adversas para la salud como aumento de la presión arterial, los lípidos plasmáticos, cambios en la liberación de hormonas reguladoras de la ingesta como la leptina, las orexinas y la grelina, aumento del peso corporal, propensión al desarrollo de distintos tipos de cáncer, obesidad y síndrome metabólico (Cisse, *et al.*, 2017; Filipski, *et al.*, 2005; Golombek, *et al.*, 2013; Reiter, *et al.*, 2012).

Modelos para el estudio de la desincronización circadiana

Actualmente las sociedades humanas modernas buscan extender el tiempo de actividad ante las demandas económicas. Las personas requieren aumentar sus horas de exposición a la luz artificial en patrones cada vez más largos e irregulares; en conjunto con actividades como los trabajos con cambios de turno y el jet-lag social (desfase entre el horario biológico y el social), han propiciado un estado fisiológico que se entiende como una desincronización circadiana generalizada que puede desencadenar severos problemas de salud (Golombek, *et al.*, 2013; Reiter, *et al.*, 2012; Weil, *et al.*, 2020). Por ello, se ha buscado simular estas condiciones en modelos de laboratorio para el estudio de dichas alteraciones.

Dentro de los principales modelos están los tradicionales de jet-lag de adelantos o retrasos de horario, cambios de turno (actividad durante la fase de reposo), luz constante, ciclos de luz distintos a 24 horas, exposición a luz artificial en fase oscura y modelos de manipulación genética o quirúrgicos (Bumgarner, *et al.*, 2021; Evans, *et al.*, 2013). Otros modelos utilizados como los de ingesta de alimento o actividad física, consisten en limitar estas actividades a ciertos horarios específicos a lo largo día, o restringirlas a la fase activa o de reposo del organismo. En el caso del alimento también se pueden modificar sus características nutricionales del y en la actividad física la intensidad de la misma o si es voluntaria o forzada, teniendo todos estos factores interacciones diferentes con el metabolismo (Revisado en Healy, *et al.*, 2021; Kemler, *et al.*, 2020). La duración del protocolo también es un factor importante a considerar, ya que los de corto plazo podrían estar reportando los efectos agudos, mientras los de largo plazo los efectos crónicos.

Los fotoperiodos a los que se someten la mayor parte de la población no son tan extremos como la rotación de turnos o el jet lag y la desincronización circadiana se ve afectada también por diversas condiciones, no únicamente en relación al fotoperiodo, sino a diferentes actividades como la socialización, la ingesta y calidad de alimento o actividades físicas demandantes en horarios poco regulares (Karlsson, *et al.*, 2001).

De igual forma, los factores a medir como consecuencia de dicha desincronización son importantes y dependerán del estímulo que este causando dicho desfase al organismo. Estos factores pueden ser conductuales como lo es la actividad

locomotriz; metabólicos como los niveles de glucosa o cortisol en plasma; o moleculares como la expresión relativa de algún gen controlado por reloj (Barclay *et al.*, 2012; Bumgarner, *et al.*, 2021; Oishi, *et al.*, 2013; Wotus, *et al.*, 2013).

Orexinas, reguladoras de ciclo de sueño-vigilia e ingesta de alimento

Las orexinas son dos neuropéptidos (Orx A y B) sintetizados en neuronas hipotalámicas del área hipotalámico lateral (AHL), que derivan de un polipéptido precursor común, la prepro-orexina (PPO) (Moriguchi, *et al.*, 2002; Sakurai, *et al.*, 1998). Sus receptores, receptor de orexina 1 (OXR1) y receptor de orexina 2 (OXR2) están acoplados a proteínas G y están distribuidos en distintas zonas cerebrales, pero principalmente en el hipotálamo, en donde la expresión del ARNm del OXR1 es más abundante en el núcleo hipotalámico ventromedial (VMH), mientras el ORX2 se expresa mayormente en el PVN (Trivedi, *et al.*, 1998).

Las neuronas orexigénicas tienen proyecciones a varias regiones cerebrales, entre las que destacan el hipotálamo lateral, el núcleo paraventricular, la amígdala, el núcleo arcuato, el núcleo de la estría terminal y el área preóptica (Li, *et al.*, 2020). Estas neuronas participan en mantener el estado de vigilia, en la regulación de ingesta de alimento y en el sistema límbico de recompensas. Estas funciones se definen dependiendo la zona en la que las orexinas o las neuronas orexigénicas actúan y los neurotransmisores con los que interactúan (Goforth, *et al.*, 2016; Sakurai, 2007).

La activación de sistema orexigénico en el estado de vigilia permite que las señales internas y externas se acoplen al ambiente y se genere así un estado robusto y estable. Para mantener la vigilia, las neuronas orexigénicas interactúan generando un asa de retroalimentación donde estas activan las neuronas monoaminérgicas del área preóptica ventrolateral (POVL) y estas envían señales inhibitorias a las neuronas orexigénicas, así como al tálamo, la corteza cerebral y al centro del sueño del POVL. De manera inversa, para mantener el estado de sueño, las neuronas del centro del sueño del POVL, envían señales que inhiben a las neuronas monoaminérgicas y orexigénicas para detener la retroalimentación (Fig.6) (Sakurai T. 2007).

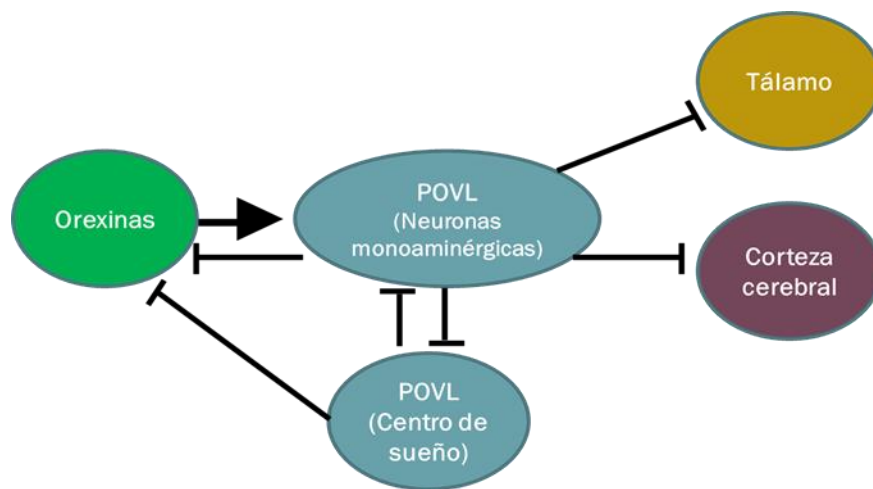


Figura 6: Las neuronas orexigénicas mantienen el estado de vigilia generando un asa de retroalimentación activando las neuronas POVL, que inhiben al tálamo, corteza cerebral y el centro del sueño del POVL. Para mantener el estado de sueño, las neuronas del centro del sueño del POVL inhiben sus neuronas monoaminérgicas y orexinérgicas. Área preóptica ventrolateral (POVL) (modificado de Sakurai, T. 2007).

La participación de las orexinas en la ingesta de alimento está regulada por señales del estado metabólico, como la baja de energía y el hambre (Goforth, *et*

al., 2016). Los neuromoduladores de la ingesta y la regulación del peso corporal como la leptina y el NPY interactúan con las orexinas mediante receptores en las neuronas orexigénicas y dependiendo su concentración pueden generar su activación, como el incremento de NPY, o su inactivación como el aumento de leptina. Otras señales que reportan el estado metabólico, como el nivel de glucosa, pueden generar un incremento en la activación de las orexinas en estados de hipoglucemia, esto con el fin de incrementar el apetito y generar un estado de alerta para que el organismo pueda buscar alimento (Kotz, *et al.*, 2002; Ohno, *et al.*, 2008; Sakurai T. 2007).

Las neuronas orexigénicas también son activadas directamente por el HPA, a través de la hormona liberadora de corticotropinas (CRH). Este vínculo funciona también de manera inversa, ya que las orexinas provocan una inducción de ARNm de c-fos en el PVN, lo que genera un aumento de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) en la hipófisis y de corticosterona (o cortisol en humanos) en suero (Ida, *et al.*, 2000; Kuru, *et al.*, 2000).

Las orexinas además de ser importantes mediadores del estado metabólico tienen también una regulación circadiana por parte del NSQ (Zhang, *et al.*, 2004). Las neuronas orexigénicas del hipotálamo lateral reciben señalización directa del NSQ, mientras que este a su vez tiene receptores de orexinas lo que genera una retroalimentación de información (Belle, *et al.*, 2014). Esta regulación involucra no solo la liberación de las orexinas, si no la producción del ARNm de PPO y los receptores OXR1 y OXR2 (España, *et al.*, 2002; Taheri, *et al.*, 2000). Se ha observado en roedores nocturnos que las PPO tienen un perfil circadiano, donde

su concentración en hipotálamo aumenta durante la fase oscura (activa) y disminuye durante la fase de luz (inactiva) (Justinussen *et al.*, 2015; Taheri *et al.*, 2000). De igual forma el patrón de expresión del receptor OXR2 en la corteza y el hipotálamo tiene una correlación de fase con la expresión del gen de reloj Bmal1, teniendo el pico de expresión al finalizar la fase oscura (Ventzke, *et al.*, 2019).

La luz participa también como un regulador de la actividad orexigénica, ya que durante el día subjetivo el NSQ tiene una salida inhibitoria que suprime otras zonas del cerebro, incluyendo al sistema orexigénico en ratones, cuando su actividad aumenta la inhibición disminuye y se activan las zonas que habían sido suprimidas (Marston, *et al.*, 2008). Debido a esta relación entre el sistema orexigénico y el circadiano, una desincronización podría perturbar la función de ambos sistemas (Sakurai, 2007).

Diversos estudios han demostrado que la interrupción circadiana puede afectar la expresión de los genes de PPO en el cerebro. Por ejemplo, los estudios en roedores han encontrado que la interrupción de los ritmos circadianos puede conducir a una disminución en la expresión de los genes de PPO, lo que puede provocar trastornos del sueño y otros problemas relacionados (España, *et al.*, 2002; Marston, *et al.*, 2008).

En humanos, las personas con trastornos del sueño, como insomnio, narcolepsia y apnea del sueño, a menudo tienen una expresión alterada de los genes de PPO (Peyron, *et al.*, 2000); también se ha demostrado que las interrupciones en su expresión puede contribuir al desarrollo de otras afecciones de salud, como depresión, ansiedad y obesidad por lo que en general, estos estudios sugieren

que el vínculo que existe entre la desincronización circadiana y la expresión de estos genes, puede tener un impacto significativo en el ciclo de sueño y vigilia y la salud metabólica de un individuo (Kang, *et al.*, 2009; Imperatore, *et al.*, 2017; Mieda, *et al.*, 2013; Revisado en Wang *et al.*, 2018).

***Neotomodon alstoni* como modelo para el estudio de la desincronización circadiana**

El ratón de los volcanes, *Neotomodon alstoni* (Fig.7), es una especie nocturna endémica de la faja volcánica transmexicana. Exhibe un perfil estable de actividad nocturna bimodal con pequeños brotes de actividad durante la fase de reposo y presenta los modelos de sincronización paramétrica y no paramétrica a distintos fotoperiodos, además de presentar patrones robustos en sus ciclos circadianos de actividad locomotriz en ausencia de rueda de actividad (Fuentes-Granados *et al.*, 2010). Estudios enfocados en su biología reproductiva mostraron que *N. alstoni* se adapta de manera favorable a las condiciones de cautiverio (Granados *et al.*, 1989; Luis *et al.*, 1990) y pueden llegar a vivir hasta cinco años (Ayala *et al.*, 1998).



Figura 7: Ratón macho delgado (37 gramos) *Neotomodon alstoni*.

Se ha observado que, en cautiverio, parte de la población de *N. alstoni* tiende a desarrollar obesidad con una dieta normocalórica para roedores, mientras que otros organismos no la desarrollan, por lo que se infiere que en la especie existe una propensión genética a dicha condición que se presenta de manera diferencial en la población. Esto ha llevado a que la especie sea objeto de diversos estudios conductuales y fisiológicos, incluyendo los ritmos circadianos de actividad locomotriz y funciones metabólicas dependientes del sexo, del ciclo sueño-vigilia y de señalización neural de la regulación de la ingesta (Carmona *et al.*, 2012; Fuentes-Granados *et al.*, 2012; Vázquez-Martínez *et al.*, 2015; Luna-Illades *et al.*, 2017; Pérez-Mendoza *et al.*, 2017; 2018).

Dentro de las alteraciones que presentan los organismos obesos de *N. alstoni* en comparación con los delgados, se encuentra que son menos eficientes en la resincronización fónica (Miranda-Anaya *et al.*, 2019), que presentan incrementos en los niveles de leptina e insulina, así como trastornos en los perfiles diarios de estas hormonas, lo que puede indicar una posible resistencia a las señales de saciedad, a pesar de que su ingesta no aumente, (Carmona *et al.*, 2012) así como una predisposición a mostrar fluctuaciones en las variaciones día/noche en parámetros de estrés oxidativo en hipotálamo y tejidos periféricos (Vázquez-Martínez *et al.*, 2015). Además, muestran algunos signos de síndrome metabólico, tales como esteatosis hepática, hipertrigliceridemia, intolerancia a la glucosa e hiperleptinemia (Carmona., 2006; Fuentes-Granados., 2011; Báez-Ruíz *et al.*, 2014) y una diferencia importante en las variaciones día/noche en la distribución de los estados de sueño y en la curva de tolerancia a la glucosa (Fuentes-

Granados *et al.*, 2012). Recientemente se ha reportado que la medición indirecta del metabolismo por respirometría y la temperatura corporal presentan patrones diarios disminuidos en los ratones obesos respecto a los delgados, consistente con patrones atenuados de actividad locomotora y actividad en la fase diurna del ciclo LO (Herrera-García *et al.*; 2022). Estos estudios indican que la desincronización circadiana es una condición que podría estar relacionada con el estado de obesidad en esta especie (Arellanes-Licea *et al.*; 2022) y se considera que, como en otras especies, manipular los estímulos externos para inducir desincronización podrían conducir a un estado de obesidad (Barf, *et al.*, 2012; Carmona-Alcocer, *et al.*, 2012; Casiraghi, *et al.*, 2016; Oishi, *et al.*, 2018; Tsai, *et al.*, 2005; 2007; Vilaplana 1995).

