



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**VARIACIONES DIARIAS Y  
CIRCADIANAS DEL METABOLISMO  
DE LA GLUCOSA EN EL RATÓN DE  
LOS VOLCANES Neotomodon  
alstoni alstoni: DIFERENCIAS  
ENTRE ORGANISMOS NORMALES  
Y OBESOS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**Anaid Ibeth López Urban**



**Director Dr. Manuel Miranda Anaya  
Codirector: M en C Agustín Carmona Castro**

**2007**



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.

## Hoja de Datos del Jurado

### 1. Datos del alumno

López  
Urbán  
Anaid Ibeth  
56080527  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
98055227

### 2. Datos del tutor

Doctor  
Manuel  
Miranda  
Anaya

### 3. Datos del cotutor

M en C  
Agustín  
Carmona  
Castro

### 4. Datos del Sinodal 2

Doctor  
René de Jesús  
Cárdenas  
Vázquez

### 5. Datos del Sinodal 3

Doctora  
Silvia  
Artega  
Hernández

### 6. datos del Sinodal 4

M en C  
Enrique  
Moreno  
Sáenz

### 7. Datos del trabajo escrito

Variaciones diarias y circadianas del metabolismo de la glucosa en el ratón de los volcanes *Neotomodon alstoni alstoni* : diferencias entre organismos normales y obesos.

64 p  
2007

# Agradecimientos

*A mis padres*

A mi padre por ser un luchador incansable hasta el final, por la confianza que siempre tuvo en mí y por ser el hombre al que le debo todo lo que soy.

A mi madre por su fortaleza, por ser una amiga incondicional, por sus consejos y por siempre estar a mi lado.

A Gabriel por ser un ejemplo a seguir y por su apoyo en todo momento.

A Saray por ser una amiga y escucharme cuando lo he necesitado

A Astrid por su alegría y por su cooperación en esta tesis la cual fue muy valiosa.

A mi tutor Manuel Miranda por su paciencia y sus conocimientos compartidos

A mi cotutor Agustín Carmona por su ayuda incondicional y por su entrega.

A mis sinodales por las molestias ocasionadas y por esas cargas de trabajo.

A todas las personas del Bioterio que me ayudaron a que este experimento saliera adelante

A mis amigos Clara, Gogo, Ale, May y Chucho por ser unas de las personas mas importantes para mi y por estar a mi lado en los momentos mas difíciles.

Y a todos los que estuvieron a mi lado en este arduo camino para llegar aquí muchas gracias.

## **INDICE**

<b>Resumen.....</b>	<b>1</b>
<b>II. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>2</b>
<b>Los ritmos biológicos.....</b>	<b>2</b>
<b>Propiedades generales de los ritmos circadianos.....</b>	<b>5</b>
<b>Oscilación en libre curso.....</b>	<b>5</b>
<b>Sincronización.....</b>	<b>6</b>
<b>Compensación de temperatura.....</b>	<b>7</b>
<b>El sistema circadiano en mamíferos.....</b>	<b>7</b>
<b>El núcleo supraquiasmático y los osciladores periféricos.....</b>	<b>7</b>
<b>Estructura general del NSQ, vías de entrada y de salida .....</b>	<b>8</b>
<b>Regulación molecular del reloj circadiano en mamíferos.....</b>	<b>10</b>
<b>Relaciones entre la regulación circadiana del NSQ y es sistema Hipotalámico de regulación metabólica.....</b>	<b>12</b>
<b>Alteraciones en el punto de referencia.....</b>	<b>13</b>
<b>Efectos hormonales.....</b>	<b>13</b>
<b>Metabolismo de la glucosa.....</b>	<b>16</b>
<b>Regulación de la glucosa sanguínea.....</b>	<b>17</b>
<b>Producción de glucógeno.....</b>	<b>18</b>
<b>Producción de lípidos.....</b>	<b>18</b>
<b>Papel del glucagón y el ayuno.....</b>	<b>19</b>
<b>Producción de glucosa.....</b>	<b>19</b>
<b>Anabolismo, catabolismo y fases del metabolismo de la glucosa.....</b>	<b>20</b>
<b>Acción de la insulina y el glucagón.....</b>	<b>21</b>
<b>Estructura, síntesis y metabolismo de la insulina.....</b>	<b>22</b>
<b>Obesidad.....</b>	<b>22</b>

Síndrome Metabólico.....	26
Relación del SM con la RI.....	28
Características del ratón de los volcanes	
<i>Neotomodon alstoni alstoni</i> .....	28
III PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	30
IV. JUSTIFICACIÓN.....	31
V. HIPÓTESIS.....	32
VI. OBJETIVOS .....	32
General.....	32
Particulares.....	32
VII. MATERIAL Y MÉTODO.....	33
Horario de toma de muestras en fotoperiodo y día subjetivo.....	33
Toma de muestras en escotoperiodo y noche subjetiva.....	34
Obtención de la curva de tolerancia a la glucosa .....	35
Análisis Estadístico.....	36
Determinación del estado de obesidad.....	37
Diseño Experimental.....	38
VIII. RESULTADOS.....	39
Comparación de la CTG en ciclos LO (día vs noche).....	39
Comparaciones de CTG en la misma fase.....	41
Comparación de la CTG entre el día y la noche subjetivos.....	43
Comparaciones de CTG en la misma fase circadiana.....	45
Variaciones de la CTG en la exposición a ciclos de lo y a oscuridad Constante.....	47
IX. DISCUSIÓN.....	53
Restricción y Actividad.....	55

<b>Diferencias diarias y circadianas de la concentración sanguínea de glucosa y de la capacidad para depurar la glucosa en ratones obesos. ....</b>	<b>55</b>
<b>X. CONCLUSIONES.....</b>	<b>59</b>
<b>XI. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>60</b>

## RESUMEN

La obesidad es considerada un desorden multifactorial en el que están implicados varios factores conductuales, ambientales, nutricionales y genéticos. La ingesta de alimento es controlada en gran parte por un grupo de estructuras localizadas en el hipotálamo, principalmente en la región ventromedial. Diversos trastornos en la regulación neural de los ritmos circadianos se relacionan con el desarrollo de la obesidad. En estudios anteriores ha demostrado que el ratón de los volcanes *Neotomodon alstoni alstoni* presenta obesidad en condiciones de cautiverio y tiene propensión al desarrollo de hipertrigliceridemia, intolerancia a la glucosa e hiperinsulinemia postpandriales. La semejanza de los trastornos metabólicos observados en el ratón de los volcanes con los que presentan los humanos con obesidad y diabetes tipo 2, ha sugerido que este roedor podría ser un modelo adecuado para su estudio en el plano de la regulación circadiana. El presente trabajo tiene el objetivo de observar las diferencias en las curvas de tolerancia a la glucosa (CTG), a dos horas opuestas del ciclo diario y circadiano del ratón de los volcanes *N. alstoni, alstoni* y saber si tales diferencias están afectadas por la obesidad. Los resultados obtenidos al comparar animales normales con animales obesos mantenidos en un fotoperiodo 12:12 mostraron que existen diferencias en las CTG entre el día y noche, así como entre el día y noche subjetivos (DS y NS) en oscuridad constante. Estas diferencias no son debidas a la actividad del animal, pues en ratones en restricción de actividad, la diferencia se mantiene. Los animales obesos mostraron deficiencias en la captación de glucosa en la NS. Mientras que los normales tuvieron menor captación durante el día. El área bajo la CTG de los ratones normales durante la NS indicó que éstos exhibieron una captación de glucosa más rápida, observándose diferencias significativas en estos valores, al compararlos con los de DS y la noche en fotoperiodo 12:12. Los ratones obesos presentaron diferencias entre el área bajo la curva de la CTG de noche vs NS y DS vs NS. En el presente trabajo se concluye que el *Neotomodon alstoni alstoni* obeso, es un modelo donde se reflejan trastornos metabólicos en el plano de la fisiología circadiana.

## II. INTRODUCCIÓN

### LOS RITMOS BIOLÓGICOS

Poder predecir los acontecimientos ambientales trae consigo la ventaja de conocer el momento adecuado para realizar diversas actividades con más eficiencia, lo que se refleja en una mejor adaptación del organismo a su medio. Los seres vivos poseen la capacidad de anticiparse a los cambios que son producto de las variaciones cíclicas geofísicas, lo que indica la presencia de un sistema biológico capaz de medir el tiempo. Por lo que hoy en día existe gran interés por parte de la investigación científica básica de estudiar como se regula esta capacidad (Gruart *et al*, 2002).

Un ritmo biológico se define como la repetición regular de una función biológica en un organismo a lo largo del tiempo. La principal característica que poseen los ritmos biológicos para ser considerados como tales, es que se presenten aún en ausencia de las señales ambientales cíclicas con los que están relacionados, como son la luz y la temperatura entre otros factores.

Con la fundación de la cronobiología como disciplina, se formó una analogía entre el los ritmos biológicos y el funcionamiento de un reloj que los regula, lo que implica un sistema de temporalización autosostenido. El concepto de los ritmos biológicos desafió el concepto de homeostasis propuesto por Walter B. Cannon en 1932, quien señaló la existencia de un estado estable de las variables orgánicas (por ejemplo concentración de glucosa en la sangre).

Este concepto levantó diferentes polémicas ya que no es aplicable al análisis de las alteraciones fisiológicas que exceden el intervalo de valores normales u homeostáticos. Algunos investigadores sugieren que la regulación rítmica podría ser entendida como una complementación a la homeostasis (Aschoff, 1979), no tratándose de una revisión del concepto pero si de su especificación temporal (Pittendrigh, 1960, 1974).

Moore-Ede en 1986, propone la existencia de dos tipos de homeostasis: la relativa y la predictiva. La primera esta enfocada a mecanismos homeostáticos los cuales son iniciados a partir de la perturbación del sistema, como fue definido por Cannon en 1929. La segunda esta relacionada con el conjunto de respuestas correctivas las cuales son iniciadas como anticipación a alteraciones rítmicas previsibles y repetitivas.

Los seres vivos han llegado a adaptarse a su medio a través de ritmos predictibles que presenta su nicho ecológico. Estas adaptaciones se han llevado acabo, de tal manera que los organismos pueden sincronizarse con los ciclos del ambiente, por lo que cada organismo presenta una gran relación entre alguna conducta y el día y la noche, las mareas o el año. Con base en lo anterior, los ritmos biológicos se han clasificado de acuerdo su relación con un ciclo ambiental. Al presentarse en condiciones constantes cercanas a su ambiente natural, se les señala con el prefijo "circa" así se tienen los ritmos circadianos, circalunares, circamareales y circanuales.

El ritmo del que se trata, depende del periodo que presenta, por ejemplo, si se habla de un ritmo circadiano, el periodo endógeno será cercano

a las 24hrs, si se trata de un ritmo circanual el periodo es de cerca de un año etc.

Los ritmos biológicos se miden tomando en cuenta los siguientes parámetros:

1. Periodo: el periodo de un ritmo es el tiempo que tarda en concluirse un ciclo completo. La frecuencia es el inverso del periodo, mide el número de ciclos que se completan en un tiempo determinado.

2. Amplitud: es la medida entre un valor máximo y un valor mínimo.

3. Fase: cualquier punto concreto del ritmo.

Los ritmos biológicos también están clasificados con base en su frecuencia, tomando como eje a los ritmos circadianos, aquellos con un periodo menor a las 20 h son considerados ultradianos, y aquellos con periodos superiores a 30 horas son considerados como infradianos. Sin embargo, no todos los ciclos biológicos en estas categorías comparten las mismas propiedades (Gruart *et al.*, 2002).

## **PROPIEDADES GENERALES DE LOS RITMOS CIRCADIANOS**

### **Oscilación en libre curso**

Esta característica, significa que, la conducta rítmica que aparece cada 24 horas, continua manifestándose con un periodo ligeramente diferente, cuando un organismo se mantiene en condiciones ambientales constantes (luz y temperatura principalmente).

El periodo en condiciones constantes es dependiente de una variedad de factores incluyendo la especie, la iluminación, la temperatura ambiental y la historia previa. Aschoff J, (1960), demostró que el periodo endógeno se acorta conforme la intensidad de luz aumenta en especies diurnas, mientras que lo opuesto se observa en especies nocturnas, a lo que se conoce como la Regla de Aschoff. Por otra parte, la exposición de organismos de diversas especies a la luz brillante continua, da como resultado una desorganización progresiva de la ritmicidad, lo que puede observarse como arritmia.

Cuando observamos el ritmo endógeno en un organismo en condiciones constantes, se puede distinguir el tiempo en que se encuentra en reposo y el de actividad. En los roedores nocturnos la actividad se presentará en su noche interna o "subjetiva", mientras que la fase de reposo de estos animales se observará en su día interno o día "subjetivo". Casi todos los ritmos circadianos de plantas y animales estudiados hasta ahora, en condiciones constantes de oscuridad presentan periodos que se distribuyen en un intervalo de 22 a 28 h por ciclo. Este intervalo al estar muy cercano a la duración de un día, lo que ha contribuido a describir a tales ritmos como

circadianos; palabra del latín *circa*-alrededor y *diem*- día (revisado en DeCoursey, 2004).