Al momento, no existe una estandarización de los protocolos de desincronización, ni de los parámetros metabólicos o conductuales a medir. Por ello, los resultados de dichos estudios resultan contradictorios o específicos para el modelo animal utilizado (revisado en Opperhuizen *et al.*, 2015; Waterhouse, *et al.*, 2003). En este trabajo de tesis se planteó un protocolo que emula desajustes moderados en el horario del fotoperiodo y un modelo que tenga la variabilidad genética para poder tener un panorama amplio de las respuestas a este tipo de estímulos. Así como, dentro de los parámetros a medir están factores tanto conductuales como la actividad locomotriz y el perfil de ingesta de alimento, como metabólicos con la CTG o moleculares como la expresión relativa de ARNm de *Per1*, *Bmal1* y *PPO* en tejido hipotalámico.

Justificación

En un estudio preliminar, se observó que al someter a ratones *N. alstoni* delgados, a fotoperiodos de luz irregular durante cuatro meses, existe una tendencia a presentar patrones de actividad disminuida, similares a los que muestran estos organismos durante la condición de sobrepeso, pero sin llegar a desarrollarla (Guillén, 2021; Ramírez, 2021). Esto podría presentar a *N. alstoni* como un posible modelo para entender las consecuencias de la desincronización fótica moderada y su relación con cambios en la distribución de la actividad locomotriz y la ingesta de alimento.

A nivel molecular, los cambios en la expresión de las PPO hipotalámicas son un candidato para entender los efectos de la exposición a los ciclos irregulares de luz sobre el metabolismo, la conducta de alimentación y el ciclo sueño-vigilia. Si bien los genes de PPO no suelen denominarse genes "controlados por reloj", se sabe que su expresión está regulada por los ritmos circadianos del NSQ. Por lo tanto, su expresión está regulada por el reloj circadiano y la expresión de otros genes controlados por reloj en el cerebro (Belle, *et al.*, 2014; Marston, *et al.*, 2008). Por otra parte, la desincronización circadiana en *N. alstoni* muestra una reducción de la amplitud y el cambio de fase en la expresión relativa diaria de proteínas de la maquinaria molecular del reloj como PER1 y BMAL1 en el hipotálamo, por lo que puede ser un marcador de este estado de desincronización (Arellanes-Licea *et al.*, 2022).

Preguntas de investigación

¿La exposición a un fotoperiodo irregular inducirá un estado de desincronización circadiana en ratones delgados de *N. alstoni*?

¿La desincronización inducida por un fotoperiodo irregular tendrá efecto sobre la distribución circadiana de la actividad locomotriz y la expresión diurna/nocturna de genes de reloj *Per1*, *Bmal1* y de *PPO* en el diencefalo de ratones delgados *N. alstoni*?

Hipótesis

En ratones delgados de *N. alstoni*, la exposición prolongada a un protocolo de fotoperiodo irregular inducirá:

- Aumento en el consumo de alimento y el peso corporal vinculado a menor tolerancia a la glucosa.
- Reducción y mayor dispersión en la cantidad diaria de actividad locomotriz y aumento de ingesta de alimento.
- Atenuación en la expresión diurna/nocturna en genes de *Prepro-orexinas* y genes de reloj circadiano *Per-1* y *Bmal-1* en tejido diencefálico.

Objetivos

Determinar si en ratones delgados *N. alstoni* la exposición a un fotoperiodo irregular durante 3 meses induce desincronización circadiana vinculada a alteraciones en:

- Los patrones en la frecuencia de ingesta de alimento

- La curva de tolerancia a la glucosa.
- La distribución diaria de actividad locomotriz en la foto y escotofase.
- La expresión relativa de genes de PPO, Per1 y Bmal1 en tejido diencefálico, a mitad de la foto y escotofase.

Métodos

Mantenimiento de animales.

Este estudio se llevó a cabo bajo la revisión y aprobación del Comité de Bioética de la UNAM, número de folio PI_2020_01_002. Se utilizaron 24 ratones *N. alstoni* machos, adultos de 13 meses de edad en promedio nacidos y criados en las instalaciones del bioterio de la Facultad de Ciencias, UNAM. Estos se transportaron a la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación (UMDI) en el campus UNAM Juriquilla, donde se habituaron durante 14 días en un cuarto con un fotoperiodo artificial de LO 12:12 h y una temperatura regulada entre 21-24°C. Se alimentaron con una dieta comercial de alimento para roedores de laboratorio Rodent Lab Chow 5001, Purina® Inc., MO, USA (Purina 5001) y agua potable a libre acceso (*ad libitum*).

Curva de tolerancia a la glucosa

Una vez habituados al fotoperiodo LO 12:12 h, en un día definido los animales se colocaron en ayuno de 4 h a partir del inicio de la fotofase y se les realizó una curva de tolerancia a la glucosa (CTG) como criterio de selección, solo se tomaron los animales normo glucémicos en la condición inicial del experimento; así mismo se realizó otra prueba a los mismos animales una vez finalizado el protocolo de fotoperiodo irregular (CTG final). A cada individuo se le inyectó vía intraperitoneal

200 µl de solución de glucosa al 50% y se midió la glucosa en una muestra de sangre utilizando un kit comercial (Accucheck instant kit). Se midió la glucosa basal, 5 min previo a la inyección de glucosa, y cada 30 minutos a partir de la inyección de glucosa hasta cumplir los 120 minutos. Las muestras de sangre fueron colectadas de un corte en la cola de animales.

Protocolo de fotoperiodo irregular.

Se colocaron individualmente ratones en cajas de acrílico y se acomodaron 14 cajas dentro de una cámara de ambiente controlado (ADAPTIS 1000, CONVIRON). Durante 2 semanas los ratones permanecieron de manera diaria con un fotoperiodo LO 12:12 h con el encendido de las luces a las 6:00 h y el apagado a las 18:00 h. Posteriormente, el fotoperiodo se modificó al experimental de tal manera que el encendido de la luz presentaba un retraso de 2 horas por día, durante 4 días (lunes, martes, miércoles y jueves) y un adelanto de 2 horas por día, durante 3 días (viernes, sábado y domingo) (Tabla 1, Fig. 8), repitiéndose ese patrón cada semana durante 3 meses..

Un grupo control externo de 12 ratones permaneció fuera de la cámara de ambiente controlado, pero en una habitación con condiciones similares: en cajas individuales de acrílico transparente, con condiciones de fotoperiodo LO 12:12 h y una temperatura regulada entre 21-24°C durante los 3 meses que duró el experimento de fotoperiodo irregular.

	Fase luminosa	Fase oscura
Lunes	06:00	18:00
Martes	08:00	20:00
Miercoles	10:00	22:00
Jueves	12:00	00:00
Viernes	06:00	18:00
Sábado	04:00	16:00
Domingo	02:00	14:00

Tabla 1: Calendarización del encendido y apagado de las luces a lo largo de la semana.

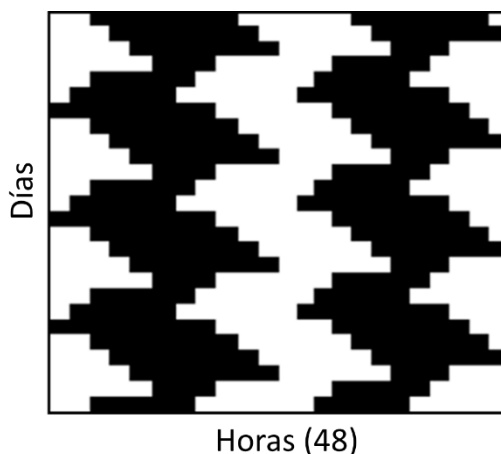


Figura 8: Representación gráfica de 48 horas, del encendido y apagado de las luces durante el protocolo de fotoperiodo irregular, que corresponde a los datos de la Tabla 1. Las barras negras representan las horas de luz artificial y las blancas, de oscuridad.

Registro de actividad locomotriz y consumo de alimento.

Para el registro individual de la actividad locomotriz se colocó un sensor infrarrojo a la mitad lateral de la caja para detectar el cruce del ratón en movimiento. Estos sensores contabilizaban y sumaban el paso del animal cada 10 minutos, las 24 horas del día durante 4 meses (partiendo del mes 0). Esta información se registró mediante el programa ACTIBIO (Fac. Psicología, URIDES, UNAM) y se graficó mediante actogramas con el programa ActiView (minimiter, Co Inc., USA). Los

datos fueron analizados mediante hojas de cálculo Excel. El análisis estadístico se hizo con el software Graphpad Prisma.

Para la determinación del consumo de alimento se usaron brochetas armadas con pellets de alimento comercial de roedor (Purina 5001). Las brochetas se pesaron antes y después de las 24 y 48 horas de exposición a los animales, en distintas fases del experimento: antes, durante y al finalizar el tiempo de exposición al protocolo de fotoperiodo irregular.

Así mismo, se realizaron grabaciones de video digital para registrar la conducta individual de los animales durante la medición de consumo de alimento. En la revisión de videos se analizó en qué horarios se realizaba la ingesta, y se contabilizó el número de eventos y duración de los mismos durante un ciclo completo de LO.

Obtención de los tejidos.

Una vez terminado el protocolo de fotoperiodo irregular, a los ratones del grupo experimental y del grupo control se les practicó eutanasia por decapitación en 2 horarios distintos: uno a la mitad de la fase diurna (ZT6) y otro a la mitad de la fase nocturna (ZT18). Se hizo la disección del diencefalo: el hipotálamo y la parte basal del tálamo de acuerdo con Pérez-Mendoza *et al.*, 2017 y se mantuvieron a -80°C hasta que fueron procesados.

Extracción de ARN total y síntesis de ADNc.

Utilizando el tejido del diencefalo de cada individuo, experimental y control, se extrajo el ARN total utilizando el protocolo del TRIzol Reagent (Invitrogen,

Carlsbad, CA, USA) con modificaciones (Ortiz-Dosal *et al.*, 2020). Se realizó la cuantificación de ARN mediante espectrofotometría, para corroborar su pureza y se procesó en geles de agarosa para comprobar su calidad. Posteriormente se hizo la síntesis de cDNA usando el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Este cDNA se almacenó a -20°C hasta su procesamiento.

RT-qPCR.

Dado a que no existe secuenciación del genoma de *Neotomodon alstoni*, se diseñaron los oligonucleótidos para PPO, Bmal1 y Per1 utilizando las secuencias de *Peromyscus maniculatus* (taxid: 10040) reportados en la literatura (NCBI GenBank Nucleotide, Lau *et al.*, 2017), dada la cercanía filogenética (Diniz *et al.*; 2017). Como genes de referencia se utilizaron GAPDH, 12S ARN ribosomal y B-actina, y mediante el algoritmo NormFinder se determinó que la mejor combinación de dos genes con el coeficiente de variación del ciclo de cuantificación (Cq) más bajo eran GAPDH y B-actina. La expresión relativa de los ARNm se determinó utilizando los genes de referencia para calcular su media geométrica y el método delta Ct (ΔCt) (Livak *et al.*, 2001; Vandesompele *et al.* 2002).

Se usó un termociclador de Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, con la mezcla de reacción basada en SYBR® Green fue KAPA SYBR® FAST qPCR, Master Mix (2X) Kit (KAPA BIOSYSTEMS).

Nombre del oligonucleótido	Secuencia 5' - 3'	Temperatura de alineación	Tamaño
GAPDH	FORWARD: CTACCCCAATGTGTCGGTC REVERSE: TGAAGTCGCAGGAGACAACC	61° C	153 pb
b-actina	FORWARD: GTGGCGTCCTATAAAACCCG REVERSE: CATCCATGGCGAACTGGTG	61° C	126 pb
Per1	FORWARD: CCATTCTGATGACCCACTCTTC REVERSE: CCCACCTTGTTCTTCTCCTC	61° C	214 pb
Bmal1	FORWARD: CATCCCACTGTTCCAGGCAT REVERSE: GCGATGACCCTTATCCTGT	61° C	109 pb
Prepro-orexina A y B	FORWARD: CACAGTCGAAGACCGCCTCA REVERSE: CGGCCAGGGAACCTTTGTAG	64° C	129 pb

Tabla 2: Secuencias de oligonucleótidos utilizadas para PCR de *Peromyscus maniculatus* (taxid: 10040) (NCBI GenBank Nucleotide).

Análisis estadístico

En todos los análisis se tomó el control interno como los registros de los animales durante el fotoperiodo regular LO 12:12 h previo al protocolo de desincronización. Para la CTG, se comparó los resultados en cada tiempo de muestreo mediante una prueba estadística de t-Student entre la condición control con la final. Se calculó el área bajo la curva y se comparó entre grupos con una prueba t-Student. Para cuantificar la actividad locomotriz se tomaron 3 días de registro en que no existiera intervención o cambio súbito de horario de fotoperiodo en cada mes del experimento y se cuantificó el total de actividad durante la foto y escotofase; también se comparó con la condición control utilizando una prueba de Friedman. Para analizar los ritmos ultradianos de los perfiles de actividad se utilizó el

periodograma de Lomb Scargle mediante el paquete ImageJ–ActoJ. El consumo de alimento total durante 24 horas se comparó entre grupos utilizando una prueba ANOVA de una vía. Para el perfil de consumo se comparó la fase nocturna con la fase diurna en la condición control y final del protocolo, mediante una prueba t-Student.

En los análisis moleculares, se analizaron los Cq con la prueba ΔCt para obtener la expresión relativa de los genes de Per1, Bmal1 y PPO en tejido cerebral. La expresión relativa de los genes se comparó mediante una prueba t-Student entre los animales experimentales y los controles externos al concluir el protocolo. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism versión 8.0.0 para Windows.

Resultados y discusión

Peso corporal y consumo de alimento

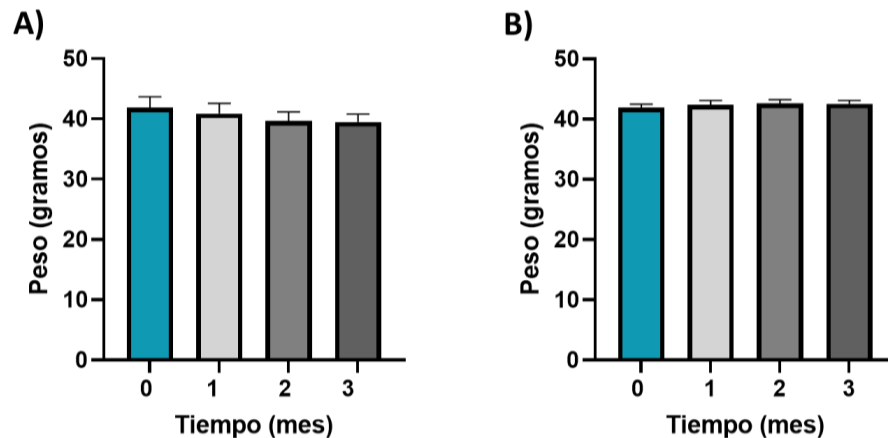


Figura 9: Promedio \pm EE del peso corporal a lo largo del experimento. A) Ratones de control externo, dentro del protocolo de fotoperiodo regular LO 12: 12 h. y B) ratones de control externo, con un fotoperiodo LO.

El peso corporal de los animales se registró una vez por semana durante todo el protocolo. Para el análisis estadístico se tomaron medidas para cada mes y se compararon con la condición de control interno (tiempo 0). Esto se llevó a cabo tanto para el grupo control externo (Fig. 9-A) como para los animales experimentales (Fig. 9-B). No hubo diferencias en ninguno de los grupos y su variación por mes no fue significativa, indicando que la exposición en 3 meses que duró el experimento a un fotoperiodo irregular no tiene efecto sobre el peso corporal. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Herrero *et al.*, 2015, quienes expusieron a ratas a 3 protocolos de cambios en el fotoperiodo, utilizando avances, retrasos y un protocolo mixto. El peso corporal de las ratas no se modificó, sin embargo, tampoco lo hizo su actividad locomotriz ni el consumo de alimento, por lo que sus resultados son de esperarse ya que no se generó un desbalance energético (Hall, *et al.*, 2012; Herrero, *et al.*, 2015).

En otros protocolos experimentales que consisten en cambios en el horario del fotoperiodo o la presencia de luz tenue en la fase de descanso, los resultados suelen relacionarse no solo con el cambio de iluminación, sino con la disponibilidad y composición del alimento (Bartol-Munier, *et al.*, 2005; Karatsoreos, *et al.*, 2011; Oishi, *et al.*, 2013). La gran mayoría de estos protocolos consisten en modificar la duración de la fotofase o presentar cambios repetitivos en el ciclo LO. En el protocolo del presente trabajo se hicieron estas dos modificaciones en el fotoperiodo de manera sutil, lo que nos permitió evaluar tanto las consecuencias del cambio de fotoperiodo sobre los patrones de actividad locomotriz, como en el consumo de alimento.

La ingesta de alimento en 24 horas se registró con la diferencia del peso de las brochetas de pellets. Se colectaron datos de ingesta una vez por mes para el grupo experimental y se compararon con los datos de consumo con la condición control inicial (tiempo 0) (Fig.10). Los análisis estadísticos mostraron una disminución significativa en el consumo de alimento en el segundo mes del protocolo de fotoperiodo irregular, sin embargo, esta diferencia se perdió en el tercer mes.

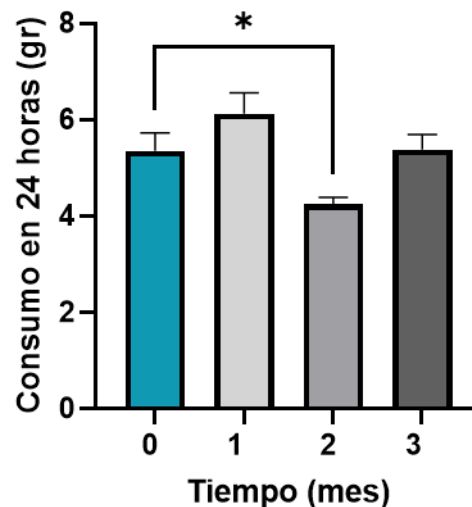


Figura 10: Consumo total en gramos de alimento durante 24 horas. El tiempo 0 corresponde al fotoperiodo control LO 12:12 y los meses posteriores al inicio del fotoperiodo irregular. Diferencias significativas de la prueba de ANOVA de una vía (* $p < 0.05$).

Además, se realizaron grabaciones de video a los animales cuando se registró el consumo de alimento en brocheta durante 24 horas en la condición control interna y la final, con ello se generó un perfil de ingesta que se muestra en la Fig.11. Para ello se graficó el número de eventos cada 10 minutos en los que los animales se acercaban a comer y se separaron en la escotofase y en la fotofase. El análisis

estadístico no mostró diferencias en la escotofase (Fig. 12-A), pero si un aumento de eventos en la fotofase para la condición experimental (Fig. 12-B).

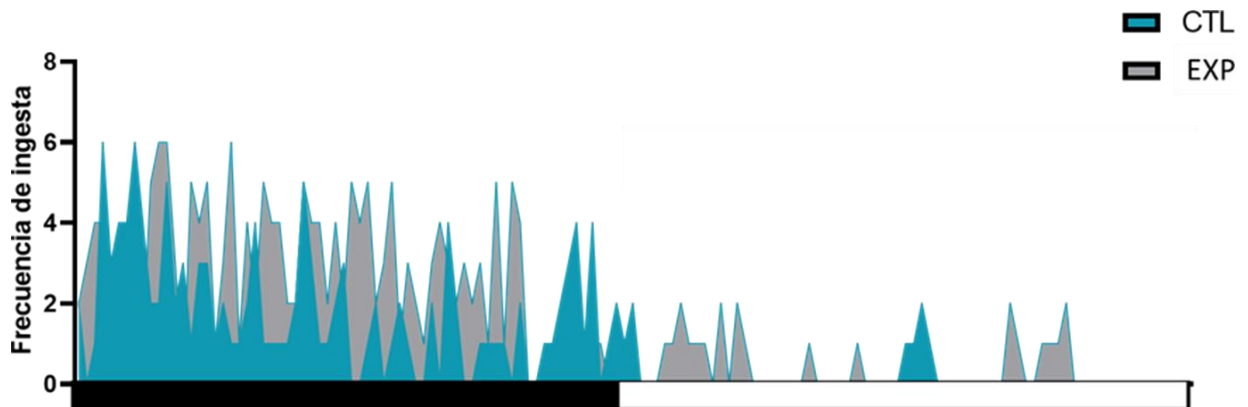


Figura 11: Perfil de consumo de alimento durante 24 horas. Sumatoria del número de eventos cada 10 minutos. Para la condición control (tiempo 0) se usaron 6 animales y para la experimental (tiempo 3) se usaron 8 animales. La barra inferior representa la fase de actividad con la barra oscura y la de reposo con la barra blanca.

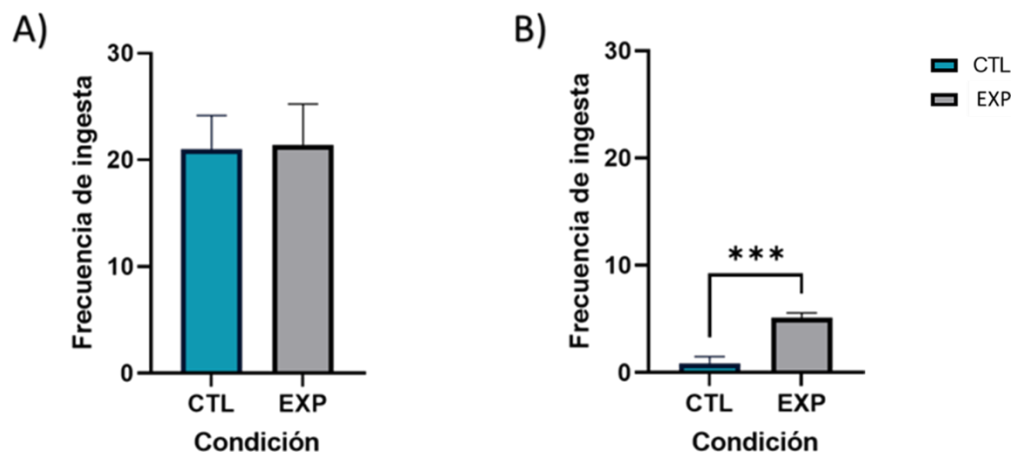


Figura 12: Gráfica de frecuencia de consumo durante 24 horas. A) Número de eventos presentes en la escotofase. B) Número de eventos presentes en la fotofase. Barras de error estándar. Diferencias significativas de la prueba de t-Student (***) $p > 0.0005$.

Los resultados del total de consumo coinciden con otros trabajos de ratas y ratones alimentados *ad libitum* con dieta normocalórica, donde su consumo de alimento era principalmente en la fase de actividad y no se modificó a lo largo de

las semanas que duraron los experimentos (Salgado-Delgado, et al., 2010; Trebucq, et al., 2023; Voigt, et al., 2014). Sin embargo, el perfil de ingesta obtenido no coincide con otros trabajos en que el peso corporal aumenta por el consumo de alimento en la fase de descanso, lo que facilita una condición de obesidad en los roedores (Fonken, et al. 2010; Garaulet, et al., 2013, 2014). En el trabajo de Salgado-Delgado, et al, 2010 se plantea que restringir el alimento a la fase activa de ratas previene la obesidad generada por la actividad y alimentación durante la fase de descanso (Salgado-Delgado, et al., 2010).

Los efectos de la ingesta calórica sobre el peso corporal varían dependiendo de la fase del día en que esta ocurra. El consumo de alimento en la fase de reposo puede alterar la sincronización entre el reloj central y los periféricos, generando alteraciones metabólicas y un desbalance en la homeostasis energética (Garaulet, et al., 2014). Así mismo, influye directamente en la expresión de genes reloj en el tejido adiposo y puede alterar su patrón diario de acumulación o movilización de grasa (Ptitsyn et al., 2006). Los animales que comen durante su fase de reposo tienden a consumir más alimento y disminuir su actividad locomotriz total y por ende su gasto de energía, lo que podría desencadenar el aumento de peso corporal (Arble, D. M. et al., 2009).

En los ratones experimentales expuestos al protocolo de desincronización, el aumento del consumo de alimento en la fotofase demuestra que el protocolo de fotoperiodo irregular no afectó la cantidad de consumo total, pero sí llevó a los animales a desfragmentar su perfil de ingesta sin tener impacto en el peso

corporal. A pesar de la modificación al perfil de ingesta, el mayor consumo seguía siendo en la fase activa (escotofase).

Curva de tolerancia a la glucosa

De las CTG obtenidas antes y después de la exposición al fotoperiodo irregular, se compararon las unidades relativas calculadas para del área bajo la curva mediante el estadístico Wilcoxon. No se observaron diferencias significativas entre los resultados de las dos condiciones (Fig. 13-A). Sin embargo, con la misma prueba estadística se comparó cada punto de tiempo entre la CTG inicial y final y se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) para el minuto 60 de la curva, siendo esta mayor en los animales control (Fig. 13- B). Esto nos dice que al finalizar el experimento los animales sometidos al protocolo de fotoperiodo irregular tuvieron un mejor manejo de la glucosa.