### **Sincronización**

Los ritmos circadianos en cada individuo expuesto a ciclos ambientales (24h), están ajustados con el ciclo diario externo. A falta del ciclo de luz, muchos organismos se dejarían llevar por otras claves ambientales cíclicas que presenten un periodo de 24 h como son los ciclos de temperatura, o bien señales sociales o de disponibilidad de alimento. Los factores ambientales que sincronizan a los ritmos circadianos tienen la característica que pueden modificar la fase del ritmo por una breve interrupción en el régimen constante. El agente ambiental efectivo en brindar el control de fase es llamado sincronizador o *Zeitgeber* (*del alemán zeit = tiempo, geber =dador*).

Cuando dos osciladores se acoplan, existe una constante fase en el ciclo del organismo la fase del ciclo ambiental. Frecuentemente el comienzo de la utilización de la rueda de actividad en roedores nocturnos está relacionado con el comienzo de oscuridad en el ciclo de luz y oscuridad (LO). Un oscilador autosostenido endógeno, permite a un organismo anticiparse a un evento periódico en el ambiente mediante en la sincronización con el mismo.

## **Compensación de temperatura**

La compensación de temperatura es una característica que permite al reloj biológico amortiguar los efectos de los cambios en la temperatura ambiental, sobre la velocidad con la que el reloj calcula el tiempo. Las reacciones químicas duplican o inclusive triplican su velocidad ante aumentos de temperatura de 10°C ( $Q_{10}= 2$  o 3), mientras que el reloj biológico, cambia muy poco el valor del periodo en libre curso ante cambios ambientales de 10 o más grados centígrados. La compensación de temperatura de un oscilador circadiano aparentemente tiene un mayor significado adaptativo para plantas y organismos poiquiloterms, si pensamos en los animales que hibernan o están expuestos a temperaturas extremas, éstos muestran cambios dramáticos en su temperatura corporal, (Menaker, 1959, Sweeney y Hastings.1960).

## **EL SISTEMA CIRCADIANO EN MAMÍFEROS**

### **El núcleo supraquiasmático y los osciladores periféricos.**

El sistema de tejidos, órganos, hormonas y procesos fisiológicos en general que regulan la actividad cíclica durante las 24 horas es denominado Sistema Circadiano. El Sistema Circadiano de los mamíferos presenta un oscilador primario central, el Núcleo Supraquiasmático del Hipotálamo (NSQ).

La eliminación de este núcleo, conlleva a la pérdida de múltiples ritmos en el organismo. La extirpación y cultivo del NSQ permite observar un ritmo circadiano autosostenido, en la frecuencia de potenciales de acción espontáneos. La implantación de NSQ en un animal receptor previamente arrítmico, permite transplantar, no sólo el periodo del donante, sino también su fase (Williams y Schwartz, 2005).

Recientemente se ha confirmado que el NSQ no es el único oscilador autosostenido en los mamíferos, La retina aislada en condiciones de cultivo, sintetiza rítmicamente la hormona melatonina (Tosini y Menaker, 1995) y diversos tejidos periféricos manifiestan *in vitro* expresión rítmica de genes de reloj (Yamazaki *et al*, 2000, Stokkan *et al*, 2000).

### **Estructura general del NSQ, vías de entrada y de salida**

El marcapasos central del sistema circadiano en los mamíferos, está constituido por regiones ovoides que contienen aproximadamente 16000 neuronas, que son de las más pequeñas en el cerebro y están estrechamente relacionadas entre sí. El NSQ consiste estructural y funcionalmente de una corteza y de una médula. La corteza está dorsalmente sobre la médula, pero la región central del NSQ ocupa casi una posición medial o vertical en relación con la médula, que se encuentra en posición ventrolateral.

Las neuronas de la médula están más llenas de organelos y retículo endoplásmico, el núcleo celular es menos alejado que en las neuronas de la corteza. Sin embargo, existen fuertes diferencias histoquímicas. Los neuropéptidos concentrados en la corteza son la Calretinina (CAL) y Vasopresina (VP), mientras que la médula contiene principalmente péptido

liberador de gastrina (PLG) y el (PIV) péptido intestinal vasoactivo, (revisado en De, Coursey, 2004).

El NSQ recibe una proyección neural directa desde la retina conocida como el Tracto Retino Hipotalámico (TRH). La luz es el sincronizador ambiental que más influencia tiene en el sistema circadiano y la única vía por la que esta información alcanza al NSQ es mediante la retina, lo que muestra que a diferencia de otros vertebrados, en los mamíferos los ojos son necesarios para la fotorrecepción circadiana. Se ha observado que el TRH proviene de una población de células ganglionares uniformemente dispersas en la retina. A éstas se les conoce como células "W" y aunque son en sí mismas fotosensibles, también están conectados con los bastones los cuales detectan la cantidad de luz. Los axones de las células W se bifurcan antes de entrar al NSQ y una de esas ramas axónicas se conecta con las neuronas de otra parte del cerebro llamada la hojuela intergeniculada; la cual esta involucrada en vías de sincronización a diversos estímulos, lo cual podría depender de su ubicación estratégica en un área llamada el tálamo, que funciona como una central telefónica donde llegan y distribuyen a su destino casi todos los mensajes sensoriales dirigidos a la corteza cerebral (Gruart *et al*, 2002).

La mayor entrada neural no fótica al NSQ viene del núcleo de Rafe que se localiza en el cerebro medio. La entrada por el Rafe no es necesaria para la expresión de los ritmos circadianos sin embargo, lesiones del Rafe disminuyen la amplitud y se acorta el periodo de los ritmos en oscuridad constante. El Rafe también proyecta al núcleo intergenicular, permitiendo llevar información fótica por el genículo blanco. El neurotransmisor asociado

con las proyecciones del Rafe es la serotonina que a su vez modula la actividad en el sistema nervioso central (revisado en De Coursey, 2004). Otra forma de modulación no fónica es mediante la melatonina, la cual es producida por la glándula pineal durante la fase nocturna del ciclo circadiano. El NSQ contiene altas concentraciones de receptores de melatonina, lo que podría indicar que es un lugar importante para la actividad de esta hormona. La secreción de la melatonina, la producción del neuropéptido Y, la liberación de la insulina, tienen ritmos diurnos. Lo que quiere decir que estos funcionan como las manecillas del reloj, y cada uno muestra una implicación en la modulación de la fase del reloj. El NSQ regula los ritmos circadianos, mediante una combinación de mensajes neurales y endocrinos vía hipotálamo. Algunas conexiones, se encuentran especialmente en el hipotálamo, en el tallo del cerebro y la pituitaria. Otras son localizadas en el hipotálamo, pero los cambios neurales y agentes humorales derivan a distintas partes del cuerpo.

### **Regulación molecular del reloj circadiano en mamíferos**

El modelo molecular actual, consiste en una serie de asas de retroalimentación entre genes de reloj y sus proteínas. Principalmente, un dímero formado por las proteínas CLOCK y BMAL1, estimula la transcripción de los genes *m per1*, *mper2*, *mper3* y *mCry*. Al mismo tiempo, el dímero que se forma por proteínas PER y CRY desplaza de su sitio de acción al complejo CLOCK-BMAL1, con lo que inhibe su propia transcripción. De esta manera un asa de retroalimentación entre dos grupos de genes y sus productos de transcripción forma el mecanismo molecular del oscilador circadiano en las neuronas del NSQ. El dímero CLOCK-BMAL1 es también promotor de

transcripción de *Rev-erb $\alpha$* , cuyo producto reprime la expresión de *Bmal1*. Las proteínas PER y CRY son transportados al núcleo donde pueden ser estabilizados por asociación mutua. La proteína PER es fosforilada por la Caseína cinasa CK1. En un momento dado, el complejo PER-CRY bloquea la actividad de CLOCK-BMAL1. Como resultado de la inhibición de CLOCK-BMAL1, los niveles de *Per*, *Rev-erb $\alpha$*  y *Cry* disminuyen junto con los niveles de las proteínas PER, CRY y REV-ERB $\alpha$ . El dímero CLOCK-BMAL1 estimula también la transcripción del gen que codifica un pequeño péptido llamado vasopresina, por lo que los genes de reloj también participan en el control de la expresión de muchos otros diversos genes (Dunlap, 1999; Preitner *et al*, 2002; Reppert y Weaver, 2002, fig 1).

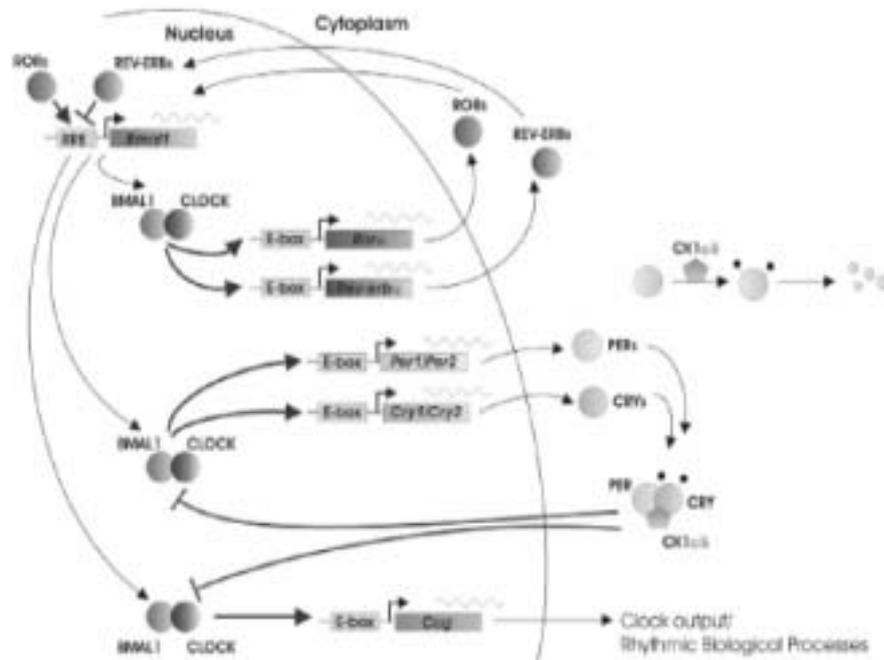


Figura 1. Diagrama que representa las asas de retroalimentación del reloj molecular en mamíferos. Tomado de Ko y Takahasi, 2006

## **Relaciones entre la regulación circadiana del NSQ y es sistema hipotalámico de regulación metabólica**

La conducta de la alimentación parece estar controlada por algún tipo de punto de referencia, lo que hace que un organismo adulto mantenga su peso corporal en el transcurso de cierto tiempo. Una dieta excesiva o deficiente en calorías trae como resultado un cambio en el peso corporal, por lo que de alguna manera el cuerpo produce varias reacciones que controlan la ingesta de alimento y el metabolismo. Estudios de ingesta de alimento en animales, han demostrado que el peso corporal puede ser alterado por varios factores, por ejemplo, el estrés, la privación de alimento o la ingesta excesiva de éste. Cuando esto sucede, el animal ajusta su siguiente ingesta de alimento hasta que recobra un peso corporal apropiado, por lo que se dice que los animales “defienden” su peso corporal contra perturbaciones. El punto de referencia del peso corporal varía entre individuos y puede variar debido al estrés y el ejercicio entre otros factores. Una posible explicación a lo que sucede con el punto de referencia del peso corporal, es que la alimentación utiliza algún sistema control, en el cual no hay un mecanismo de punto de referencia fijo, ya que varios factores pueden alterarlo (Novin *et al*, 1976).

Se sabe que la ingesta de alimento es controlada por dos áreas del cerebro en el hipotálamo, estas son el núcleo ventromedial hipotalámico (VMH) y el hipotálamo lateral. La destrucción experimental del VMH y de los tejidos circundantes produce hiperfagia, dando como resultado obesidad severa.

Anand y Brobeck en 1951, propusieron que lesiones bilaterales del hipotálamo lateral producen una severa afagia, provocándole la muerte al

animal; mientras que estimulaciones eléctricas producen efectos opuestos. La estimulación en la zona lateral induce a la ingesta de alimento, mientras que la estimulación medial, la suprime. Estas observaciones sugieren que el hipotálamo lateral contiene un centro de ingesta de alimento y el hipotálamo medial un centro de saciedad. (Dunlap,1999; Preitner *et al*, 2002; Reppert y Weaver, 2002)

### **Alteraciones en el punto de referencia**

Varios experimentos muestran que las lesiones en el hipotálamo pueden alterar el punto de referencia para la regulación del peso corporal. En estos experimentos los animales presentaban un cambio en el peso por exceso de comida o por inanición antes de la lesión en el hipotálamo lateral. Después de una pequeña lesión en el hipotálamo lateral, los animales mantuvieron la ingesta de alimento. Cuando el peso de los animales era reducido antes de la lesión, los animales comían y ganaban peso inmediatamente después de la lesión, en lugar de perderlo como los controles. La perturbación aparentemente llevó a pesos por debajo de los niveles del punto de referencia (Swartz y Niswender, 2004).

### **Efectos Hormonales**

La conducta de alimentación es regulada por muchas hormonas incluyendo, esteroides, glucagón, insulina y hormona del crecimiento. Una lesión grande en el hipotálamo, invariablemente afecta mucho al sistema de control hormonal. Por ejemplo: una lesión en el hipotálamo medial da como resultado un aumento en los niveles de insulina cuando los animales son expuestos a la comida. Esta respuesta puede explicar en parte la hiperfagia y

la ganancia de peso que se observa después de la lesión medial, una gran cantidad de insulina en la sangre puede producir respuestas de alimentación y también promover la conversión de nutrientes en grasa.

La homeostasis energética es regulada también por la leptina y la insulina, dos hormonas que son producidas por el tejido adiposo y el páncreas respectivamente. Estas hormonas cruzan la barrera hematoencefálica para interactuar con múltiples sistemas neuronales que influyen sobre el consumo de alimento. Cuando la masa adiposa decrece, reduce la actividad de circuitos neurales implicados en el catabolismo, liberando así la inhibición de circuitos anabólicos. Como resultado incrementa el consumo de alimento, disminuye el gasto calórico y hay recuperación de peso. De acuerdo con esto, la obesidad puede ser resultado de la secreción defectuosa de hormonas relacionadas o bien de una inadecuada respuesta neural a estas hormonas (Swartz y Niswender, 2004).

El NSQ en sí, contiene receptores a leptina (Hakanson et al, 1998), por lo que es posible que esta estructura normalmente participe monitoreando los cambios que ocurren en la masa de grasa corporal. La figura 2 muestra un diagrama de cómo podría ser esta regulación. El NSQ, genera ritmos diurnos de conducta y metabolismo. La salida del NSQ es llevada a través de las zonas ventral y sub paraventricular (ZSPV) del núcleo dorsomedial del hipotálamo (DMH). La entrada de la señal del estado metabólico al NSQ es mediante las hormonas Leptina, Grelina e Insulina. El núcleo arcuato (ARC) integra esta entrada y activa distintas áreas incluyendo el núcleo paraventricular (NPV) y dorsomedial (DMH). La leptina puede influir directamente en el NSQ, DMH y ventromedial hipotalámico (VMH).

La Grelina es un péptido orexigénico identificado como el ligando endógeno del receptor de la hormona de crecimiento (GH) (Kojima et al., 1999). La Grelina estimula la secreción de GH y promotores del despertar, de la ganancia de peso, de la secreción de las hormonas adrenocorticotropica y cortisol en roedores y en humanos. (Frieboes et al., 1995; Wren et al., 2000; Diabo et al., 2006; Szentirmai et al., 2007). Los niveles periféricos de Grelina aumentan bruscamente antes de la primer comida y disminuyen una vez que el animal ha sido alimentado.

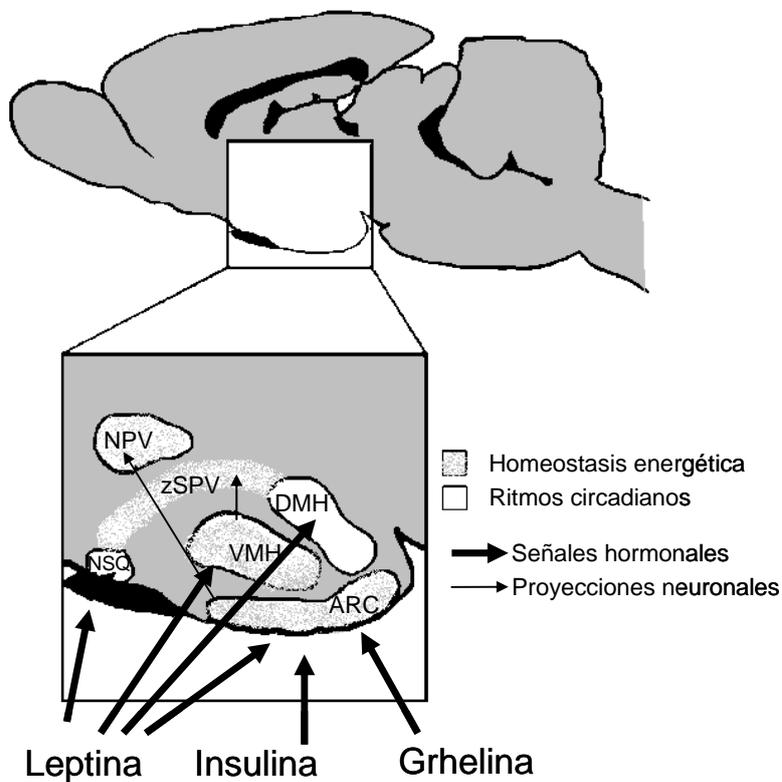


Figura 2. Diagrama que representa un corte transversal del cerebro de ratona. Se ilustra la región hipotalámica donde se encuentran los núcleos de regulación circadiana y de ingesta de alimento. modificado de (williams D.L. y W. Schwartz , 2005).

En condiciones de hambruna, la Grelina en el plasma tiene un máximo de concentración en sangre, que anticipa la ingesta diaria de alimento en mamíferos (Natalucci et al., 2005). La Grelina periférica del sistema digestivo puede actuar como una señal de retroalimentación para el SNC. (Banks et al., 2002; Li et al., 2006; Theander- Carrillo et al., 2006). La Grelina también puede ser sintetizada en el hipotálamo. Las proteínas inmunoreactivas al anticuerpo contra Grelina están presentes en los núcleos paraventricular, dorsomedial, ventromedial y núcleo arcuato, áreas importantes en la regulación circadiana (Cowley et al., 2003; Yi et al., 2006; fig 2).

## **METABOLISMO DE LA GLUCOSA**

La glucosa es una fuente de energía importante para el organismo. La concentración de glucosa en los vasos sanguíneos es regulada por varias hormonas, siendo la insulina y el glucagón dos de las más importantes.

Cuando los niveles de glucosa en la sangre se incrementan, se estimulan los siguientes procesos:

1. El músculo y las células adiposas remueven la glucosa de la sangre.
2. Las células metabolizan la glucosa y la transforman en ATP.
3. El hígado y el músculo almacenan la glucosa en forma de glucógeno.
4. El tejido adiposo almacena algunas de las reservas de glucosa en forma de lípidos.

5. Las células usan la energía de la glucosa para la síntesis de proteínas.

La insulina producida en los islotes del páncreas, provoca la formación de glucógeno en distintos tejidos. El glucagón, es la principal hormona que se opone a la acción de la insulina y es liberado también en el páncreas cuando la comida es escasa. El glucagón dispara el rompimiento del glucógeno para la producción de glucosa, siendo ésta la base para la producción de energía (catabolismo). En otras circunstancias, el glucagón también estimula el uso de las reservas de lípidos y proteínas para la formación de glucosa (Foster et al, 2003).

### **Regulación de la glucosa sanguínea**

La concentración de glucosa en la sangre no es constante, aumenta o disminuye dependiendo de las necesidades del cuerpo, y en ello participan varias hormonas. Los niveles sanguíneos de glucosa aumentan por diferentes razones, por ejemplo la ingesta de alimento, el tipo de dieta, el rompimiento del glucógeno o debido a la síntesis hepática de glucosa.

El hígado es el mayor reservorio de glucógeno; sin embargo, también produce glucosa a partir de intermediarios de carbohidratos, proteínas y del metabolismo de las grasas. Por otra parte, el hígado es el mayor consumidor de glucosa y por sí mismo puede amortiguar los niveles sanguíneos de glucosa. El hígado retira rápidamente grandes cantidades de glucosa de la circulación, tanto que después de la ingesta de comida, los niveles de glucosa en la sangre raramente suben arriba de 110 mg/dL en individuos no diabéticos.

Las células beta del páncreas son las encargadas de detectar el aumento de glucosa en la sangre después de la ingesta de alimento, dichas células responden liberando insulina. Cuando hay incremento de la glucosa se inhibe la liberación del glucagón y la producción de otras fuentes de glucosa, lo cual también reducen los niveles de glucógeno (Samaha *et al*, 2003).

### **Producción de glucógeno**

Después de la ingesta y absorción de alimento, parte de la glucosa es utilizada inmediatamente, pero otra cantidad tarda en ser utilizada y es almacenada por el hígado y el músculo. El glucógeno es producido en el hígado a partir de la glucosa a través de la actividad de la enzima glucógeno sintetasa hepática, mientras que la glucógeno fosforilasa hepática cataliza el desdoblamiento del glucógeno a glucosa en el hígado. La insulina estimula la formación de glucógeno en el músculo mediante el aumento en el número de transportadores de glucosa (GLUT 4). Esto conduce a una rápida captación de glucosa que es convertida en glucógeno dentro del músculo (Jeremy *et al*, 2001).

### **Producción de lípidos**

Cuando las provisiones de glucógeno son repuestas en su totalidad, el exceso de glucosa es convertido en grasa mediante el proceso llamado lipogénesis. En este proceso, la glucosa es convertida en ácidos grasos (AG) que son almacenados como triglicéridos (TG) en los adipositos (Stryer *et al*, 2001).

## **Papel del glucagón y el ayuno**

El ayuno se define como la ausencia de alimento por más de 8 horas. Esto trae como resultado la reducción de los niveles de glucosa en la sangre, la inhibición de la secreción de insulina y la liberación de glucagón. Una de las funciones más importantes del glucagón es promover el aumento de los niveles de glucosa en la sangre estimulando la movilización del glucógeno almacenado en el hígado y el rápido metabolismo de la glucosa. En un lapso de 10 a 18 horas, el glucógeno que se encuentra almacenado, se agota y si el ayuno continúa, el glucagón mantiene la estimulación de la producción de glucosa, favoreciendo así la captación hepática de aminoácidos (Samaha *et al*, 2003).

## **Producción de Glucosa**

Los carbohidratos se clasifican en: polisacáridos como (almidón) disacáridos como (sacarosa, maltosa y lactosa) y monosacáridos como (galactosa, glucosa y fructosa). La glucosa que se absorbe en el intestino deriva principalmente del almidón, constituye un 60 % de los carbohidratos regulados por el organismo diariamente, el 30% restante es en forma de sacarosa y un 10% lactosa. Los almidones son cadenas lineales de 200 a 2500 moléculas de glucosa denominada amilasa (aproximadamente 20%), también están las cadenas de glucosa ramificadas que se denominan amilopectina (80 % total de almidón). Estas largas moléculas son digeridas en el intestino, pero la polaridad de las hexosas requiere la absorción a través de la membrana hidrofóbica de la célula del intestino, lo que involucra la participación de 5 tipos de proteínas transportadoras de glucosa (GLUTs)

para la absorción y captación de esta molécula al interior de la célula. La glucosa y la galactosa son activamente dependientes del gradiente de  $\text{Na}^+$  proteínica transportadora de glucosa 1 (SGLT 1). La fructosa es transportada por GLUT 5.

Después de ingerir la comida, parte de la glucosa absorbida por el intestino es usada inmediatamente por las células como una fuente de energía. La glucosa que no es usada pasa a las reservas que se encuentran en el músculo y en el hígado en forma de glucógeno o es convertida en TG en los adipositos y en el hígado. En el músculo esquelético, la glucosa absorbida es convertida a glucógeno mediante la acción de la enzima glucogeno-sintetasa.

El rompimiento de glucógeno a glucosa es conocido como glucogenólisis. En condiciones tales como el ejercicio extremo, el aumento de catecolaminas promueve el metabolismo de la glucosa y la formación de lactato (glucólisis anaerobia muscular), el cual es usado por el hígado para la neoformación de glucosa, la cual nuevamente es descargada a la sangre para ser reutilizada por el músculo.

### **Anabolismo, Catabolismo y Fases del Metabolismo de la Glucosa**

Cuando se lleva a cabo un periodo de ayuno por un lapso de 10 horas y después se lleva a cabo el desayuno (estado de post-absorción), el nivel de glucosa en sangre permanece estable. Dependiendo del estado nutricional que presenta el organismo y de la reserva de glucosa hepática que se ha

usado, esta glucosa proviene de la combinación de la gluconeogénesis hepática y la glucogenolisis.

Después de la ingesta de alimento, las concentraciones de glucosa en la sangre se elevan y la magnitud del incremento depende no sólo del tipo de carbohidratos, sino también de la velocidad de la digestión y la absorción de los mismos. En la fase del anabolismo, la glucosa no es utilizada por las células, ésta es almacenada en el hígado o en el músculo en forma de glucógeno. En la fase del catabolismo, la glucosa es obtenida primero a partir de las reservas de glucógeno. La insulina tiene una acción anabólica sobre el metabolismo de la glucosa y el glucagón tiene una acción catabólica.

### **Acción de la insulina y el glucagón**

La insulina actúa en el hígado, el músculo y el tejido adiposo a través de receptores específicos. En el hígado, la insulina promueve la síntesis de glucógeno por la estimulación de la enzima glucógeno sintetasa y la inhibición de la glucógeno fosforilasa. La insulina induce la captación intracelular de glucosa en el músculo y en el tejido adiposo por los transportadores GLUT 4. La insulina también estimula la absorción de aminoácidos en el músculo, suprime el rompimiento de glucógeno hepático e inhibe la liberación de aminoácidos musculares y de AG del tejido adiposo.

El glucagón tiene acciones contrarias a las de la insulina. El glucagón promueve la movilización de glucosa. Su primera acción ocurre en el hígado donde se une a una proteína G y esto estimula la producción de AMPc. A través de una cascada de eventos intracelulares, el glucagón finalmente estimula al rompimiento de glucógeno a glucosa y la producción de glucosa a

partir de aminoácidos (gluconeogénesis). Además, estimula la liberación de AG del tejido adiposo y su entrada al hígado. Los AG en lugar de ser utilizados para la síntesis de TG sufren  $\beta$ - oxidación y forman cetoácidos. Por lo tanto, el glucagón tiene un efecto hiperglucemiante y otro cetogénico.