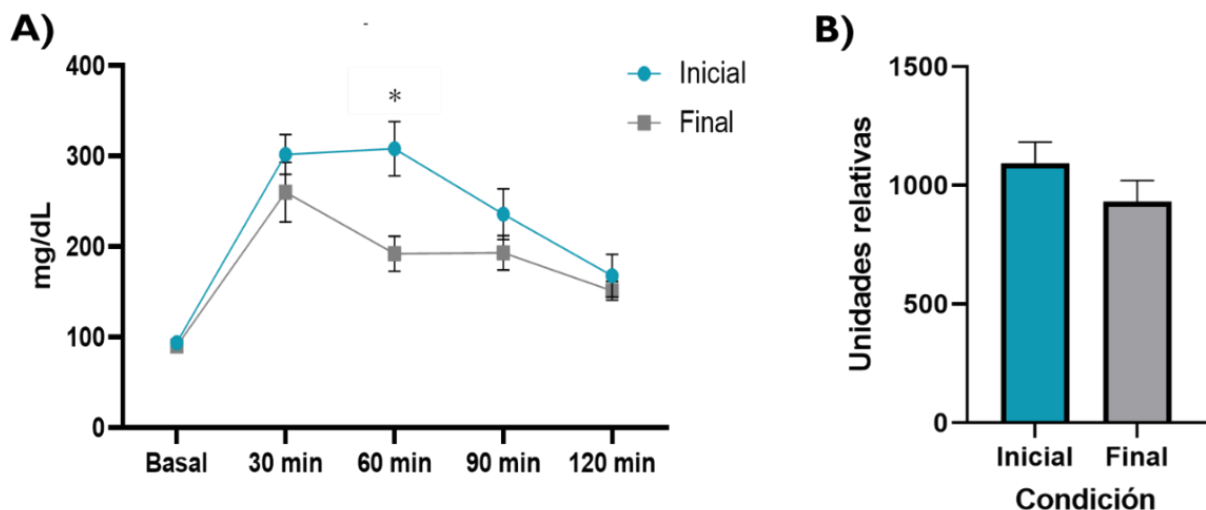


Figura 13: A) Perfil promedio de la CTG en la condición inicial (fotoperiodo control LO 12:12) y final (fotoperiodo irregular). B) Análisis de unidades relativas del área bajo la curva de la curva de tolerancia a la glucosa en condición inicial y final. Barras de error estándar. Diferencias significativas de la prueba de t-Student ($*p > 0.05$).

Los reportes del metabolismo de la glucosa en la literatura para los protocolos con fotoperiodos irregulares son contradictorios. Oishi, *et al.*, (2003), presentaron un protocolo con un fotoperiodo LO 3:3 h, donde reporto que el metabolismo de la glucosa puede verse alterado sin que los animales aumenten su peso corporal ni modifiquen su ingesta de alimento, lo que concuerda con nuestros resultados. Sin embargo, Gale *at al.*, 2011, reportaron que un protocolo de 10 semanas con avances en el fotoperiodo no es suficiente para generar cambios en el metabolismo de glucosa de ratas, así como Karatsoreos, *et al.*, 2011 reportaron un aumento en la resistencia a la insulina junto con un aumento en el peso corporal. Estas contradicciones pueden deberse no solo a las diferencias en el diseño de los fotoperiodos, si no a las diferencias biológicas de cada modelo en específico (Gale *at al.*, 2011; Karatsoreos, *et al.*, 2011; Opperhuizen *et al.*, 2015). De igual forma, los resultados obtenidos en este trabajo pueden deberse a que los efectos generados por el fotoperiodo irregular afectaron a los órganos periféricos de manera distinta y el punto temporal donde realizamos la CTG en la condición final no corresponde a la misma fase de tiempo circadiano en la que se encontraban estos animales en la condición inicial. Además que es esta mejora en la movilización de la glucosa podría deberse a un aumento en la insulina circulante que podría desencadenar una condición de resistencia.

Registro de la actividad locomotora

De la misma forma que para los otros parámetros, se tomó como el control interno los registros de los animales durante el periodo previo al inicio del protocolo de fotoperiodo irregular en LO 12:12 h. Para el análisis de los datos de la actividad locomotora, se tomaron 3 días durante el periodo de la semana correspondiente a los retrasos (martes, miércoles y jueves), en los cuales no hubo intervención humana en la cámara de ambiente controlado o cambio en la dirección del fotoperiodo y esto se realizó una vez para cada mes de exposición al protocolo de fotoperiodo irregular. Posteriormente, estos datos se separaron en fotofase y escotofase y se comparó el promedio mediante la prueba de Friedman. En el análisis estadístico se demostró la disminución en la magnitud de la actividad en la escotofase entre la observada en la condición control y la obtenida para el segundo y tercer mes del protocolo (Fig.14-A), así como disminuciones significativas para la actividad en fotofase entre la condición control y el primer y tercer mes del protocolo (Fig. 14-B).

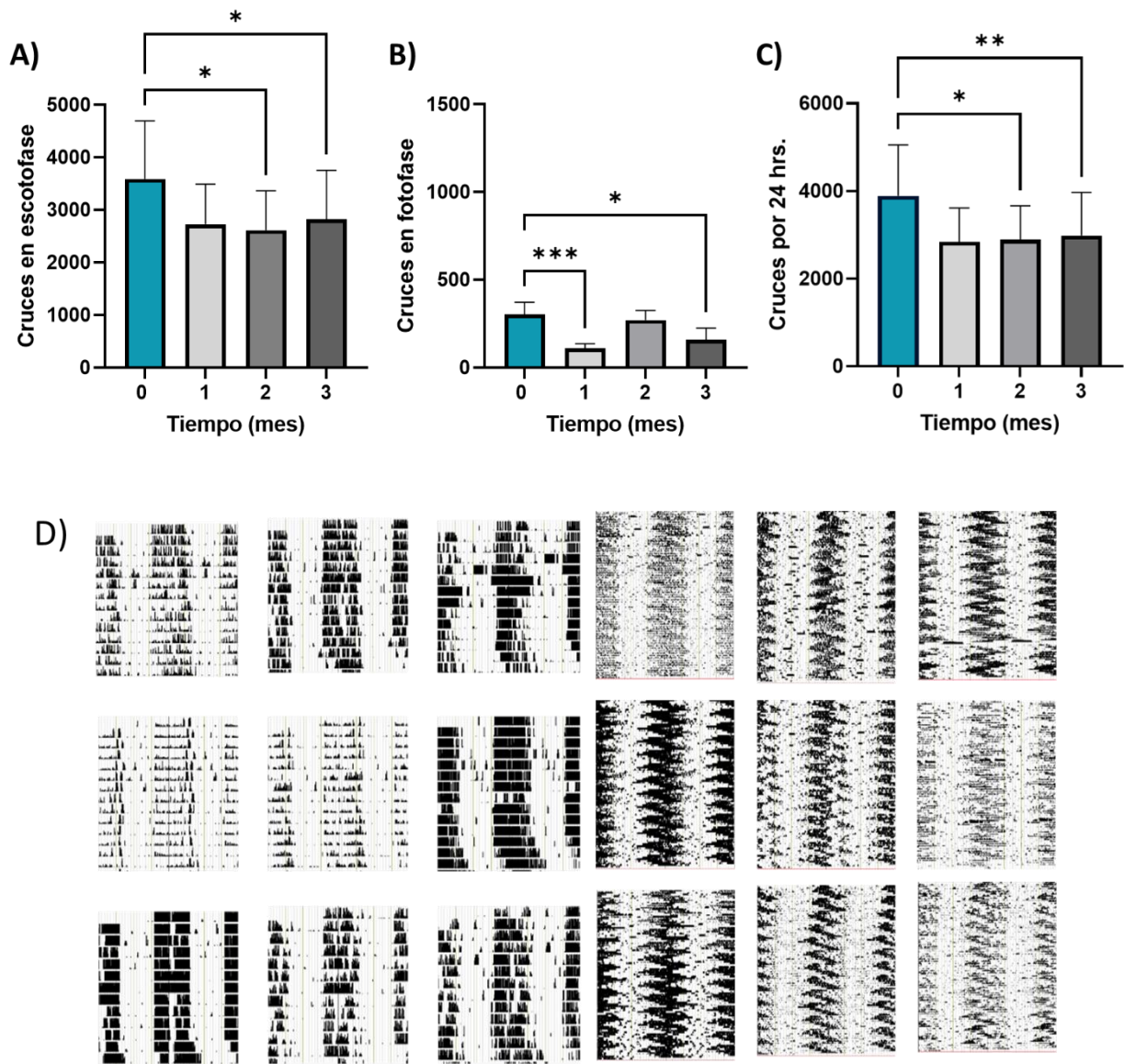


Figura 14: Promedio de eventos de actividad locomotriz (cruces del ratón por el sensor). A) Promedio de la actividad durante la escotofase en la condición control (LO 12:12) y cada mes durante el protocolo de fotoperiodo irregular, B) promedio durante la fotofase, C) promedio de la actividad total durante 24 horas y D) actogramas de 9 individuos en la condición control (izquierdo) y durante el protocolo de fotoperiodo irregular (derecha). Barras de error estándar. Diferencias significativas de la prueba de Friedman (* $p > 0.05$, *** $p > 0.0005$).

Se realizó el mismo análisis para la actividad del grupo control externo en LO 12:12 h. El estadístico no mostro ninguna diferencia significativa entre las dos fases del fotoperiodo (Fig.15), lo que descarta posibles diferencias debidas al envejecimiento de los organismos en los tiempos planteados en este estudio.

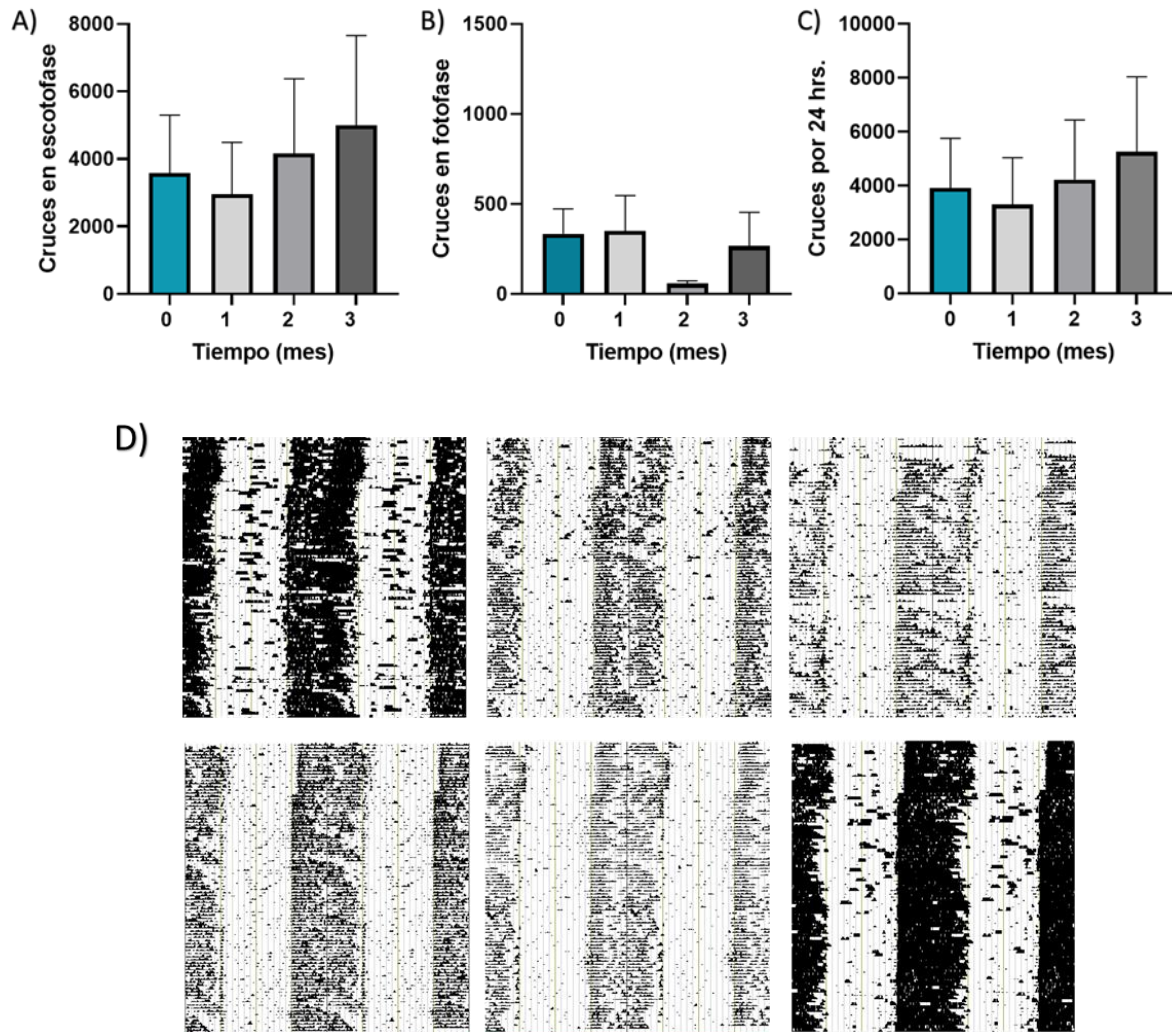


Figura 15: Análisis del registro de actividad (cruces del ratón por el sensor) de 3 días en el grupo control externo. A) Promedio de actividad durante la escotofase en la condición control (LO 12:12) cada mes, durante 3 meses. B) promedio de actividad durante la fotofase, C) promedio de la actividad total durante 24 horas y c) actogramas de 6 individuos del grupo control externo. Barras de error estándar.

Nuestros resultados coinciden con otros estudios que han reportado la disminución en la actividad locomotriz total de los organismos en protocolos de actividad forzada o fotoperiodos irregulares (Bartol-Munier, *et al.*, 2005; Barclay, *et al.*, 2012; Tsai, *et al.*, 2005). En nuestro experimento, la disminución de la actividad locomotora, tanto en la fotofase como en la escotofase en respuesta al

protocolo de fotoperiodo irregular no está relacionada con la edad, ya que nuestro control externo no presentó disminución en el total de la actividad. La disminución observada podría deberse a la desincronización interna de los organismos por el protocolo, ya que moléculas como las orexinas que tienen una regulación fótica y participan en el mantenimiento de la vigilia, podrían estar siendo reguladas a la baja o no coincidir con sus ciclos metabólicos generando un desfase que lleve al organismo a modificar la intensidad de su actividad (Marston, *et al.*, 2008; Vanitallie, 2006).