Existen otras hormonas que también son importantes para la regulación de la concentración de glucosa en la sangre, por ejemplo el cortisol, la adrenalina y la hormona de crecimiento, las cuales aumentan la concentración de glucosa en la sangre, por lo que estos son considerados reguladores opuestos a la insulina.

### **Estructura, síntesis y metabolismo de la insulina**

La insulina es sintetizada en las células- $\beta$  de los islotes del páncreas. Contiene 51 aminoácidos y su estructura es homóloga a la que presentan los factores de crecimiento 1 y 2 semejantes a la insulina y la relaxina. La insulina es secretada en pulsos cada 10 minutos, y aproximadamente el 50% de ella es removida por el hígado. La insulina que no es metabolizada por el hígado realiza acciones reguladoras sobre los tejidos periféricos.

### **OBESIDAD**

Aunque hoy se acepta que la obesidad puede ser el producto de la interacción de diversos factores conductuales, ambientales, nutricionales y genéticos. Algunos factores genético-moleculares se han señalado como los principales responsables de la regulación del peso corporal, entre ellos la adipogénesis, la regulación del comportamiento alimentario y la homeostasis energética. Aún cuando estos procesos bioquímicos determinan la sensación

de hambre, la saciedad, la apetencia por alguno tipo de alimento, la frecuencia y la cantidad de la ingesta, su mecanismo depende a su vez de condiciones ambientales (Woods *et al*, 1998).

El Sistema Nervioso Central es capaz de detectar el estado y actividad de las reservas energéticas. En este proceso intervienen la leptina y otras moléculas de señalización (Woods *et al*, 1998). El incremento de la adipogénesis es otro de los factores que se piensa podría estar involucrado en el desarrollo de obesidad, pues este proceso conlleva a la formación de nuevos adipocitos y a mayores depósitos de tejido adiposo en el organismo (Morrison y Farmer, 1999). Otro de los procesos que ha sido considerado factor clave en la etiología de la obesidad es la desregulación de la eficiencia energética. Es conocido que en los mamíferos la termogénesis constituye un mecanismo avanzado para producción de calor a partir de la energía contenida en los alimentos. Por medio de este proceso, la energía de los alimentos que consumimos en exceso es aprovechada sólo en parte y puede acumularse como grasa (Lowell y Spiegelman 1999). La familia de las termogeninas son la base molecular de la termogénesis, su actividad determina el desacoplamiento energético de las mitocondrias, con lo que parte de la energía de los alimentos se aprovecha para la producción de calor (Ricquier y Bouillaud, 2000).

La regulación adrenérgica del metabolismo lipídico, requiere la movilización de lípidos, mediada por la enzima lipasa sensible a hormonas (LSH) y el almacenamiento de AG a través de la enzima lipoproteína lipasa (LPL). Se ha señalado que la desregulación de este balance también podría estar implicada en el desarrollo de la obesidad.

Cuando un animal presenta un periodo largo de privación de alimento, se observa una reducción de los depósitos de energía, lo cual lleva a un aumento de la búsqueda de alimento. Contrariamente, en prolongada abundancia de alimento, la ingesta de éste se reduce y el gasto de energía se incrementa para evitar el desarrollo de obesidad (Woods *et al*, 1998). Entre los mecanismos a través de los cuales el organismo puede percatarse de los niveles de energía presentes en él, se ha propuesto la existencia de una señal en la que parece estar involucrado el (SNC), particularmente el hipotálamo, ya que varias alteraciones químicas y físicas en esta estructura cerebral pueden producir algunos síndromes acompañados de importantes disfunciones metabólicas, muchas de las cuales pueden llevar al desarrollo de la obesidad (Bray *et al*, 1990).

La teoría lipostática sugiere la existencia de un mecanismo mediante el cual el tejido adiposo a través de la secreción de leptina puede actuar sobre el SNC controlando la ingesta de alimento (Kennedy *et al* 1997). La comprobación de la expresión en el hipotálamo del gen relacionado con la obesidad (Tartaglia *et al*, 1995) y la identificación de los receptores de la leptina (db o Lepr) han demostrado la existencia de ciertos mecanismos a través de los cuales las señales periféricas se relacionan con los centros cerebrales influyendo sobre la ingesta de alimento y la regulación del gasto energético (Chen *et al*, 1996 y Lee *et al*, 1996).

La ingesta de alimento está regulada por dos sistemas: en el control a corto plazo participan señales físicas y la liberación de péptidos digestivos, mientras que el control a largo plazo es regulado por la leptina producida por el tejido adiposo.

La leptina que se encuentra libre se une con receptores cerebrales (productos de los genes *db* o *Lepr*) y actúa como regulador interno del apetito y de la homeostasis del peso corporal a través de la detección del nivel de reservas energéticas (Kieffer y Habener, 2000). Como respuesta al exceso de tejido adiposo, la leptina secretada disminuye la producción de neuropéptidos en el hipotálamo, lo que produce una sensación de saciedad y la disminución del apetito, un aumento de la termogénesis y del gasto energético (Hernández y Perlemuter, 1997; Cerulli *et al*, 1998; Proietto, 1998).

Desde hace tiempo en animales, incluido el humano, se han identificado y descrito por lo menos 300 mutaciones genéticas implicadas en el desarrollo de la obesidad. (Chagnon *et al*, 2000; Palou *et al*, 2000). Un caso particular son los roedores obesos con defectos en el gen *ob* (Leptina)(Montague *et al.*, 1997; Chagnon *et al*, 2000; Strobel, *et al*, 1998), y aquellos con mutaciones en el gen *Lepr* o *db* (receptor de leptina), Clement *et al*, 1998. Los ratones obesos con la mutación *ob* carecen de leptina (Zhang *et al*, 1994), mientras que los ratones obesos con la mutación *db* son insensibles a dicha hormona debido a la mutación del gen que codifica para los receptores de la leptina (Chua *et al*, 1996). Aunque en la mayoría de los animales experimentales la obesidad es causada por mutaciones simples de genes individuales (Comuzzie y Allison, 1998), debe decirse que la situación en humanos, aparte del número reducido de casos con mutaciones simples causantes de obesidad, es mucho más compleja, ya que las formas más comunes de obesidad humana dependen de la interacción de múltiples genes (Palou *et al*, 2000), de la influencia de diversos factores ambientales y de los hábitos de comportamiento y estilo de vida.

## SÍNDROME METABÓLICO

El síndrome metabólico (SM) es una enfermedad constituida por un conjunto de anormalidades que son el resultado de la interacción de varios factores aterogénicos, genéticos y ambientales. La presencia de resistencia a la insulina (RI) es una de las características principales de este síndrome; sin embargo, en el transcurso de su desarrollo también puede observarse obesidad, hiperinsulinemia, deterioro de la tolerancia a la glucosa y de la glucemia basal, así como dislipidemia, hipertensión y otras alteraciones relacionadas con la presencia de RI (Eckel *et al*, 2005). Estudios realizados por Hanley y Meigs, mostraron que la RI es causante de varias pero no de todas las anomalías observadas en el SM (Meigs *et al*, 1997; Hanley *et al*, 2002). Característicamente los pacientes con SM presentan anormalidades en el metabolismo de los carbohidratos, de los lípidos, hiperinsulinemia y RI, estas últimas alteraciones actúan como nexo de unión entre la obesidad, la hipertensión y la intolerancia a la glucosa (Modan *et al*, 1995). Es sabido que factores genéticos y ambientales, están fuertemente involucrados en el desarrollo de la obesidad. Asimismo, muchos estudios han mostrado interés en la identificación de algunos aspectos de la adipogénesis que permitan establecer los factores causales involucrados en el desarrollo del SM. Estudios recientes han sugerido que la obesidad abdominal puede estar relacionada tanto con el aumento de la glucemia basal como con el desarrollo RI en los tejidos periféricos (Despres, 1992).

Recientemente se ha establecido que el tejido adiposo además de ser la fuente principal de los ácidos grasos libres (AGL), es también un órgano secretor muy activo que puede producir varias moléculas que actúan como

biomarcadores de la actividad de este tejido (Sander *et al*, 2003). Entre esas moléculas se encuentran las adipocitocinas, tales como la leptina, la adiponectina y la resistina.

La concentración plasmática de la leptina esta directamente relacionada con la cantidad de tejido adiposo, se incrementa en la obesidad así como en los estados de RI. Gracias a la presencia de la leptina, se deprime el apetito y se incrementa el gasto energético, cuando se encuentran alteraciones en esta hormona, el individuo presenta hiperfagia y disminución del gasto energético, lo que da como resultado el desarrollo de obesidad. Estudios recientes sugieren que la leptina interfiere en la utilización de la glucosa a nivel del músculo esquelético predisponiendo al desarrollo de RI (Despres, 1992).

### **Relación del SM con la RI**

Se ha sugerido que la RI podría ser la responsable del desarrollo de las anomalías que se observan en el SM, consideradas como factores de riesgo de enfermedad cardiovascular y Diabetes Mellitus tipo 2. En animales como en humanos con diabetes mellitus tipo 2 la RI involucra la reducción de la sensibilidad a la actividad de la insulina por sus principales células blanco: músculo esquelético, los adipocitos y el hígado, por lo que el efecto fisiológico de la insulina se ve disminuido, este hecho a su vez conduce a un déficit en la utilización de la glucosa, esta alteración es compensada por un aumento de la síntesis y de la secreción de insulina por las células  $\beta$ -pancreáticas, y por lo tanto se desarrolla hiperinsulinemia. En el SM los efectos que provoca la RI en el metabolismo de la glucosa involucran deficiencias en la capacidad de la

insulina para suprimir la producción de glucosa hepática, así como un déficit en la captación y el metabolismo de la glucosa en los tejidos sensibles a la insulina (Carmona, 2006).

## **CARACTERÍSTICAS DEL RATÓN DE LOS VOLCANES**

### ***Neotomodon alstoni alstoni***

El ratón de los volcanes *Neotomodon alstoni* (Merriam, 1918) pertenece al orden Rodentia y a la familia Cricetidae. Este roedor es una especie endémica de México con distribución restringida al Eje Neovolcanico Transversal; vive por encima de los 2500 msnm en bosque mixto de pino-oyamel en las partes altas y pino encino en las partes bajas. Tanto en condiciones de cautiverio como en vida silvestre el ratón de los volcanes se reproduce todo el año, con mayor reproducción en las estaciones de primavera-verano. Presenta un ciclo estral con una duración promedio de 4.5 días y un periodo de gestación de 27 días (Luis, D. J, 1990. Álvarez y Mayo-Aceves, en 1993 analizaron el contenido estomacal del ratón de los volcanes de diferentes regiones del Valle de México y propusieron que la dieta de este roedor esta compuesta por plantas herbáceas como *Trifolium*, *Bidens triplinervia* (*Compositae*) y *Rumex acetocella* (*Poligonaceae*); también se alimentan de frutos como fresas y zarzamoras, en la temporada de lluvias y capulincillo a finales del año; granos de polen de *Trifolium*, *Ambrosia*, *Salvia*, *Espirantes*, *Rhus*, *Ribes*, *Salix*, *Agnus*, *Pinus* y *Quercus*. A su dieta se pueden sumar algunos Artrópodos del orden *Coleoptera* (*Scarabaeidae*, *Tenebrionidae*, *Carabidae* y *Curculionidae*); así como hormigas (*Formicidae*) y larvas de lepidópteros (*Noctuidae*). Con los datos obtenidos estos investigadores concluyeron que las diferencias observadas en los residuos

estomacales de los ratones de las diferentes regiones, dependían de variaciones ecológicas y estacionales, por lo que la dieta del ratón de los volcanes en la temporada de secas (Noviembre-Abril) esta conformada principalmente de tejidos vegetales; mientras que en la época de lluvias (Mayo-Octubre) se compone principalmente de insectos (Alvarez,T y Mayo-Aceves, E.1993).

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Diversos estudios realizados en ratones han relacionado el desarrollo de obesidad con la disfunción del núcleo supraquiasmático, y en particular, ratones heterocigóticos con la mutación del gen *clock* que son obesos (Williams y Swartz, 2005; Turek *et al*, 2005). El Ratón de los volcanes *Neotomodon alstoni alstoni* presenta una tendencia natural al desarrollo de obesidad y al de otras alteraciones metabólicas observadas en el SM, lo que lo hace un sujeto de estudio ideal para comparar las variaciones diarias y circadianas en el metabolismo energético, particularmente el de la captación de la glucosa en los tejidos, entre animales normales y ratones obesos.

#### **IV JUSTIFICACIÓN**

La colonia del Ratón de los Volcanes *Neotomodon alstoni alstoni* que existe en el Bioterio de la Facultad de Ciencias de la UNAM ha sido mantenida bajo un sistema exogámico desde 1977. En 1989, se observó que este roedor presenta alta tendencia al desarrollo de obesidad sin una dieta especial, indicando que era posible incrementar su predisposición al desarrollo del fenotipo obeso. Años más tarde, se estableció que el Ratón de los Volcanes podía desarrollar lipomatosis y esteatosis hepática debido a la presencia de obesidad, por lo que estos roedores fueron denominados OLEH (obeso, lipomatoso, con esteatosis hepática). Un rasgo característico de estos ratones obesos es su propensión al desarrollo postprandial de altos niveles de glucosa después de una carga de glucosa (intolerancia a la glucosa); sin embargo, bajo condiciones de ayuno los ratones obesos son euglicémicos. Además, aunque también desarrollan hiperinsulinemia postprandial e hipertrigliceridemia basal los ratones no muestran un estado clínico de diabetes tipo 2. Este ratón puede ser sin duda un modelo animal de gran interés para el análisis fisiológico del SM, ya que las alteraciones observadas en él son muy similares a las que se presentan en los humanos con esta enfermedad (Carmona 2006).

## **V. HIPÓTESIS**

Si la obesidad es consecuencia en parte, de alteraciones de los mecanismos neurales circadianos y del control de metabolismo, entonces las respuestas diarias y circadianas de captación de glucosa en los diversos tejidos en animales normales deberán ser distintas a las que presentan los animales obesos.

## **VI. OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Observar si se presentan diferencias en la capacidad de captación de glucosa, evaluada mediante pruebas de tolerancia a la glucosa (CTG), a dos horas opuestas del ciclo diario y circadiano del ratón de los volcanes *Neotomodon alstoni alstoni* y si tales diferencias son afectadas por la obesidad.

### **Objetivos Particulares**

1. Observar mediante la CTG, si existen diferencias significativas entre el día y la noche en la captación de glucosa en animales normales.
2. Observar si estas diferencias persisten en el tiempo circadiano correspondiente (mitad del día y la noche subjetivos).
3. Determinar si los niveles circulantes así como la capacidad de captación de glucosa, se modifican por la actividad en sí misma o si es subyacente una regulación circadiana.
4. Comparar con los ratones normales, si existen diferencias en la capacidad de captación de la glucosa en el ciclo diario y circadiano en los animales obesos.

## VII. MATERIAL Y MÉTODO

### HORARIO DE TOMA DE MUESTRAS EN FOTOPERIODO Y DÍA SUBJETIVO

Se usaron 5 ratones machos normales ( $50 \pm 5$ g) y 5 ratones machos obesos (60 g o más) *N alstoni* obtenidos de una colonia existente en el Bioterio de la Facultad de Ciencias. Los animales tenían un intervalo de edad de 300 a 350 días, y antes de determinar su tolerancia a la glucosa se alojaron durante 3 semanas bajo en un fotoperiodo de luz-oscuridad 12:12 (fotofase de 07-19:00 h). Durante este periodo de tiempo fueron mantenidos individualmente en jaulas experimentales y se alimentaron con nutricubos para roedores pequeños (Rodent Laboratory Chow 5001, Purina, Co.) y agua *ad libitum*. En los animales sometidos a fotoperiodo 12:12 las muestras de sangre fueron tomadas a la mitad de la fase luminosa (entre 12 a 13 h).

Para realizar la CTG en el día subjetivo. Los animales provenientes de fotoperiodo 12:12, fueron colocados en un ambiente de luz roja tenue (2 lx) durante 24 horas antes de la toma de muestras, al día siguiente las muestras de sangre para la detección de glucosa, fue realizada aproximadamente de las 12 a 13 horas, bajo la misma intensidad de iluminación, y extrapolando así la fase de reposo o “día subjetivo” que tendría el animal si estuviese aún en LO,

Con el fin de descartar si el movimiento durante la fase de actividad, podría ser un factor que modificara la concentración sanguínea de glucosa, durante la prueba de tolerancia: a un grupo de 5 ratones normales se les

sometió a cajas de restricción gradualmente durante una semana, desde 1 hasta 5 horas diarias, con el fin de reducir el estrés de los animales y al final mantenerlos durante 72 horas continuas antes de la toma de muestras. Durante las condiciones de restricción de movimiento todos los animales podían comer y beber, y una vez adaptados a la restricción, se les realizó una prueba de tolerancia a la glucosa a la mitad de la fase nocturna, la cual es donde el animal suele ser más activo.

### **Toma de muestras en escotoperiodo y noche subjetiva**

Para realizar las pruebas de tolerancia a la glucosa durante la noche, los animales fueron mantenidos en fotoperiodo invertido OL, 12:12 durante tres semanas (encendido de luz a las 19:00 y apagado a las 07:00 h). La CTG fue tomada al término de este periodo a las 12-13 horas del día, en la mitad de la fase oscura (escotoperiodo). Entre cada una de las pruebas, los animales se dejaron en recuperación durante al menos dos semanas.

Para obtener la CTG en la noche subjetiva; los animales recuperados del tratamiento anterior, fueron expuestos a luz roja tenue constante durante al menos 24 h para que al siguiente día la toma de muestras se hiciera a las 12 h del día, de esta manera se obtuvieron las muestras de sangre para la CTG a mitad de la noche subjetiva de los animales.

Ambos grupos de ratones fueron mantenidos en un rango de temperatura de 18 a 23 ° C, humedad ambiental (50 a 60 % de humedad relativa) y se alimentaron con nutricubos y agua *ad libitum*.

## **OBTENCIÓN DE LA CURVA DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA**

De manera convencional, la curva de tolerancia a la glucosa se construye mediante la cuantificación de la glucosa basal de un animal en ayuno, y después de la administración de una carga de glucosa se determina, mediante muestras sanguíneas obtenidas a intervalos regulares, en cuanto tiempo se regresa a los niveles basales. La velocidad mediante la cual se lleva a cabo el regreso a los niveles basales depende de la eficiencia con que la glucosa es retirada del torrente sanguíneo hacia los tejidos (captación de glucosa).

Para cada uno de los grupos mencionados en los apartados anteriores, la toma de muestras de sangre para la obtención de la curva de tolerancia a la glucosa (CTG) se hizo en ratones mantenidos en ayuno durante al menos 12 horas. Los ratones, tanto obesos y normales, fueron anestesiados en una cámara con éter etílico. Una vez inconcientes, las muestras de sangre fueron obtenidas de la vena coccígea (aprox. 40 $\mu$ l) mediante un corte en la punta de la cola, entonces se determinó inicialmente la glucemia basal y posteriormente, a cada uno de estos animales se les administró una solución de glucosa al 50% a una dosis de 2.5g/Kg de peso corporal por vía intraperitoneal (tiempo cero). A los 30, 60, 90 y 120 minutos siguientes, bajo anestesia con éter, se les extrajo nuevamente una gota de sangre para determinar los cambios en su glucemia a lo largo de 2 horas y construir la curva de tolerancia a la glucosa para cada organismo. La cuantificación de la glucosa sanguínea se realizó a través del método glucosa oxidasa peroxidasa con tiras reactivas para glucómetro One Touch (LifeScan, Johnson and Johnson, Co. California, U.S.A.)

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos de concentración de glucosa, obtenidos entre el día y la noche, así como los de tiempo subjetivo, fueron graficados en EXCEL y comparados mediante la prueba de T de Student para muestras no pareadas, mediante el programa STATISTICA, las diferencias significativas entre los grupos de datos fueron consideradas cuando  $P < 0.05$ . Los datos de todas las determinaciones y tratamientos se presentan con el promedio estadístico  $\pm$  el error estándar correspondiente. La capacidad de depuración glucosa, lo que significa la captación de glucosa por los tejidos, que presentaron los diferentes grupos de ratones, se determinó mediante el cálculo del área bajo la curva de tolerancia a la glucosa, la cual fue calculada como la integral de la curva de glucemia cuantificada a los 0, 30, 60 y 120 minutos, mediante el programa *Origin Pro* versión 7.0 y la siguiente fórmula:

$$\sum_{i=1}^{k-1} (t_{i+1} - t_i) \times \frac{G_{i+1} + G_i}{2} - G_0$$

Donde:

$t_i$  = tiempo (min) del muestreo sanguíneo;  $i = 1 \dots k$

$G_0$  = valor de la glucemia inicial

$G_i$  = glucemia promedio (mg/dL) en  $t_i$

$k$  = número de muestras sanguíneas

## **DETERMINACIÓN DEL ESTADO DE OBESIDAD.**

El peso y la longitud naso-anal fueron los parámetros para que, mediante el índice Lee (White *et al* 2005) se seleccionaron a los ratones obesos. Ambos parámetros, se establecieron antes de someter a los animales a un período de ayuno de 12 horas. Los ratones fueron pesados utilizando una balanza de triple brazo con platillo-paleta (OHAUS). Una vez pesados, los ratones se anestesiaron con éter etílico para cuantificar su longitud naso-anal y determinar el valor del índice Lee mediante la fórmula:

$$\text{Índice Lee} = 3 \sqrt{\text{Peso corporal (g)} / \text{Longitud naso anal (mm)} \times 104}$$

Mientras mas obesos sean los organismo, se presentara un mayor Índice Lee.

## DISEÑO EXPERIMENTAL

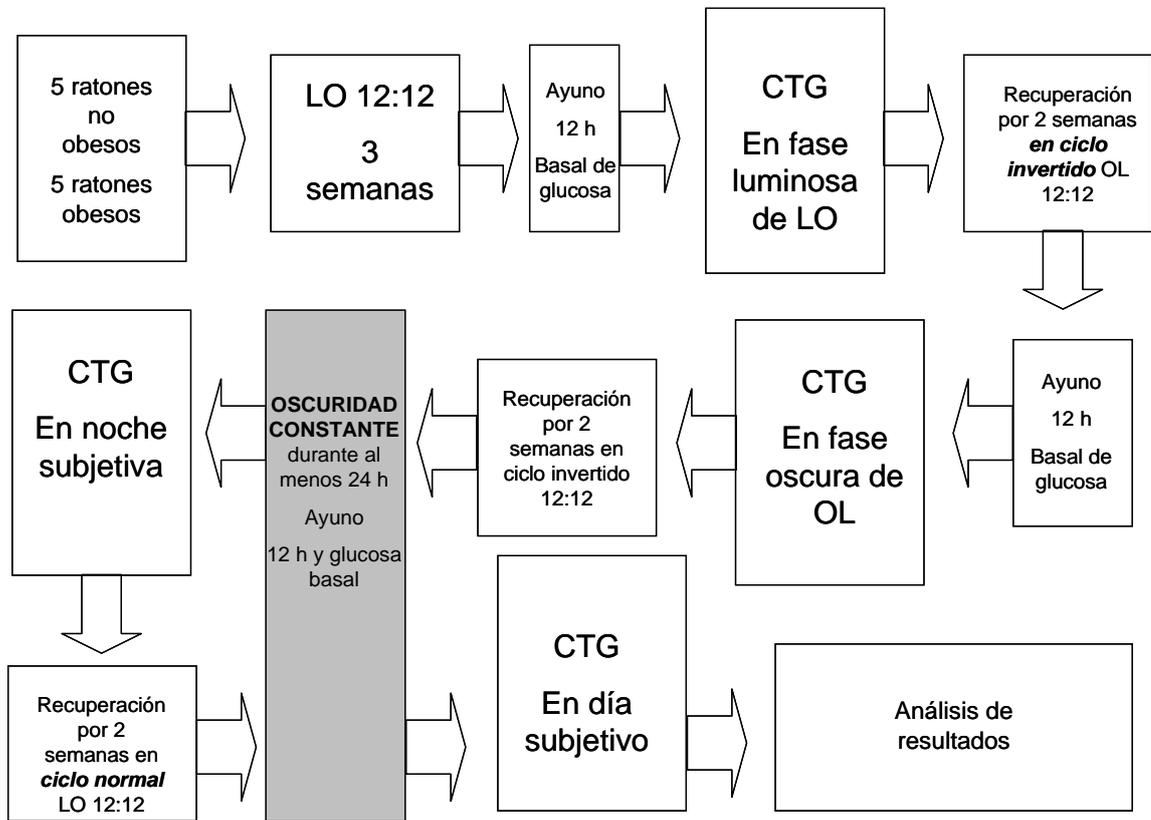


Figura 3 Diagrama de flujo que explica la secuencia de eventos a lo largo del diseño experimental.

## VIII. RESULTADOS

### Comparación de la CTG en ciclos LO (día vs noche)

La figura 4 superior, muestra los valores la CTG al medio día (círculos vacíos) y media noche (círculos llenos) en los ratones normales. Durante el día y a lo largo de los 120 minutos de muestreo, se presentaron valores de glucemia más elevados que durante la noche. Se observaron diferencias significativas de los niveles de glucosa entre el día y la noche a los 0 y 60 minutos ( $p < 0.05$ ). Aunque en ambos horarios, el nivel de glucemia observado a los 120 minutos de la CTG mostró una tendencia a disminuir, no se redujo a los niveles originales. Los valores del área bajo la curva fueron  $11863 \pm 3703$  para el día y  $10416 \pm 2553$  unidades relativas (UR) para la noche.

La figura 4 inferior, muestra el promedio de los valores de glucosa obtenidos en las muestras de los animales obesos. En general, se presentaron niveles de glucemia más altos durante el día, donde se detectaron diferencias significativas a los 30 a los 120 minutos de la CTG ( $P < 0.05$ ). De manera notable, la captación de la glucosa en los animales obesos es mucho más lenta durante el día. Aunque se noto gran variabilidad en los valores de glucosa en este grupo. También se observó que la tendencia a disminuir la concentración de glucosa es mucho más lenta comparada con los animales normales a los 120 minutos de la CTG.. Los valores de área bajo la curva fueron  $10946 \pm 4959$  para el día y  $6135 \pm 2346$  UR para la noche.