Utilizando los actogramas de los animales en condición control y al finalizar el protocolo, se realizó un análisis de componentes ultradianos mediante la discriminación de frecuencias ultradianas (12 h de duración de los ciclos o menos) de brotes de actividad bajo el análisis del periodograma de Lomb Scargle. Se hicieron categorías de frecuencias por hora (Fig. 16). Se observa que hay menor frecuencia de los componentes ultradianos en la condición experimental (barras grises), ello puede ser interpretado como si el fotoperiodo irregular diera lugar a una consolidación de los ritmos circadianos (Fig.16). Dado que los animales lograron ajustarse a los cambios en el horario de iluminación, restringiendo más su actividad en la escotofase se redujo la dispersión de otros componentes hacia la fotofase, lo que es consistente con los resultados de la figura 12.

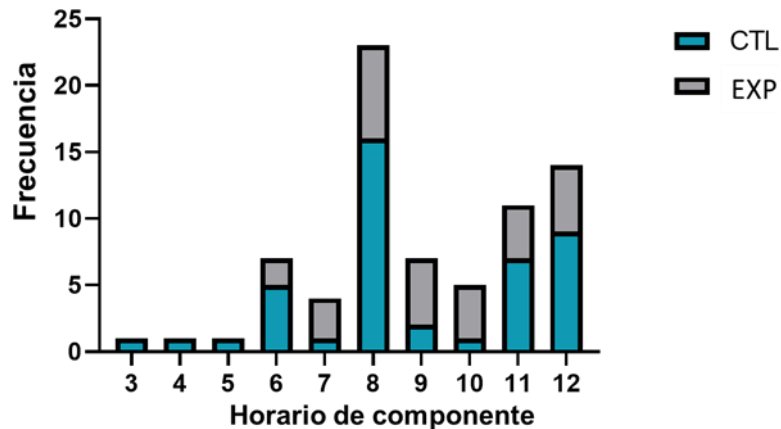


Figura 16: Frecuencia de componentes ultradianos obtenidos por el periodograma de lomb scargle por horario entre la condición control y la experimental.

Esta disminución de actividad se presenta también en roedores sometidos a protocolos que modifican los ciclos de LO, principalmente cambios de turno y jet-lag. No obstante, regularmente vienen acompañadas con el aumento en el peso corporal y consumo de alimento, resultados que no se obtuvieron en este trabajo (Bartol-Munier, *et al.*, 2005; Hsieh, *et al.*, 2014; Tsai, *et al.*, 2005). Estas diferencias pueden deberse a que el protocolo de fotoperiodo irregular implementado en el presente trabajo es más sutil, buscando asemejar un horario con desajustes moderados similar al que se presenta en las sociedades modernas. Sin embargo, la distribución ultradiana de la actividad no se refleja en la distribución de episodios de ingesta, posiblemente porque los animales reducían la actividad ambulatoria permaneciendo más tiempo cerca del comedero y no cruzaban los sensores infrarrojos.

Expresión génica

La expresión relativa de los genes PPO, Per1 y Bmal1 en tejido diencefálico, se obtuvo analizando los Cq con la prueba ΔCt y esta se comparó entre controles externos y la condición experimental, en horario diurno (ZT6) y nocturno (ZT18). La comparación entre grupos en la expresión de ARNm de las PPO no mostro diferencias, ni entre condición ni entre horarios (Fig.17-A). Estos resultados pueden deberse a que solo se tomaron dos puntos temporales, ya que el pico de expresión de ARNm de PPO en otros roedores como ratones o ratas comienza al inicio de la fase nocturna y esta decae al inicio de la fase diurna, por lo que las muestras de mitad del día y mitad de la noche podrían no ser los puntos de máxima y mínima expresión, respectivamente (Justinussen *et al.*, 2015; Taheri *et al.*, 2000). Además, esta regulación circadiana no se da únicamente a nivel de las PPO, si no que ocurre con los receptores OXR1 y OXR2, así como en la traducción al péptido orexina A y B, que pueden tener funciones específicas dependiendo la zona del cerebro donde se esté llevando la interacción, por lo que el efecto provocado por el fotoperiodo irregular pudo darse a diferentes niveles de esta regulación (Bourgin, P. *et al.*, 2000; Chen, L. *et al.*, 2010; Ventzke, *et al.*, 2019).

La regulación circadiana de las PPO las convierte en un biomarcador circadiano, sin embargo, es necesario que en el diseño experimental se tomen muestras para generar un perfil de 24 h, ya que con solo dos puntos de tiempo no se puede observar si existe un desfase o una atenuación en la expresión relativa. Esto

debido a que el sistema circadiano no es el único que las regula y esto ocurre a diferentes niveles (Marston, *et al.*, 2008; Sakurai, 2005).

De igual forma el sistema circadiano no es el único que participa en la regulación del sistema de orexinas, sino que estas responden también a estímulos metabólicos, lo que le brinda un amortiguamiento para su buen funcionamiento (Sakurai, *et al.*, 1998; Vanitallie, 2006; Yamanaka *et al.*, 2003). El perfil de ingesta de alimento obtenido en este trabajo mostró una fragmentación del consumo y un aumento en la fase diurna, lo que podría estar relacionado con un desfase en las señales metabólicas como la leptina y el NPY, que son entradas importantes para el sistema orexigénico (Ohno, *et al.*, 2008; Williams, *et al.*, 2001). Esto también podría explicar por qué en los animales experimentales no obtuvimos diferencia entre el horario diurno y nocturno, así como la variación dentro del mismo grupo.

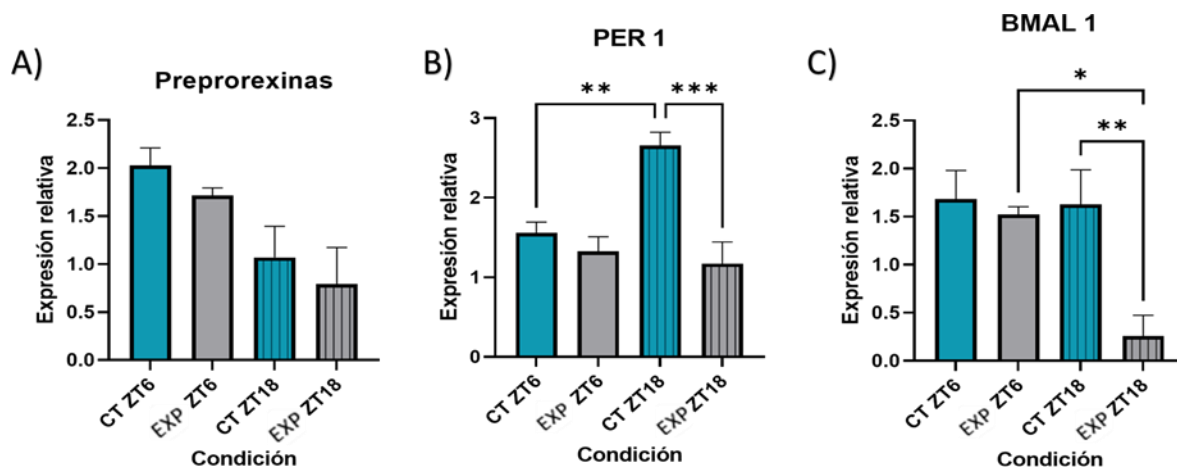


Figura 17: Expresión relativa del gen de A) Prepro-orexinas B) Per1 y C) Bmal1 en diencefalo. En color azul los animales control y gris los animales experimentales. En liso el horario diurno (ZT6) y rayado el nocturno (ZT18). Barras de error estándar. Diferencias significativas de la prueba de t-Student (* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$).

A diferencia de las PPO, se observaron diferencias significativas en la expresión relativa de los genes Per1 y Bmal1 (Fig. 17 B y C). En el grupo control, la

expresión de *Per1* es mayor en ZT18 que en ZT6; mientras que esta diferencia se pierde en el grupo experimental. También existe diferencia entre grupos al ZT18, donde el grupo experimental reduce la expresión relativa de *Per1*. Por otra parte, en el grupo control no se observó diferencia entre ZT6 y ZT18 en la expresión relativa de *BMAL1*, pero si entre control y experimental al ZT18 en tejido diencefálico.

Estos resultados no coinciden con lo reportado en protocolos de fotoperiodo irregular como la privación de sueño o estresores crónicos, que presentan diferencias en la expresión de los genes que participan en el asa molecular del reloj circadiano, con el aumento en *Per1* por su regulación a la alta por glucocorticoides (Christiansen, *et al.*, 2016; Tahara, *et al.*, 2016; Wisor, *et al.*, 2008), sin embargo las diferencias en *Bmal1* con cambios de fase por su interacción con el asa de retroalimentación negativa del reloj indica que esta alterada la temporalidad de la expresión de genes de reloj en el tejido hipotalámico y que parte de estas diferencias podrían estar relacionadas a una condición de estrés generada por el protocolo de fotoperiodo irregular.

En otro conjunto de resultados obtenidos en ratones *N. alstoni* obesos (Arellanes-Licea, *et al.*, 2021), la expresión de las proteínas de *PER1* y *BMAL1* en el hipotálamo estaba disminuida y fuera de fase, en comparación con los organismos delgados. En este trabajo dicha disminución solo ocurrió en el horario nocturno, lo que podría significar también que los animales experimentales usados en este trabajo están fuera de fase, sin embargo, con solo dos puntos temporales de muestreo no es posible ver si su expresión cíclica general esta atenuada.

Otro de los resultados obtenidos en este trabajo es la disminución de actividad locomotriz, que en conjunto con el perfil de ingesta fragmentado y la disminución de expresión relativa de genes reloj asemeja características reportadas para la condición de obesidad de estos organismos (Arellanes-Licea, *et al.*, 2021; Luna-Illades *et al.* 2017; Miranda-Anaya *et al.* 2019; Pérez-Mendoza *et al.* 2017). Sin embargo, en este trabajo no se observó aumento del peso corporal ni diferencias en la ingesta total de alimento. Esto podría significar que, a pesar que el protocolo de fotoperiodo irregular utilizado en este trabajo generó un estado de desincronización circadiana interna, que se refleja en la fase de genes de reloj en el diencefalo y de manera conductual en la actividad locomotriz e ingesta de alimento, existen mecanismos de amortiguamiento que permiten que el estado metabólico de los ratones permanezca ajustado. Posiblemente ante una condición adicional, como la calidad de la dieta, esta resiliencia mostrada en los ratones estudiados se rompa y se muestren efectos sumados de la desincronización y el efecto obesogénico de otras variables.

Debido a la duración del protocolo, estos resultados corresponden a una exposición crónica (Panagiotou, *et al.*, 2020; Zhang, *et al.*, 2019), por lo que a pesar de que el registro de actividad locomotriz e ingesta de alimento presentara diferencias desde la condición inicial, los resultados de la expresión relativa de los genes reloj y las PPO pudieron tener variaciones que no se registraron en las etapas tempranas del experimento (Walker, *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2023). Un protocolo con una mayor duración podría también mostrar por cuanto tiempo estaría presente este sistema de amortiguamiento ya que los resultados de la CTG

nos marcan una tendencia a la resistencia a la insulina, lo que podría acarrear problemas metabólicos que agravarían la desincronización que se reporta en este trabajo.

Conclusiones

-El protocolo de fotoperiodo irregular utilizado en este trabajo de tesis causó la disminución en la actividad locomotriz, modificó el perfil de ingesta de alimento, mejoró la tolerancia a la glucosa y atenuó la expresión relativa de ARNm de *Per1* y *Bmal1* en el diencefalo en el ratón *N. alstoni*.

-No se observaron modificaciones en el peso corporal de los organismos ni en la expresión relativa de ARNm de PPO en tejido diencefálico.

-Los resultados sugieren la posible existencia de algún proceso amortiguador que evita que la desincronización por fotoperiodo cause el incremento en el peso. Esta característica es tema de futuros estudios que ayuden a comprender mejor el panorama de la desincronización y las salidas metabólicas y conductuales del reloj circadiano.

Referencias

Aguilar-Roblero, R. (2015). Introduction to Circadian Rhythms, Clocks, and Its Genes. In: Aguilar-Roblero, R., Díaz-Muñoz, M., Fanjul-Moles, M. (eds) *Mechanisms of Circadian Systems in Animals and Their Clinical Relevance*. Springer, Cham. pp 1-14. https://doi.org/10.1007/978-3-319-08945-4_1

Angeles-Castellanos, M., Salgado-Delgado, R., Rodríguez, K., Buijs, R. M., & Escobar, C. (2010). The suprachiasmatic nucleus participates in food entrainment: a lesion study. *Neuroscience*, 165(4), 1115–1126. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.1

Arble, D. M., Bass, J., Laposky, A. D., Vitaterna, M. H., & Turek, F. W. (2009). Circadian Timing of Food Intake Contributes to Weight Gain. *Obesity*, 17(11), 2100–2102. doi:10.1038/oby.2009.264

Arellanes-Licea, E. D. C., Pérez-Mendoza, M., Carmona-Castro, A., Díaz-Muñoz, M., & Miranda-Anaya, M. (2021). Obese *Neotomodon alstoni* mice exhibit sexual dimorphism in the daily profile of circulating melatonin and clock proteins PER1 and BMAL1 in the hypothalamus and peripheral oscillators. *Chronobiology International*, 38(4), 584–597. doi:10.1080/07420528.2020.1860999

Aschoff J. (1960). Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 25:11-28.