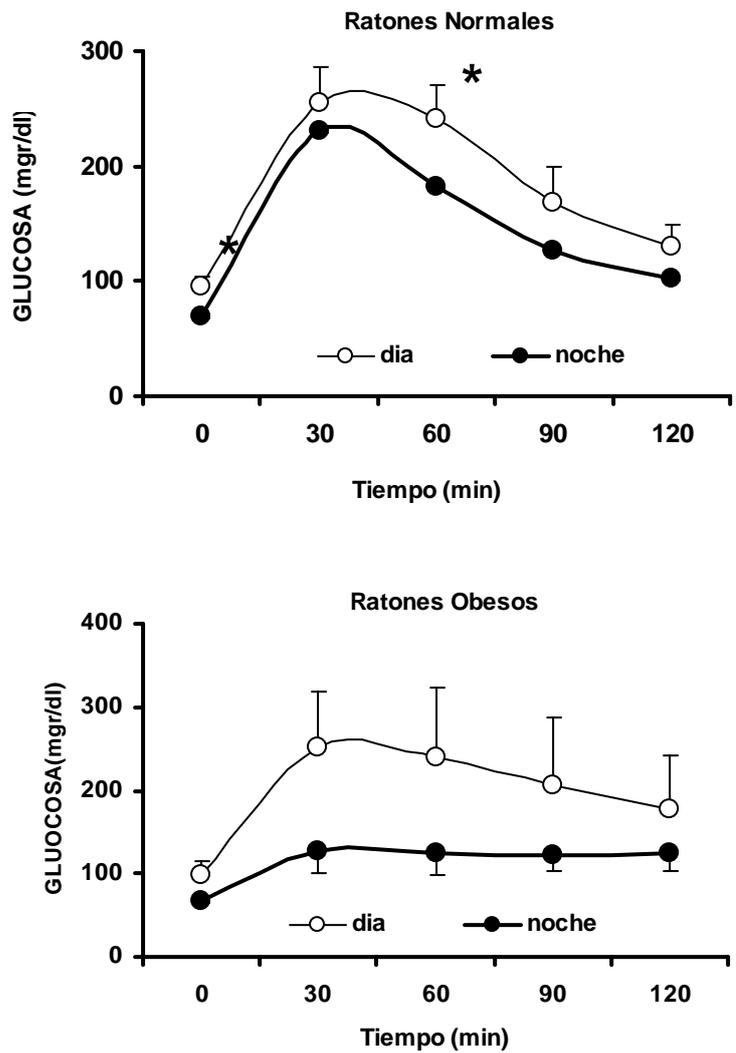


Fig. 4 CTG durante el día (círculos blancos) y la noche (círculos negros) entre ratones normales (gráfica superior) y obesos (gráfica inferior). Los asteriscos indican diferencias significativas entre los promedios correspondientes al mismo tiempo de muestreo después de la inyección de una carga de glucosa. (tiempo 0 indica la concentración basal de glucosa previa a la inyección).

## Comparaciones de CTG en la misma fase

La figura 5 superior se muestra la comparación de la CTG obtenida durante el día, entre animales normales y obesos. En ambos, la CTG, mostró su máximo nivel entre los 30 y 60 minutos después de la administración intraperitoneal de glucosa, sin embargo, la glucemia en los ratones obesos se mantuvo con una tendencia elevada hasta los 20 minutos, no se detectaron diferencias significativas. En los ratones normales, los valores del área bajo la curva para el día fueron  $11863 \pm 3703$  UR y el valor del área bajo la curva de los ratones obesos fue  $10946 \pm 4959$  UR. Estas diferencias entre los valores no fueron estadísticamente significativas.

En la figura 5 inferior, se muestra que a los 30 minutos de la CTG los ratones normales presentaron un nivel de glucosa significativamente mayor al de los obesos ( $p < 0.05$ ); sin embargo, en los animales normales esta tendencia no se mantuvo a lo largo de la curva, pues la glucemia rápidamente disminuyó hacia valores cercanos a los basales. Contrariamente, aunque en los ratones obesos los niveles de glucosa de los 30 a los 120 minutos fueron bajos, estos fueron más estables y no retornaron a su nivel basal. Los valores del área bajo la curva de los ratones normales durante la noche fueron  $10416 \pm 2553$  y para los obesos  $6135 \pm 2346$ . No se observaron diferencias significativas.

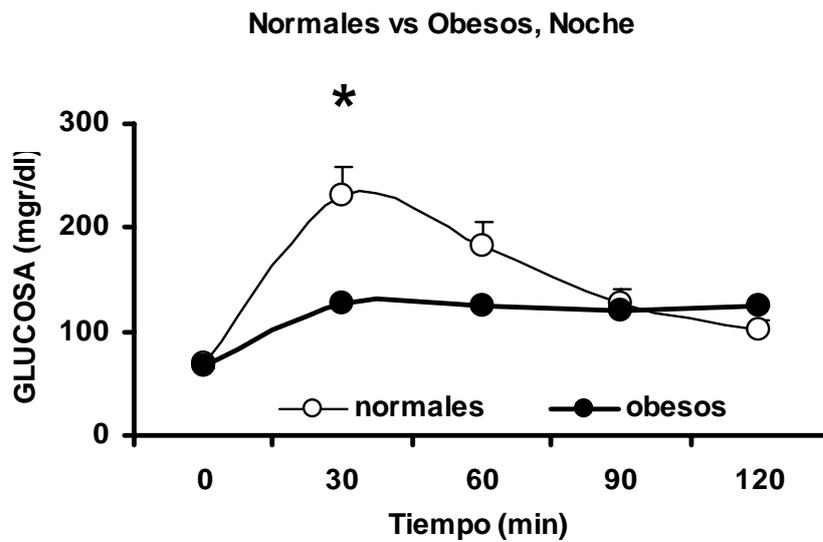
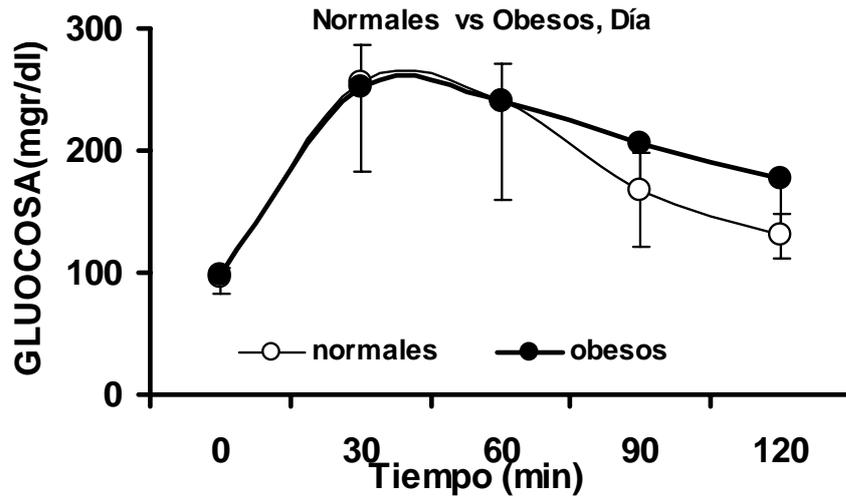


Fig. 5 La comparación de las CTG entre los animales normales y obesos durante el día no mostró diferencias estadísticas significativas y durante la noche sólo mostró diferencias a los 30 minutos de la prueba. La recuperación de la glucemia basal es, sin embargo, más rápida en los animales normales (círculos blancos).

## **Comparación de la CTG entre el día y la noche subjetivos**

La figura 6 superior, muestra que durante el día subjetivo los niveles de glucemia en los ratones normales, es mayor que durante la noche subjetiva. Se detectaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) a partir de los 60 hasta los 120 minutos de la inyección de la carga de glucosa y no retornaron a sus niveles de glucosa basal en las muestras del día subjetivo. Los valores del área bajo la curva para el día subjetivo fueron  $10794 \pm 2266$  UR y para la noche subjetiva  $4840 \pm 464$  UR; entre los cuales se detectaron diferencias ( $p = 0.019$ ).

En la figura 6 inferior, se muestra que durante la noche subjetiva, los ratones obesos tuvieron valores de glucemia más altos que durante el día subjetivo. Se observaron diferencias estadísticas entre los valores correspondientes desde los 30, 60, 90 y 120 minutos de la CTG. La glucemia de los ratones obesos durante la noche subjetiva, después 120 minutos no regresa a sus niveles basales originales. La figura incluye el error estándar de cada promedio, sin embargo, la variabilidad es enmascarada por los círculos que indican el valor promedio. Los valores del área bajo la curva del día subjetivo fueron  $7500 \pm 3266$  UR y para la noche subjetiva  $19110 \pm 1992$  UR ( $p = 0.0229$ ).

### Dia vs Noche subjetivos, Normales

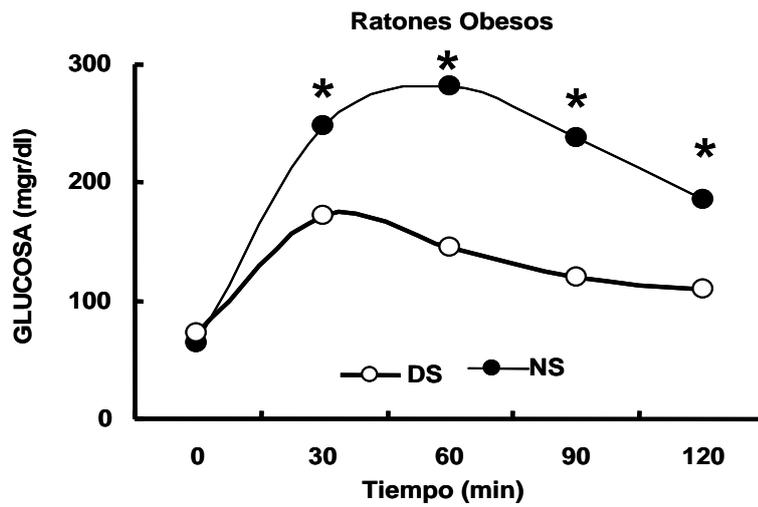
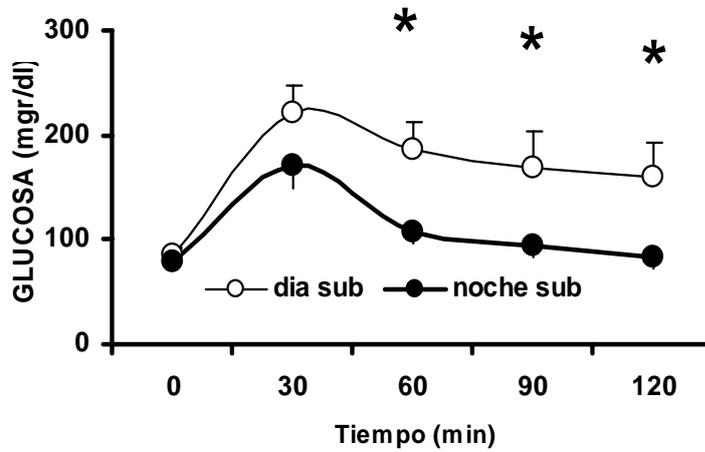


Fig. 6 CTG entre el día (DS) y la noche (NS) subjetivos en normales (gráfica superior) y obesos (gráfica inferior). Como se observa, la CTG de los ratones obesos en noche subjetiva fue significativamente más alta a la de los obesos en día subjetivo. (\*  $p < 0.05$ )

## **Comparaciones de CTG en la misma fase circadiana**

La figura 7 superior muestra la comparación de los datos promedio obtenidos en animales obesos y normales durante el día subjetivo. Pese a que los ratones normales presentaron a lo largo de la CTG mayores niveles de glucemia que los observados en los animales obesos; no se observaron diferencias significativas entre los dos grupos, y hasta los 120 minutos, ninguno de los organismos regresó a sus niveles de glucemia basal. El área bajo la curva para los ratones normales durante el día subjetivo fue  $10794 \pm 2266$  UR, mientras que para los obesos el área bajo la curva mostró menor amplitud y su valor durante el día subjetivo fue  $7500 \pm 3266$  UR, sin diferencias significativas.

En la figura 7 inferior se muestra que durante la noche subjetiva, los ratones obesos tuvieron una mayor concentración de glucosa a lo largo de la curva que los animales normales. Se detectaron diferencias significativas a los 60, 90 y 120 minutos de la CTG. A diferencia de los ratones normales, los ratones obesos no retornaron a sus niveles basales de glucemia. Además se observaron diferencias estadísticas significativas entre los valores del área bajo la CTG de los obesos y normales ( $19110 \pm 1992$  vs,  $4840 \pm 464$  UR, respectivamente).

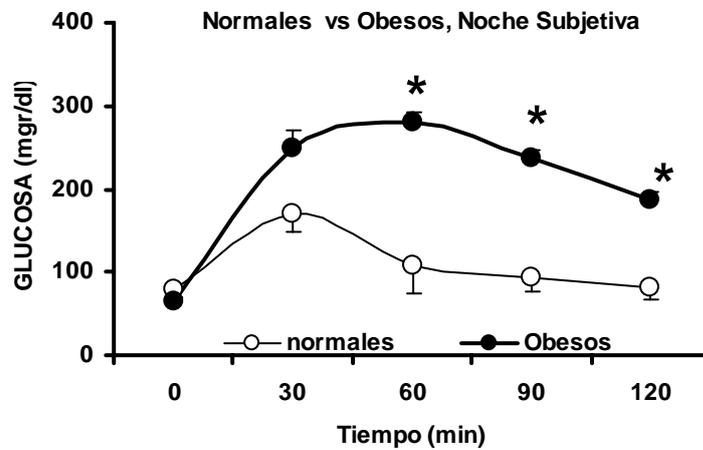
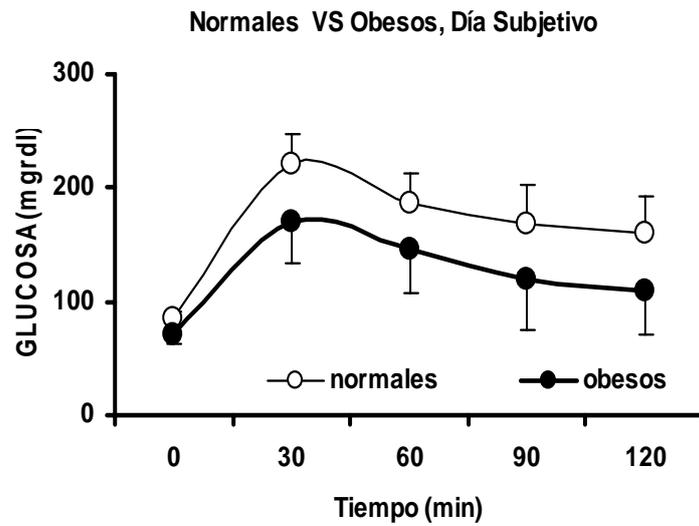


Fig. 7 Comparación de la CTG entre animales normales y obesos durante el día y noche subjetivos. No se detectaron diferencias significativas durante el DS (gráfica superior). La CTG de la figura inferior, muestra que hay diferencias claras entre los animales normales (círculos blancos) y obesos (círculos negros) durante la noche subjetiva. (\* $p < 0.05$ ).

## **Variaciones de la CTG en la exposición a ciclos de LO y a oscuridad constante**

La figura 8, muestra las CTG obtenidas tanto en animales normales como en obesos. Las dos gráficas superiores muestran los datos obtenidos durante la fase luminosa del fotoperiodo comparado con los obtenidos en la fase del día subjetivo (DS). Las dos gráficas inferiores comparan en cada una, los datos obtenidos durante la fase oscura del fotoperiodo y los correspondientes a la noche subjetiva.

Tanto organismos obesos y normales, presentan valores de glucemia, con tendencias a ser mayores cuando los animales están expuestos a ciclos de luz y oscuridad (círculos blancos), sin embargo no se detectaron diferencias significativas durante el día y día subjetivo.

Por otra parte las comparaciones de de noche y noche subjetiva, muestran diferencias importantes en los organismos obesos, pues los valores de glucemia fueron significativamente mayores en condiciones de oscuridad constante, que aquellos obtenidos en los ciclos de LO. Los ratones normales mostraron valores de glucemia mayor en oscuridad constante, pero las diferencias significativas se detectaron solo al minuto 60 de la inyección de glucosa.. Esta comparación es importante debido a que la forma en la que se regula la glucosa, puede ser influida por la condición luminosa en la que se encuentra el organismo.

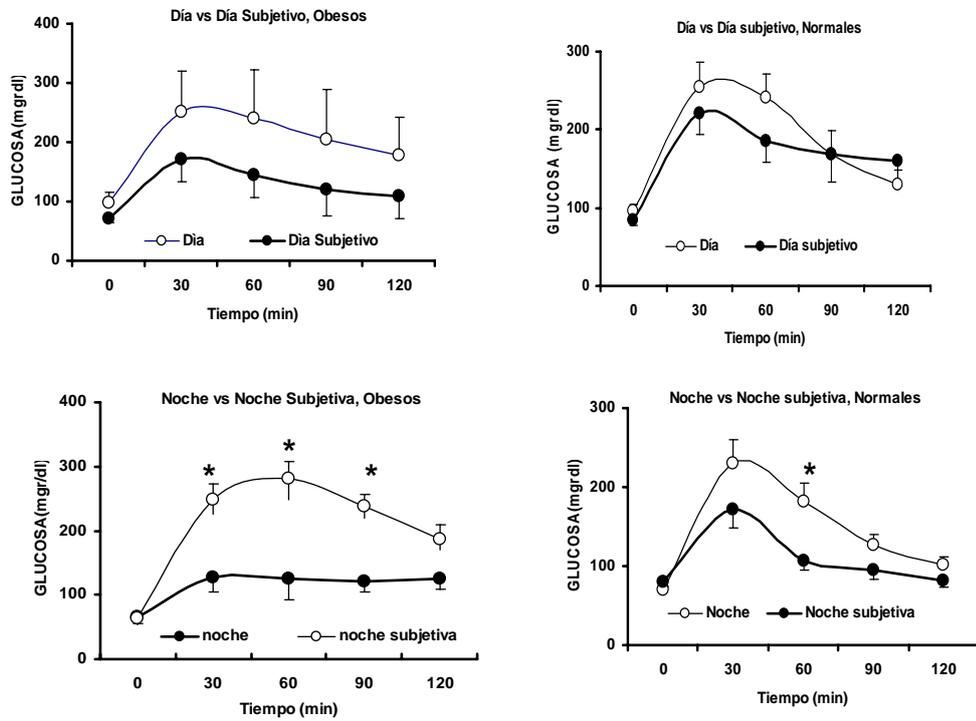


Figura 8

Comparación de fases entre los distintos grupos de animales, bajo distintas condiciones de iluminación. De lado izquierdo se muestran los valores de glucemia obtenidos en animales normales, mientras que del lado derecho se muestran las gráficas de los valores de glucemia correspondientes a los animales obesos. El asterisco indica donde se detectaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

En la Fig. 9 las barras representan el área bajo la CTG de los ratones normales, la cual es indicativa de la capacidad que exhibieron estos roedores para depurar la glucosa sanguínea a lo largo de los 120 minutos de la prueba de tolerancia a la glucosa. Como se observa en la Fig. 9, los ratones normales mantenidos bajo fotoperiodo 12:12 mostraron durante el día una mayor área bajo la CTG, esto significa que bajo esta condición estos animales presentaron una menor capacidad para depurar la glucosa sanguínea, lo que es lo normal. Por otra parte, a pesar de que durante la noche el área bajo la CTG de los ratones normales también fue elevada, ésta fue menor a la observada en el día.

Durante el día subjetivo la depuración de glucosa de los ratones normales también fue reducida, pero en comparación con la observada durante el día fue afectada en menor grado.

El área bajo la CTG de los ratones normales durante la noche subjetiva fue la que presentó una reducción significativa, lo cual indica que la depuración de glucosa fue mucho más rápida bajo esta condición. Es importante señalar que se observaron diferencias estadísticas significativas en el área bajo la CTG de los ratones normales al comparar la noche vs noche subjetiva, así como entre el día subjetivo vs la noche subjetiva ( $p < 0.05$ , respectivamente).

### Ratones normales

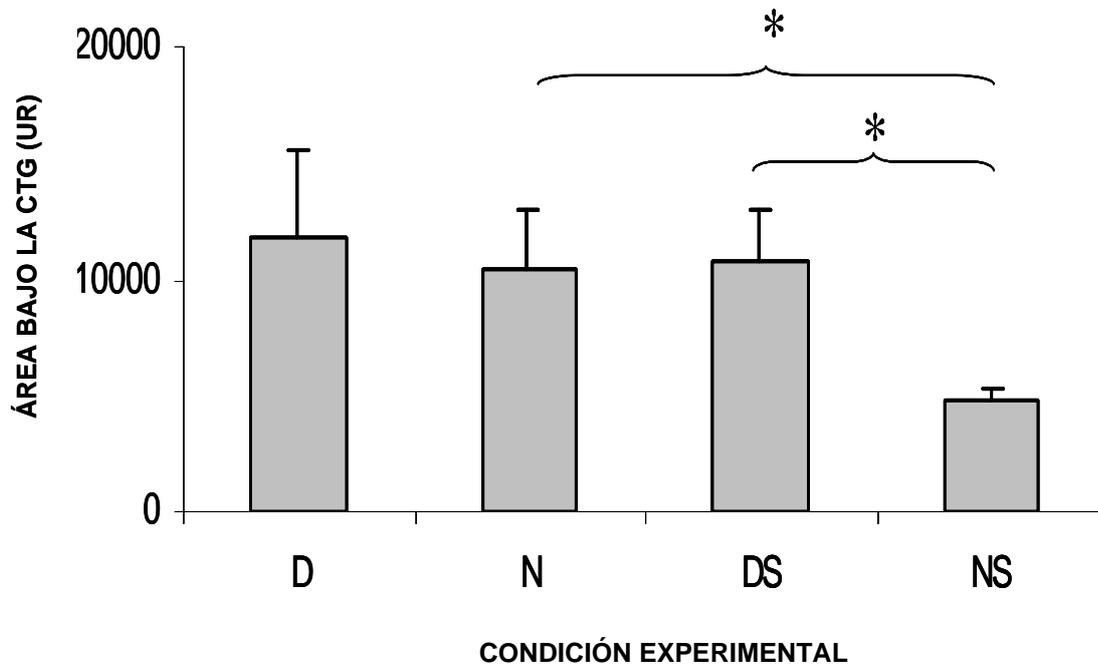


Fig. 9 Área bajo la CTG en los ratones normales durante las condiciones día, noche, día subjetivo y noche subjetiva. UR (unidades relativas); D (día); N (noche), DS (día subjetivo) y NS (noche subjetiva). \* Diferencias estadísticas significativas ( $P < 0.05$ ).

En la Fig. 10 puede apreciarse que durante el día el área bajo la CTG de los ratones obesos fue mayor a la observada durante el día subjetivo y la noche, lo cual indica que bajo esta condición los ratones obesos mostraron menor eficiencia para depurar la glucosa. Aunque en el día la depuración de glucosa que exhibieron estos ratones fue menor, durante la noche subjetiva la capacidad para depurar la glucosa sanguínea que mostraron los ratones obesos fue aún menor, pues comparativamente el área bajo la CTG durante la noche subjetiva fue mayor a la observada en el día; por lo tanto, los ratones obesos durante la noche subjetiva presentaron mayor intolerancia a la glucosa con respecto a las otras condiciones. Entre el día subjetivo y la condición noche los ratones obesos no mostraron diferencias evidentes en el área bajo la CTG. Como puede advertirse en la Fig. 10, sólo se observaron diferencias estadísticas significativas entre el área bajo la CTG de noche vs noche subjetiva y día subjetivo vs noche subjetiva.

Comparación entre actividad y restricción en animales normales en periodo de oscuridad

En la gráfica 11, se muestra que la curva de restricción alcanza valores elevados, muy parecidos a los alcanzados en la curva de actividad. En la curva de restricción el descenso se muestra un poco mas lento pero no se muestra una diferencia muy marcada entre estas dos curvas. Es importante mencionar que no encontramos diferencias significativas T- Student ( $<0.05$ ).

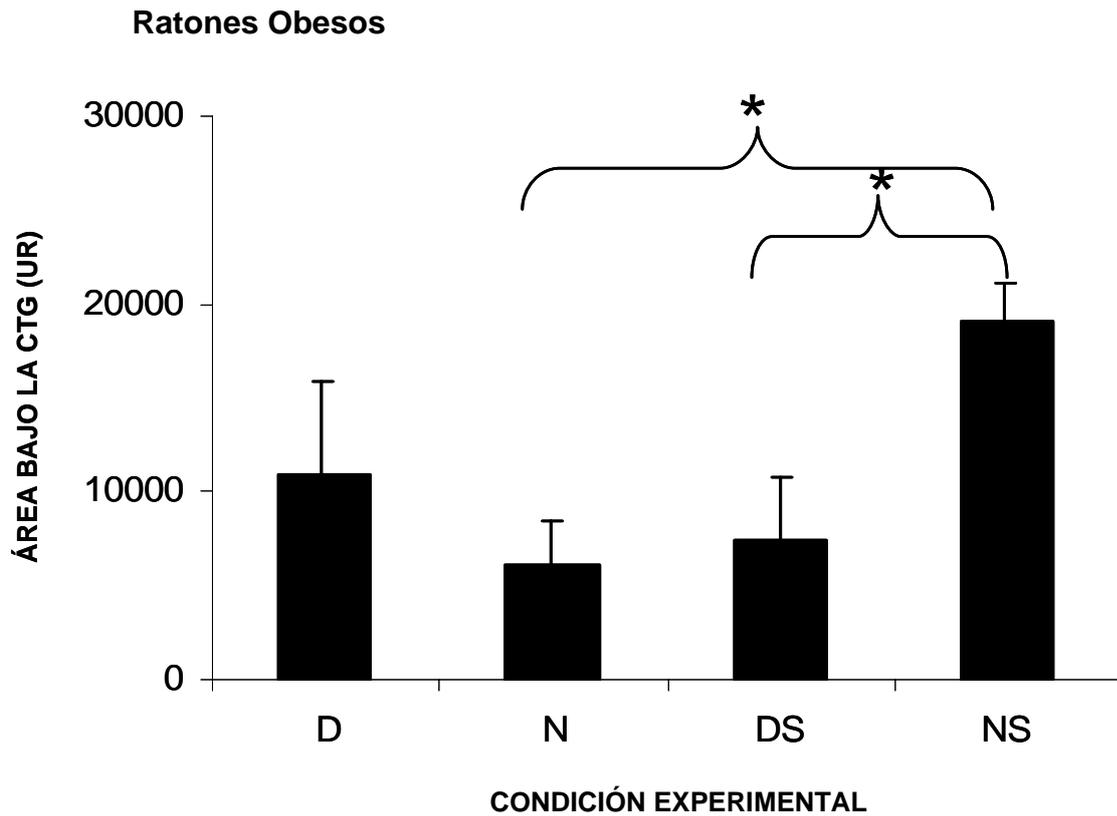


Fig 10. Área bajo la CTG en los ratones obesos durante las condiciones día, noche, día subjetivo y noche subjetiva. UR (unidades relativas); D (día); N (noche), DS (día subjetivo) y NS (noche subjetiva). \* Diferencias estadísticas significativas ( $P < 0.05$ ).