Aschoff J. (1999). Masking and parametric effects of high-frequency light-dark cycles. *Jpn J Physiol*, 49(1):11-8,

Ashton, A., Foster, R. G., Jagannath, A. (2022). Photic Entrainment of the Circadian System. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 729. <https://doi.org/10.3390/ijms23020729>

Ayala-Guerrero F, Vargas-Reyna L, Ramos JI, Mexicano G. (1998). Sleep patterns of the volcano mouse (*Neotomodon alstoni alstoni*). *Physiol Behav.* Jun 15;64(4):577-80. doi: 10.1016/s0031-9384(98)00081-x. PMID: 9761235.

Báez-Ruiz Adrián, Luna-Moreno Dalia, Carmona-Castro Agustín, Cárdenas Vázquez René, Díaz-Muñoz Mauricio, Carmona-Alcocer Vania, Fuentes-Granados Citlalli, Miranda-Anaya Manuel (2014). Hypothalamic expression of anorexigenic and orexigenic hormone receptors in obese females *Neotomodon alstoni*: Effect of fasting. *Nutritional Neuroscience* VOL. 17 NO. 1 31. Pp.1-6 DOI 10.1179/1476830513Y.0000000063

Barclay J. L., Husse J., Bode B., Naujokat N., Meyer-Kovac J., Schmid S. M., Lehnert H., Oster H. (2012). Circadian desynchrony promotes metabolic disruption in a mouse model of shiftwork. *PLoS One*. 2012;7(5):e37150. doi: 10.1371/journal.pone.0037150. Epub 2012 May 21. PMID: 22629359; PMCID: PMC3357388.

Barf, R. P., Van Dijk, G., Scheurink, A. J. W., Hoffmann, K., Novati, A., Hulshof, H. J., Meerlo, P. (2012). Metabolic consequences of chronic sleep restriction in rats: Changes in body weight regulation and energy expenditure. *Physiology & Behavior*, 107(3), 322–328. doi:10.1016/j.physbeh.2012.09.005

Bartol-Munier, I., Gourmelen, S., Pevet, P., Challet, E. (2005). Combined effects of high-fat feeding and circadian desynchronization. *International Journal of Obesity*, 30(1), 60–67. doi:10.1038/sj.ijo.0803048

Bechtold, D. A., & Loudon, A. S. I. (2013). Hypothalamic clocks and rhythms in feeding behaviour. *Trends in Neurosciences*, 36(2), 74–82. doi:10.1016/j.tins.2012.12.007

Belle, M. D. C., Hughes, A. T. L., Bechtold, D. A., Cunningham, P., Pierucci, M., Burdakov, D., & Piggins, H. D. (2014). Acute Suppressive and Long-Term Phase Modulation Actions of Orexin on the Mammalian Circadian Clock. *Journal of Neuroscience*, 34(10), 3607–3621. doi:10.1523/jneurosci.3388-13.2014

Boulos Z., Rosenwasser A.M., Terman M., (1980). Feeding schedules and the circadian organization of behavior in the rat, *Behav. Brain Res.* 1 (1) 39–65.

Bourgin, P., Huitrón-Reséndiz, S., Spier, A. D., Fabre, V., Morte, B., Criado, J. R., de Lecea, L. (2000). Hypocretin-1 Modulates Rapid Eye Movement Sleep through Activation of Locus Coeruleus Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 20(20), 7760–7765. doi:10.1523/jneurosci.20-20-07760.2000.

Buhr E. D., Takahashi J. S. (2013). Molecular components of the Mammalian circadian clock. *Handb Exp Pharmacol.* (217):3-27. doi: 10.1007/978-3-642-25950-0_1. PMID: 23604473; PMCID: PMC3762864.

Buijs, R. M., & Kalsbeek, A. (2001). Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(7), 521–526. doi:10.1038/35081582

Buijs, F. N., León-Mercado, L., Guzmán-Ruiz, M., Guerrero-Vargas, N. N., Romo-Nava, F., & Buijs, R. M. (2016). The Circadian System: A Regulatory Feedback Network of Periphery and Brain. *Physiology*, 31(3), 170–181. doi:10.1152/physiol.00037.2015

Buijs, F. N., Guzmán-Ruiz M., León-Mercado L., Basualdo M. C., Escobar C., Kalsbeek A., Buijs R. M. (2017). Suprachiasmatic Nucleus Interaction with the Arcuate Nucleus; Essential for Organizing Physiological Rhythms. *eNeuro*. (2):ENEURO.0028-17.2017. doi: 10.1523/ENEURO.0028-17.2017. PMID: 28374011; PMCID: PMC5364589.

Buijs, R. M., Guzmán Ruiz, M. A., Hernández, R. M., & Cortés, B. R. (2019). The suprachiasmatic nucleus; a responsive clock regulating homeostasis by daily changing the setpoints of physiological parameters. *Autonomic Neuroscience*. doi:10.1016/j.autneu.2019.02.001

Bumgarner, J. R., Nelson, R. J. (2021). Light at Night and Disrupted Circadian Rhythms Alter Physiology and Behavior. *Integrative and Comparative Biology*. Society for Integrative and Comparative Biology. doi: 10.1093 / icb / icab017

Carmona-Alcocer V, Fuentes-Granados C, Carmona-Castro A, Aguilar-González I, Cárdenas-Vázquez R, Miranda-Anaya M, et al. Obesity alters circadian behavior and metabolism in sex dependent manner in the volcano mouse *Neotomodon alstoni*. *Physiol Behav*. (2012) 105:727–33. doi: 10.1016/j.physbeh.2011.09.022

Carmona-Castro A. (2006). Obesidad, esteatosis hepática y parámetros sanguíneos en el ratón de los volcanes (*Neotomodon alstoni alstoni*) mantenido en cautiverio [Master in Science Thesis]. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias, México.

Carneiro, B. T. S., Araujo, J. F. (2009). The food-entrainable oscillator: a network of interconnected brain structures entrained by humoral signals?. *Chronobiology International*, 26(7), 1273–1289. doi:10.3109/07420520903404480

Casiraghi, L. P., Alzamendi, A., Giovambattista, A., Chiesa, J. J., & Golombek, D. A. (2016). Effects of chronic forced circadian desynchronization on body weight and metabolism in male mice. *Physiological Reports*, 4(8), e12743. doi:10.14814/phy2.12743

Chen, L., McKenna, J. T., Bolortuya, Y., Winston, S., Thakkar, M. M., Basheer, R., McCarley, R. W. (2010). Knockdown of orexin type 1 receptor in rat locus coeruleus

increases REM sleep during the dark period. *European Journal of Neuroscience*, 32(9), 1528–1536. doi:10.1111/j.1460-9568.2010.07401.x

Cheon S., Park N., Cho S., Kim K. (2013). Glucocorticoid-mediated *Period2* induction delays the phase of circadian rhythm, *Nucleic Acids Res.* 41 6161–6174

Christiansen, S., Bouzinova, E., Fahrenkrug, J., & Wiborg, O. (2016). Altered Expression Pattern of Clock Genes in a Rat Model of Depression. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 19(11), pyw061. doi:10.1093/ijnp/pyw061

Cisse Y M, Peng J, Nelson RJ (2017). Effects of dim light at night on food intake and body mass in developing mice. *Front Neurosci* 11:294 doi: 10.3389/fnins.2017.00294

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(1), 517–549. doi:10.1146/annurev-physiol-021909-135821

Dyar, K. A., Ciciliot, S., Wright, L. E., Biensø, R. S., Tagliazucchi, G. M., Patel, V. R., Schiaffino, S. (2014). Muscle insulin sensitivity and glucose metabolism are controlled by the intrinsic muscle clock. *Molecular Metabolism*, 3(1), 29–41. doi:10.1016/j.molmet.2013.10.005

España, R. A., Plahn, S., & Berridge, C. W. (2002). Circadian-dependent and circadian-independent behavioral actions of hypocretin/orexin. *Brain Research*, 943(2), 224–236. doi:10.1016/s0006-8993(02)02653-7

Evans, J. A., Davidson, A. J. (2013). Health Consequences of Circadian Disruption in Humans and Animal Models. *Chronobiology: Biological Timing in Health and Disease*, 283–323. doi: 10.1016 / b978-0-12-396971-2.00010-5

Fagiani F., Di Marino D., Romagnoli A., Travelli C., Voltan D., Di Cesare Mannelli L., Racchi M., Govoni S., Lanni C. (2022). Molecular regulations of circadian rhythm and implications for physiology and diseases. *Signal Transduct Target Ther.* Feb 8;7(1):41. doi: 10.1038/s41392-022-00899-y. PMID: 35136018; PMCID: PMC8825842.

Filipski, E., Innominato, P. F., Wu M., Li, X.-M., Iacobelli, S., Xian, L.-J., Levi, F. (2005). Efectos de la luz y los horarios de los alimentos en los relojes moleculares del hígado y los tumores en ratones. *Revista JNCI del Instituto Nacional del Cáncer*, 97 (7), 507–517. doi: 10.1093 / jnci / dji083

Fonken, L. K., Workman, J. L., Walton, J. C., Weil, Z. M., Morris, J. S., Haim, A., & Nelson, R. J. (2010). Light at night increases body mass by shifting the time of food intake. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(43), 18664–18669. doi:10.1073/pnas.1008734107

Foster, R. G., Hughes, S., & Peirson, S. N. (2020). Circadian Photoentrainment in Mice and Humans. *Biology*, 9(7), 180. doi:10.3390/biology9070180

Fuentes-Granados, C., Miranda-Anaya, M., Samario-Román, J., Moreno-Sáenz, E., Carmona-Castro, A., Cárdenas-Vázquez, R. (2010). Circadian locomotor activity and response to different light conditions in the volcano mouse, *Neotomodon Alstoni* (Merriam, 1898). *Biological Rhythm Research*, 41(4), 269-278. <https://doi.org/10.1080/09291010902863420>

Fuentes-Granados C. (2011). Alteraciones producidas por la obesidad en la estructura del ciclo sueño-vigilia y los perfiles diarios de leptina, insulina, triglicéridos y glucosa en el ratón de los volcanes *Neotomodon alstoni* [Master in Science thesis]. Posgrado en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencias, México D.F. pp. 69- 95

Gabriel B. M., Zierath J. R. (2022). Zeitgebers of skeletal muscle and implications for metabolic health. *J Physiol.*;600(5):1027-1036. doi: 10.1113/JP280884. Epub 2021 May 31. PMID: 33963554.

Gale, J. E., Cox, H. I., Qian, J., Block, G. D., Colwell, C. S., Matveyenko, A. V. (2011). Disruption of Circadian Rhythms Accelerates Development of Diabetes through Pancreatic Beta-Cell Loss and Dysfunction. *Journal of Biological Rhythms*, 26(5), 423–433. doi:10.1177/0748730411416341

Garaulet, M., Gómez-Abellán, P., Albuquerque-Béjar, J. J., Lee, Y.-C., Ordovás, J. M., & Scheer, F. A. J. L. (2013). Timing of food intake predicts weight loss effectiveness. *International Journal of Obesity*, 37(4), 604–611. doi:10.1038/ijo.2012.229

Garaulet, M., Gómez-Abellán, P. (2014). Timing of food intake and obesity: A novel association. *Physiology & Behavior*, 134, 44–50. doi:10.1016/j.physbeh.2014.01.001 10.1016/j.physbeh.2014.01.001

Goforth, PB y Myers, MG (2016). Funciones de la orexina / hipocretina en el control del equilibrio energético y el metabolismo. *Temas actuales en neurociencias del comportamiento*, 137-156. doi: 10.1007 / 7854_2016_51

Golombek, D. A., Casiraghi, L. P., Agostino, P. V., Paladino, N., Duhart, JM, Plano, S. A., Chiesa, J. J. (2013). The times they're a-changing: Effects of circadian desynchronization on physiology and disease. *Revista de fisiología-París*, 107 (4), 310–322. doi: 10.1016 / j.jphysparis.2013.03.007

Granados H, Hoth J. (1989). Estudios sobre la biología del ratón de los volcanes (N. a. alstoni). XVI. Comparación de la capacidad reproductora de hembras silvestres en el laboratorio, siguiendo 3 sistemas de apareamiento [Biology of the volcano mouse (N. a. alstone). XVI. Comparison of the reproductive capacity of wild females in the laboratory, following 3 mating systems]. *Arch Invest Med (Mex)*. Jan-Mar;20(1):95-105. Spanish. PMID: 2669672

Griffond, B., Risold, P. Y., Jacquemard, C., Colard, C., & Fellmann, D. (1999). Insulin-induced hypoglycemia increases preprohypocretin (orexin) mRNA in the rat lateral hypothalamic area. *Neuroscience Letters*, 262, 77–80

Guzman-Ruiz, M. A., Ramirez-Corona, A., Guerrero-Vargas, N. N., Sabath, E., Ramirez-Plascencia, O. D., Fuentes-Romero, R., Buijs, R. M. (2015). Role of the Suprachiasmatic and Arcuate Nuclei in Diurnal Temperature Regulation in the Rat. *Journal of Neuroscience*, 35(46), 15419–15429. doi:10.1523/jneurosci.1449-15.2015

Hall, K. D., Heymsfield, S. B., Kemnitz, J. W., Klein, S., Schoeller, D. A., & Speakman, J. R. (2012). Energy balance and its components: implications for body weight regulation. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 95(4), 989–994. doi:10.3945/ajcn.112.036350

Hara, R., Wan, K., Wakamatsu, H., Aida, R., Moriya, T., Akiyama, M., & Shibata, S. (2001). Restricted feeding entrains liver clock without participation of the suprachiasmatic nucleus. *Genes to Cells*, 6(3), 269–278. doi:10.1046/j.1365-2443.2001.00419.x

Hardeland, R., Madrid, J. A., Tan, D. X., Reiter, R. J. (2012). Melatonin, the circadian multioscillator system and health: The need for detailed analyses of peripheral melatonin signaling. *J. Pineal Res.* 52, 139–166 doi: 10.1111/j.1600-079X.2011.00934.x.

Hardin Paul E., Panda Satchidananda (2013). Circadian timekeeping and output mechanisms in animals. *Curr Opin Neurobiology*. October; 23(5): 724–731. doi:10.1016/j.conb.2013.02.018.

Harding, C., Bechtold, D. A., & Brown, T. M. (2020). Suprachiasmatic nucleus-dependent and independent outputs driving rhythmic activity in hypothalamic and thalamic neurons. *BMC Biology*, 18(1). doi:10.1186/s12915-020-00871-8

Hastings M. H, Maywood E. S, Brancaccio M. (2018). Generation of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus. *Nat Rev Neurosci*. Aug;19(8):453-469. doi: 10.1038/s41583-018-0026-z. PMID: 29934559.

Healy K. L., Morris A. R., Liu A. C. (2021). Circadian Synchrony: Sleep, Nutrition, and Physical Activity. *Front Netw Physiol*. Oct;1:732243. doi: 10.3389/fnetp.2021.732243. PMID: 35156088; PMCID: PMC10013016

Henslee, E. A., Crosby, P., Kitcatt, S. J., Parry, J. S. W., Bernardini, A., Abdallat, R. G., Labeed, F. H. (2017). Rhythmic potassium transport regulates the circadian clock in human red blood cells. *Nature Communications*, 8(1). doi:10.1038/s41467-017-02161-4

Herrera-García A., Pérez-Mendoza M., Arellanes-Licea E. D C., Gasca-Martínez D., Carmona-Castro A., Díaz-Muñoz M., Miranda-Anaya M. (2022). Obesity in male volcano mice *Neotomodon alstoni* affects the daily rhythm of metabolism and thermoregulation. *Front Nutr*. Aug 4;9:963804. doi: 10.3389/fnut.2022.963804. PMID: 35990356; PMCID: PMC9386375

Herrero, L., Valcarcel, L., da Silva, C. A., Albert, N., Diez-Noguera, A., Cambras, T., & Serra, D. (2015). Altered Circadian Rhythm and Metabolic Gene Profile in Rats Subjected to Advanced Light Phase Shifts. *PLOS ONE*, 10(4), e0122570. doi:10.1371/journal.pone.0122570.

Hsieh, W.-H., Escobar, C., Yuguay, T., Lo, M.-T., Pittman-Polletta, B., Salgado-Delgado, R., Hu, K. (2014). Simulated shift work in rats perturbs multiscale regulation of locomotor activity. *Journal of The Royal Society Interface*, 11(96), 20140318–20140318. doi:10.1098/rsif.2014.0318

Ida T., Nakahara K., Murakami T., Hanada R., Nakazato M., Murakami N. (2000). Possible involvement of orexin in the stress reaction in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun*;270:318–323. doi: 10.1006/bbrc.2000.2412

Imperatore, R., Palomba, L., & Cristino, L. (2017). Role of Orexin-A in Hypertension and Obesity. *Current Hypertension Reports*, 19(4). doi:10.1007/s11906-017-0729-y

Justinussen J. L., Holm A., Kornum B.R. (2015). An optimized method for measuring hypocretin-1 peptide in the mouse brain reveals differential circadian regulation of hypocretin-1 levels rostral and caudal to the hypothalamus. *Neuroscience*. Dec 3;310:354-61. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.09.050. Epub 2015 Sep 28. PMID: 26415770.

Kalsbeek, A., & Buijs, R. M. (2002). Output pathways of the mammalian suprachiasmatic nucleus: coding circadian time by transmitter selection and specific targeting. *Cell and Tissue Research*, 309(1), 109–118. doi:10.1007/s00441-002-0577-0

Kalsbeek, A., Scheer, F. A., Perreau-Lenz, S., La Fleur, S. E., Yi, C.-X., Fliers, E., & Buijs, R. M. (2011). Circadian disruption and SCN control of energy metabolism. *FEBS Letters*, 585(10), 1412–1426. doi:10.1016/j.febslet.2011.03.021

Kang, J.-E., Lim, M. M., Bateman, R. J., Lee, J. J., Smyth, L. P., Cirrito, J. R. Holtzman, D. M. (2009). Amyloid- Dynamics Are Regulated by Orexin and the Sleep-Wake Cycle. *Science*, 326(5955), 1005–1007. doi:10.1126/science.1180962

Karatsoreos I. N., Bhagat S., Bloss E. B., Morrison J. H., McEwen B. S. (2011). Disruption of circadian clocks has ramifications for metabolism, brain, and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108(4):1657-62. doi: 10.1073/pnas.1018375108. Epub 2011 Jan 10. PMID: 21220317; PMCID: PMC3029753

Karlsson, B., Knutsson A., Lindahl B. (2001). Is there an association between shift work and having a metabolic syndrome? Results from a population based study of 27 485 people *Occupational and Environmental Medicine*, 58(11), 747– 752. doi:10.1136/oem.58.11.747

Kemler, D., Wolff, C. A., & Esser, K. A. (2020). Time of day dependent effects of contractile activity on the phase of the skeletal muscle clock. *The Journal of Physiology*. doi:10.1113/jp279779

Kotz, CM, Teske, JA, Levine, JA y Wang, C. (2002). Feeding and activity induced by orexin A in the lateral hypothalamus in rats. *Péptidos reguladores*, 104 (1-3), 27- 32. doi: 10.1016 / s0167-0115 (01) 00346-9

Koukkari, W. L., Sothorn, R. B. (2006). General Features of Rhythms: Terminology and Characteristics. En Springer eBooks (pp. 19-65). https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4701-5_2

Kuru, M., Ueta, Y., Serino, R., Nakazato, M., Yamamoto, Y., Shibuya, I., et al. (2000). Centrally administered orexin/hypocretin activates HPA axis in rats. *Neuroreport* 11, 1977–1980. doi: 10.1097/00001756-200006260-00034

Lau, D. S., Connaty, A. D., Mahalingam, S., Wall, N., Cheviron, Z. A., Storz, J. F., et al. (2017). Acclimation to hypoxia increases carbohydrate use during exercise in high-altitude deer mice. *Am. J. Phys. Regul. Integr. Comp. Phys.* 312, R400–R411. doi: 10.1152/ajpregu.00365.2016

Leon-Mercado, L., Herrera Moro Chao, D., Basualdo, M. del C., Kawata, M., Escobar, C., Buijs, R. M. (2017). The Arcuate Nucleus: A Site of Fast Negative Feedback for Corticosterone Secretion in Male Rats. *Eneuro*, 4(1), ENEURO.0350–16.2017. doi:10.1523/eneuro.0350-16.2017

Li, S., De Lecea, L. (2020). The hypocretin (orexin) system: from a neural circuitry perspective. *Neuropharmacology*, <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.107993>

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, 25(4), 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262

Luis J, Granados H. (1990). Estudios sobre la biología del ratón de los volcanes (*N. a. alstoni*). XXI. Capacidad reproductora de hembras silvestres en 15 apareamientos sucesivos [The biology of the volcano mouse (*N. a. alstoni*). XXI. Reproductive capacity of wild females in 15 successive matings]. *Arch Invest Med (Mex)*. Jan-Mar;21(1):51-6. Spanish. PMID: 2222116

Luna-Illades, C., Morales, T., & Miranda-Anaya, M. (2017). Decreased food anticipatory activity of obese mice relates to hypothalamic C-FOS expression. *Physiology & Behavior*, 179, 9-15. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.05.020>

Pérez, J. A. M. (2012b). An introduction to Chronobiology. En Springer eBooks (pp. 11-28). https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5082-5_2

Mieda, M., Sakurai, T. (2013). Orexin (Hypocretin) Receptor Agonists and Antagonists for Treatment of Sleep Disorders. *CNS Drugs*, 27(2), 83–90. doi:10.1007/s40263-012-0036-8

Mieda M. (2020). The central circadian clock of the suprachiasmatic nucleus as an ensemble of multiple oscillatory neurons. *Neurosci Res*. doi: 10.1016/j.neures.2019.08.003

Miranda-Anaya, M., Pérez-Mendoza, M., Juárez-Tapia, C. R., & Carmona-Castro, A. (2019). The volcano mouse *Neotomodon alstoni* of central Mexico, a biological model in the study of breeding, obesity and circadian rhythms. *General and Comparative Endocrinology*. doi:10.1016/j.ygcen.2018.04.024

Mitsui Shigeru, Yamaguchi Shun, Matsuo Takuya, Ishida Yoshiki, Okamura Hitoshi (2001). Antagonistic role of E4BP4 and PAR proteins in the circadian oscillatory mechanism. *Genes*; 15(8):995-1006. doi: 10.1101/gad.873501. PMID: 11316793; PMCID: PMC312673

Mohawk, J. A., Green, C. B., Takahashi, J. S. (2012). Central and peripheral circadian clocks in mammals. *Annual Review of Neuroscience*, 35(1), 445-462. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-060909-153128>.

Moore, R. Y., Speh, J. C., & Leak, R. K. (2002). Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell and Tissue Research*, 309(1), 89–98. doi:10.1007/s00441-002-0575-2

Morgado, E., Juárez-Portilla, C., Silverman, A.-J., & Silver, R. (2014). Relevance of Network Organization in SCN Clock Function. *Mechanisms of Circadian Systems in Animals and Their Clinical Relevance*, 149–175. doi:10.1007/978-3-319-08945-4_9

Moriguchi, T., Sakurai, T., Takahashi, S., Goto, K., & Yamamoto, M. (2002). The Human Prepro-orexin Gene Regulatory Region That Activates Gene Expression in the Lateral Region and Represses It in the Medial Regions of the Hypothalamus. *Journal of Biological Chemistry*, 277(19), 16985– doi: 10.1074/jbc.M107962200

Mrosovsky, N. (1996). Locomotor activity and non-photoc influences on circadian clocks. *Biological Reviews*, 71(3), 343–372. doi:10.1111/j.1469-185x.1996.tb01278.x

Ohno, K., Sakurai, T. (2008). Orexin neuronal circuitry: Role in the regulation of sleep and wakefulness. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 29(1), 70–87. doi:10.1016/j.yfrne.2007.08.001

Oishi, K., Itoh, N. (2013). Disrupted daily light–dark cycle induces the expression of hepatic gluconeogenic regulatory genes and hyperglycemia with glucose intolerance in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 432(1), 111–115. doi:10.1016/j.bbrc.2013.01.076

Oishi K, Hashimoto C. (2018). Short-term time-restricted feeding during the resting phase is sufficient to induce leptin resistance that contributes to development of obesity and metabolic disorders in mice. *Chronobiol Int.* 35:1576– 94. doi: 10.1080/07420528.2018.1496927

Okamura H., Yamaguchi S., Yagita K. (2002). Molecular machinery of the circadian clock in mammals. *Cell Tissue Res Jul*;309(1):47-56. doi: 10.1007/s00441- 002-0572-5

Opperhuizen A. L., van Kerkhof L. W. M., Proper K. I., Rodenburg W., Kalsbeek A. (2015). Rodent models to study the metabolic effects of shiftwork in humans. *Front. Pharmacol.* 6:50. doi: 10.3389/fphar.2015.00050

Ortiz-Dosal, A., Del Carmen Arellanes-Licea, E., Rodil-García, P., & Salazar-Olivo, L. A. (2020). Circulating microRNAs overexpressed in macrosomia: an experimental and bioinformatic approach. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 11(5), 464-472. <https://doi.org/10.1017/s2040174420000422>

Panagiotou M, Deboer T. (2020). Effects of Chronic Dim-light-at-night Exposure on Sleep in Young and Aged Mice. *Neuroscience.* Feb 1;426:154-167. doi: 10.1016/j.neuroscience.2019.11.033. Epub 2019 Dec 14..

Partch Carrie L Green Carla B., Takahashi Joseph S. (2014). Molecular Architecture of the Mammalian Circadian Clock., *Trends Cell Biol.* 24(2). 90–99. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.07.002>

Patke, A., Young, M. W., & Axelrod, S. (2019). Molecular mechanisms and physiological importance of circadian rhythms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* doi:10.1038/s41580-019-0179-2

Pendergast, J. S., Yamazaki, S. (2018). The Mysterious Food-Entrainable Oscillator: Insights from Mutant and Engineered Mouse Models. *Journal of Biological Rhythms*, 074873041878904. doi:10.1177/0748730418789043

Pérez-Mendoza, M., Luna-Moreno, D., Carmona-Castro, A., Rodríguez-Guadarrama, H. A., Montoya-Gómez, L. M., Díaz-Muñoz, M., Miranda-Anaya, M. (2017). Neotomodon alstoni mice present sex differences between lean and obese in daily hypothalamic leptin signaling. *Chronobiology International*, 34(7), 956–966. doi:10.1080/07420528.2017.1331354

Pérez-Mendoza, M., Rivera-Zavala, J. B., Rodríguez-Guadarrama, A. H., Montoya-Gomez, L. M., Carmona-Castro, A., Díaz-Muñoz, M., Miranda-Anaya, M. (2018). Daily cycle in hepatic lipid metabolism in obese mice, Neotomodon alstoni: Sex differences. *Chronobiology International*, 35(5), 643–657. doi:10.1080/07420528.2018.1424178.

Peyron C., Faraco J., Rogers W., Ripley B., Overeem S., Charnay Y., Nevsimalova S., Aldrich M., Reynolds D., Albin R., Li R, Hungs M., Pedrazzoli M., Padigaru M., Kucherlapati M., Fan J., Maki R., Lammers G. J., Bouras C., Kucherlapati R., Nishino S., Mignot E. (2000). A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. *Nat Med*. Sep;6(9):991-7. doi: 10.1038/79690. PMID: 10973318

Pezuk, P., Mohawk, J. A., Yoshikawa, T., Sellix, M. T., & Menaker, M. (2010). Circadian Organization Is Governed by Extra-SCN Pacemakers. *Journal of Biological Rhythms*, 25(6), 432–441. doi:10.1177/0748730410385204

Pittendrigh, C. S. (1993). Temporal Organization: Reflections of a Darwinian Clock-Watcher. *Annual Review of Physiology*, 55(1), 17–54. doi:10.1146/annurev.ph.55.030193.000313

Ptitsyn, A. A., Zvonic, S., Conrad, S. A., Scott, L. K., Mynatt, R. L., & Gimble, J. M. (2006). Circadian Clocks Are Resounding in Peripheral Tissues. *PLoS Computational Biology*, 2(3), e16. doi:10.1371/journal.pcbi.0020016

Qian J & Scheer FAJL (2016) Circadian System and Glucose Metabolism: Implications for Physiology and Disease. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 27, 282–293. [PubMed: 27079518]. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2016.03.005>

Ramírez Sandoval Karina Guadalupe (2021). Impacto de la desincronización circadiana por fotoperiodo irregular sobre los perfiles de actividad diaria de ratones Neotomodon alstoni. [Título profesional, Universidad Autónoma de Querétaro]. Repositorio Académico de la Universidad Autónoma de Querétaro. <http://ri-ng.uaq.mx/>.

Reiter, R. J., Liu, X., Manchester, L.C., Rosales-Corral, SA, Tan, D.-X. y Pérez, JAM (2012). Processes Underlying Chronodisruption and Their Proposed Association with Illness. *Cronobiología y obesidad*, 55–73. doi: 10.1007 / 978-1- 4614-5082-5_4

Rosenwasser, A. M., Turek, F. W. (2015). Neurobiology of Circadian Rhythm Regulation. *Sleep Medicine Clinics*, 10(4), 403–412. doi:10.1016/j.jsmc.2015.08.003

Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M. (1998). Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*. Feb 20;92(4):573-85. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80949-6. PMID: 9491897

Sakurai, T. (2007). The neural circuit of orexin (hypocretin): maintaining sleep and wakefulness. *Nature Reviews Neuroscience*.8:171-181. <https://doi.org/10.1038/nrn2092>

Sakurai, T., Amemiya, A., Ishii, M., Matsuzaki, I., Chemelli, R. M., Tanaka, H., Yanagisawa, M. (1998). Orexins and Orexin Receptors: A Family of Hypothalamic Neuropeptides and G Protein-Coupled Receptors that Regulate Feeding Behavior. *Cell*, 92(4), 573–585. doi:10.1016/s0092-8674(00)80949-6

Salgado-Delgado, R., Nadia, S., Angeles-Castellanos, M., Buijs, R. M., & Escobar, C. (2010). In a Rat Model of Night Work, Activity during the Normal Resting Phase Produces Desynchrony in the Hypothalamus. *Journal of Biological Rhythms*, 25(6), 421–431. doi:10.1177/0748730410383403

Scammell, T. E., Arrigoni, E., & Lipton, J. O. (2017). Neural Circuitry of Wakefulness and Sleep. *Neuron*, 93(4), 747–765. doi:10.1016/j.neuron.2017.01.014

Shuboni D., Yan L. (2010). Nighttime dim light exposure alters the responses of the circadian system. *Neuroscience*. Nov 10;170(4):1172-8. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.08.009. PMID: 20705120

Small L, Altıntaş A, Laker RC, Ehrlich A, Pattamaprapanont P, Villarreal J, Pilon NJ, Zierath JR & Barrès R (2020). Contraction influences Per2 gene expression in skeletal muscle through a calcium-dependent pathway. *J Physiol* 598, 5739–5752. doi: 10.1113/JP280428

Stephan F. K., Swann J. M., Sisk C. L., (1979). Entrainment of circadian rhythms by feeding schedules in rats with suprachiasmatic lesions, *Behav. Neural Biol.* 25 (4) 545–554. doi: 10.1016/s0163-1047(79)90332-7

Tahara, Y., Shibata, S. (2013). Chronobiology and nutrition. *Neuroscience*, 253, 78–88. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.08.049

Tahara, Y., Aoyama, S., Shibata, S. (2016). The mammalian circadian clock and its entrainment by stress and exercise. *The Journal of Physiological Sciences*, 67(1), 1–10. doi:10.1007/s12576-016-0450-7

Taheri, S., Sunter, D., Dakin, C., Moyes, S., Seal, L., Gardiner, J, Bloom, S. (2000). Diurnal variation in orexin A immunoreactivity and prepro-orexin mRNA in the rat central nervous system. *Neuroscience Letters*, 279(2), 109–112. doi:10.1016/s0304-3940(99)00955-6

Trebucq L. L, Lamberti M. L, Rota R, Aiello I, Borio C, Bilen M, Golombek DA, Plano SA, Chiesa J. J. (2023) Chronic circadian desynchronization of feeding-fasting rhythm generates alterations in daily glycemia, LDL cholesterolemia and microbiota composition in mice. *Front Nutr.* Apr 14;10:1154647. doi: 10.3389/fnut.2023.1154647. PMID: 37125029

Trivedi, P., Yu, H., MacNeil, D. J., Van der Ploeg, L. H., & Guan, X. M. (1998). Distribution of orexin receptor mRNA in the rat brain. *FEBS Letters*, 438, 71–75. doi: 10.1016/s0014-5793(98)01266-6

Tsai, L. L., Tsai, Y. C., Hwang, K., Huang, Y. W., and Tzeng, J. E. (2005). Repeated light-dark shifts speed up body weight gain in male F344 rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 289, E212–E217. doi: 10.1152/ajpendo.00603.2004

Tsai, L.-L., & Tsai, Y.-C. (2007). The effect of scheduled forced wheel activity on body weight in male F344 rats undergoing chronic circadian desynchronization. *International Journal of Obesity*, 31(9), 1368–1377. doi:10.1038/sj.ijo.0803607

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* Jun 18;3(7):RESEARCH0034. doi: 10.1186/gb-2002-3-7-research0034. PMID: 12184808; PMCID: PMC126239.

VanItallie, T. B. (2006). Sleep and energy balance: interactive homeostatic systems. *Metabolism*, 55, S30–S35. doi:10.1016/j.metabol.2006.07.010

Varadarajan, S., Tajiri, M., Jain, R., Holt, R., Ahmed, Q., LeSauter, J., & Silver, R. (2018). Connectome of the Suprachiasmatic Nucleus: New Evidence of the Core-Shell Relationship. *Eneuro*, 5(5), ENEURO.0205–18.2018. doi:10.1523/eneuro.0205-18.2018

Vázquez-Martínez, O., Pérez-Mendoza, M., Valente-Godínez, H., Revueltas-Guillén, F., Carmona-Castro, A., Díaz-Muñoz, M., & Miranda-Anaya, M. (2015). Day-night variations in pro-oxidant reactions of hypothalamic, hepatic and pancreatic tissue in mice with spontaneous obesity (*Neotomodon alstoni*). *Biological Rhythm Research*. <https://doi.org/10.1080/09291016.2015.1108061>

Ventzke, K., Oster, H., Jöhren, O. (2019). Diurnal Regulation of the Orexin/Hypocretin System in Mice. *Neuroscience*. doi:10.1016/j.neuroscience.2019.10.002
10.1016/j.neuroscience.2019.10.002

Vetter, C. (2018). Circadian disruption: What do we actually mean? *European Journal of Neuroscience*. 51(1):531-550 doi:10.1111/ejn.14255

Vilaplana, J. (1995). Influence of period length of light/dark cycles on the body weight and food intake of young rats. *Physiology & Behavior*, 58(1), 9–13. doi:10.1016/0031-9384(95)00021-a

Voigt, R. M., Forsyth, C. B., Green, S. J., Mutlu, E., Engen, P., Vitaterna, M. H., Keshavarzian, A. (2014). Circadian Disorganization Alters Intestinal Microbiota. *PLoS ONE*, 9(5), e97500. doi:10.1371/journal.pone.0097500

Walker W. H., Borniger J. C., Gaudier-Diaz M. M., Hecmarie Meléndez-Fernández O, Pascoe J. L., Courtney DeVries A., Nelson R. J. (2020). Acute exposure to low-level light at night is sufficient to induce neurological changes and depressive-like behavior. *Mol Psychiatry*. May;25(5):1080-1093. doi: 10.1038/s41380-019-0430-4. PMID: 31138889; PMCID: PMC6881534.

Wang G., Liu Y. F., Yang Z, Yu C. X., Tong Q., Tang Y. L, Shao YQ, Wang L. Q, Xu X, Cao H., Zhang Y. Q., Zhong Y. M., Weng SJ, Yang X. L. (2023). Short-term acute bright light exposure induces a prolonged anxiogenic effect in mice via a retinal ipRGC-CeA circuit. *Sci Adv*. Mar 22;9(12):eadf4651. doi: 10.1126/sciadv.adf4651. Epub 2023 Mar 22. PMID: 36947616; PMCID: PMC10032603

Wang, C., Wang, Q., Ji, B., Pan, Y., Xu, C., Cheng, B., Chen, J. (2018). The Orexin/Receptor System: Molecular Mechanism and Therapeutic Potential for Neurological Diseases. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11. doi:10.3389/fnmol.2018.00220

Waterhouse, J., Buckley, P., Edwards, B., & Reilly, T. (2003). Measurement of, and Some Reasons for, Differences in Eating Habits Between Night and Day Workers. *Chronobiology International*, 20(6), 1075–1092. doi:10.1081/cbi-120025536

Weaver, D. R. (2016). Introduction to Circadian Rhythms and Mechanisms of Circadian Oscillations. *Circadian Clocks: Role in Health and Disease*, 1– 55. doi:10.1007/978-1-4939-3450-8_1

Weil, Z. M., Fonken, L. K., Walker, W. H., Bumgarner, J. R., Liu, J. A., Melendez-Fernandez, O. H., Zhang N., DeVries A. C., Nelson, R. J. (2020). Dim Light at Night Exacerbates Stroke Outcome. *European Journal of Neuroscience*. 52(9):4139-4146 doi:10.1111/ejn.14915

Welsh D. K, Takahashi J. S, Kay S. A. (2010). Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties. *Annu Rev Physiol*. 2010;72:551-77. doi: 10.1146/annurev-physiol-021909-135919

Williams, G., Bing, C., Cai, X. J., Harrold, J. A., King, P. J., & Liu, X. H. (2001). The hypothalamus and the control of energy homeostasis. *Physiology & Behavior*, 74(4-5), 683–701. doi:10.1016/s0031-9384(01)00612-6

Wisor, J. P., Pasumarthi, R. K., Gerashchenko, D., Thompson, C. L., Pathak, S., Sancar, A., Kilduff, T. S. (2008). Sleep Deprivation Effects on Circadian Clock Gene Expression in the Cerebral Cortex Parallel Electroencephalographic Differences among Mouse Strains. *Journal of Neuroscience*, 28(28), 7193–7201. doi:10.1523/jneurosci.1150-08.2008

Wotus, C., Lilley, T. R., Neal, A. S., Suleiman, N. L., Schmuck, S. C., Smarr, B. L., de la Iglesia, H. O. (2013). Forced Desynchrony Reveals Independent Contributions of Suprachiasmatic Oscillators to the Daily Plasma Corticosterone Rhythm in Male Rats. *PLoS ONE*, 8(7), e68793. doi:10.1371/journal.pone.0068793

Yamanaka, A., Beuckmann, C. T., Willie, J. T., Hara, J., Tsujino, N., Mieda, M., ... Sakurai, T. (2003). Hypothalamic Orexin Neurons Regulate Arousal According to Energy Balance in Mice. *Neuron*, 38(5), 701–713. doi:10.1016/s0896-6273(03)00331-3

Zhang, S., Zeitzer, J. M., Yoshida, Y., Wisor, J. P., Nishino, S., Edgar, D. M., & Mignot, E. (2004). Lesions of the Suprachiasmatic Nucleus Eliminate the Daily Rhythm of Hypocretin-1 Release. *Sleep*, 27(4), 619–627. doi:10.1093/sleep/27.4.619.

Zhang, S., Zhang, Y., Zhang, W., Chen, S., & Liu, C. (2019). Chronic exposure to green light aggravates high-fat diet-induced obesity and metabolic disorders in male mice. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 178, 94–104. doi:10.1016/j.ecoenv.2019.04.013