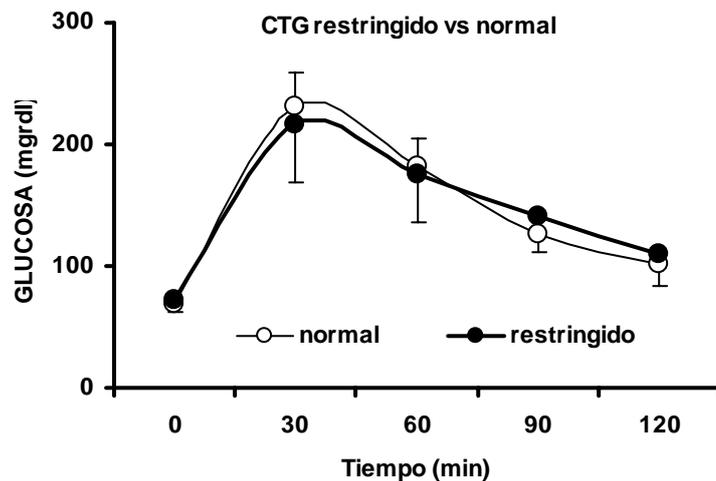


Fig. 11 Comparación de ratones normales con restricción y sin restricción en periodo de oscuridad del ciclo LO, no mostraron diferencias estadísticamente significativas.

## **X. DISCUSIÓN**

Un ritmo biológico es definido como la repetición regular de una función biológica en un organismo a lo largo del tiempo, este ritmo puede verse afectado por las variaciones en el ambiente a las cuales está expuesto. Una de las principales características de estos ritmos es que se presentan en ausencia de las señales cíclicas con que están relacionados, por ejemplo: la luz, la presencia de alimento etc., por lo que se consideran sistemas de temporalización autosostenidos.

Los resultados de las figuras 9 y 10 resumen las diferencias encontradas en los ratones obesos y normales. Dichas diferencias fueron más marcadas en el periodo de noche subjetiva en ambos grupos de ratones. Los animales normales mostraron una depuración más rápida de la glucosa sanguínea y un retorno más rápido a su nivel basal de glucemia en la noche y noche subjetiva. Esta tendencia es congruente con la actividad nocturna de los animales, debido a que los mecanismos que regulan la captación de glucosa en los tejidos deben ser más eficientes cuando el animal está activo y, por lo tanto, cuando el animal consume alimento cuyos nutrientes deben ser rápidamente absorbidos por el sistema digestivo y pasar a la sangre y a los tejidos. Las diferencias observadas en los animales normales son más marcadas en la noche subjetiva, lo cual concuerda con las evidencias observadas en otros estudios en los que se ha encontrado que los ratones normales mantenidos bajo un periodo de oscuridad constante regulan de manera más eficiente la expresión de genes de enzimas que desempeñan un papel importante en el metabolismo de la glucosa en ratones. (Zhang J. et, al. 2006)

Estudios recientes han demostrado que en condiciones constantes de oscuridad se observa un aumento en los niveles de 5'AMP. Este incremento de 5'AMP provoca una disminución de la fosfofructocinasa (PFK) en la gluconeogenesis y un aumento de la fructocinasa-1,6 difosfatasa (FDP) lo que lleva a un aumento de la glucosa en sangre. (Zhang J. et, al. 2006)

La homeostasis energética es regulada por la leptina y la insulina, dichas hormonas son producidas en el tejido adiposo y en el páncreas, respectivamente, e interactúan con sistemas neurales que influyen sobre la ingesta de alimento. La obesidad puede ser resultado de la secreción defectuosa o de una inadecuada respuesta neural a estas hormonas (Carmona, 2006). El NSQ genera ritmos de conducta y metabolismo, estos últimos son influidos por la leptina, la cual tiene receptores en el NSQ, por lo que esta estructura puede participar monitoreando los cambios que ocurren en la masa de grasa corporal (Swartz y Niswender, 2004).

Las diferencias observadas en los animales obesos durante la noche subjetiva pueden ser el producto de trastornos metabólico-neurales, probablemente inducidos por la presencia de obesidad y de otras alteraciones metabólicas en estos ratones, tales como resistencia a la insulina y SM, pues es conocido que estos trastornos también impactan sobre la actividad del NSQ.

## **RESTRICCIÓN Y ACTIVIDAD**

Cuando los animales normales se mantuvieron en libre actividad o en restricción no presentaron diferencias significativas en la curva de tolerancia a la glucosa durante la noche subjetiva. En condiciones normales un animal que se encuentra en actividad gasta mayor cantidad de energía que un animal que se encuentra en reposo, por lo que se esperaría que esta diferencia se observara en libre actividad y no en restricción. Al no ser así puede argumentarse que se trata de un ritmo endógeno, aunque no se descarta que la adaptación a la condición de restricción y el estrés puedan ser factores que influyen en este resultado. Las evidencias obtenidas demuestran que en los roedores la concentración sanguínea de glucosa es fuertemente regulada por el reloj circadiano.

### **Diferencias diarias y circadianas de la concentración sanguínea de glucosa y de la capacidad para depurar la glucosa en ratones obesos.**

En la Fig. 10 los valores relativos del área bajo la curva durante la noche, fueron menores con respecto al día en el ciclo de Luz y Oscuridad, lo cual sugiere que la captación de glucosa por los tejidos periféricos fue más rápida en la noche. Este resultado a lo explicado anteriormente con respecto al AMP`5.

Estudios recientes demuestran que genes esenciales del reloj circadiano como Bmal1 y Clock, están involucrados en la homeostasis de la glucosa. La inactivación de los genes Bmal1 y Clock suprime la variación diurna de la

glucosa y de los triglicéridos. La gluconeogénesis es afectada por mutaciones de los genes *Bmal1* y *Clock*, pero la respuesta contrareguladora de la corticosterona y el glucagón a la inducción por la insulina se conserva (Rudic, et al, 2004). Los valores del área bajo la curva de tolerancia a la glucosa para el día y día subjetivos fueron prácticamente similares en los ratones obesos mantenidos bajo las dos condiciones. Allaman-Pillet, et al., (2003) señalan que en animales normales la secreción y los niveles de insulina en el plasma están sujetos a ciclos circadianos, con un aumento progresivo en la mañana, con el pico más alto por la tarde y una disminución durante la noche.

Como se observa en la Fig. 9, en los ratones normales los valores del área bajo la curva de tolerancia a la glucosa durante la noche subjetiva fueron menores a los del día subjetivo, lo que indica que durante la noche los tejidos periféricos de los ratones normales presentaron una mejor captación de glucosa. Esta diferencia fue mayor a la observada en el ciclo de luz y oscuridad, lo que coincide con lo reportado por Jianfa Zhang, et al (2006) respecto a que las diferencias circadianas en el metabolismo de la glucosa son más pronunciadas en oscuridad constante.

Sin embargo, los ratones obesos mantenidos en oscuridad constante mostraron un patrón de depuración de glucosa invertido respecto al que ha sido reportado para animales normales. Una posible explicación a este hallazgo es que la hora de muestreo no representara la noche interna del ratón, ya que al no tener un registro de actividad no se puede asegurar que el tiempo de muestreo haya coincidido exactamente con la mitad de la noche y días subjetivos.

Una segunda posibilidad es que en los ratones obesos, los mecanismos que regulan la captación de glucosa en condiciones constantes de oscuridad, sean diferentes a los que participan en organismos normales. En este caso, es necesario plantear una serie distinta de protocolos en los que se pueda conocer los niveles de insulina en condiciones de oscuridad constante, mediante la toma de muestras a distintos puntos de tiempo circadiano, con referencia a un actograma donde pueda ser proyectado el inicio de actividad.

El gen *Clock* es un componente esencial del reloj maestro, el cual regula los ritmos circadianos en el Núcleo Supraquiasmático del Hipotálamo. Nuevas evidencias han demostrado que los ratones con la mutación *Clock* presentan hiperfagia y en consecuencia son obesos, por lo que se ha sugerido que existe una relación importante entre los controles moleculares del ritmo circadiano y la homeostasis energética. Los mutantes *Clock*, son arrítmicos en condiciones constantes de oscuridad. Esta arritmia se manifiesta como brotes irregulares de actividad distribuidos a lo largo del tiempo, lo que permite que los animales tengan más periodos de alimentación, no es claro, sin embargo, si la obesidad en estos animales esta relacionada con la posibilidad de que el animal coma durante periodos más prolongados debido a la arritmia, o sí existe una deficiencia metabólica por la mala función del reloj que de lugar a la obesidad (Williams y. Schwartz, 2005).

Muchos de los procesos fisiológicos en el organismo están relacionados con el reloj maestro, uno de estos procesos fisiológicos es la síntesis circadiana de insulina, la cual en animales diurnos presenta niveles altos durante el día y su pico máximo durante la tarde. Estos ciclos se pierden en pacientes con

diabetes tipo 2, así como las variaciones diarias de la tolerancia a la glucosa y los eventos cardiovasculares (Allaman- Pillet, et al., 2004).

Las personas obesas y aquellas con diabetes tipo 2 también presentan ciertas disfunciones en sus ritmos circadianos. Diferentes anormalidades de las variaciones diarias de la conducta y de los procesos fisiológicos como lo es la obesidad, la resistencia a la insulina entre otras, han sido observadas en humanos obesos, diabéticos y en modelos de roedores de diabetes tipo 2 (Young et al.,2002).

Los ciclos de sueño-vigilia también se ven afectados por la obesidad. El sueño está asociado con una serie de cambios endocrinos incluyendo la acción de la insulina en individuos sanos y jóvenes. El sueño juega un papel integral en el control metabólico y al parecer un sueño insuficiente puede representar un factor de riesgo para el desarrollo de diabetes tipo 2 (Trenell et al., 2007).

Lo anterior da lugar a plantear nuevas preguntas acerca de la estructura del ritmo de actividad entre organismos normales y obesos, así como las posibles diferencias que existan en la arquitectura del sueño entre estos dos grupos.

## XI. CONCLUSIONES

- El ratón de los volcanes *Neotomodon alstoni alstoni* presentó diferencias significativas en la captación de la glucosa en el ciclo diario y circadiano en animales obesos y normales.
- Se observaron diferencias entre animales obesos y normales en la noche subjetiva, esto se podría deber a la lenta depuración plasmática de glucosa que presentan los animales obesos, a diferencia de los animales normales, los cuales podrían presentar una rápida depuración de glucosa.
- La restricción de actividad nocturna no modificó significativamente la captación de glucosa, lo cual indica que las diferencias observadas en animales normales dependen de una regulación circadiana.
- Los animales obesos presentaron una depuración de la glucosa sanguínea más rápida en el día subjetivo con respecto a los animales normales.

## XII. BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez, T. y Mayo- Aceves, E(1993). Contribución al conocimiento de los hábitos alimenticios del ratón de los volcanes, *Neotomodon alstoni*,(Merriam,1918). *Acta Zool. Mex.* (59): 1-51.
- Allaman-Pillet N, Roduit R, A. Oberson, S.Abdelli, J. Ruiz, J. S. Beckmann, D.F. Schorderet, C.Bonny (2004). Circadian regulation of islet genes involved in insulin production and secretion. *Molecular and Cellular Endocrinology* .,226 :59-66.
- Aschoff,J. 1981. Free-running and entrained circadian rhythms. In: *Handbook of Behavioral Neurology Volumen 4 : Biological Rhythms*, Aschoff,J. (ed), pp 81-93. Plenum, New York.
- Bado, A., Levasseur, S., Attoub, S., Kermorgant, S., Laigneau, J. P., Bortoluzzi, M. N., Moizo, L., Lehy, T., Guerre-Millo, M., Le Marchand- Brustel, Y. y Lewin, M. J. (1998). The stomach is a source of leptin. *Nature*, 394 : 790-793.
- Bray, A. G., Fisler, J. y York , A. d. (1990). Neuroendocrine control of the development of obesity: understanding gained from studies of experimental animal models. *Front . Neuroendocrinol.*, 11: 128-181.
- Carmona, A. Obesidad, esteatosis hepática y parámetros sanguíneos en el ratón de los volcanes (*Neotomodon alstoni alstoni*) mantenido en cautiverio. Tesis de Maestría .México D.F. Febrero, 2006.
- Cerulli, J., Lomaestro, B.M. y Malone, M. (1998). Update on the pharmacotherapy of obesity. *Ann. Pharmacother.*, 32(1): 90-102.
- Clement, K., Vaisse, C., Lahlou, N., Cabrol, S., Pelloux, V, Cassuto, D., Gourmelen, M., Dina, C., Chambaz, J., Lacorte, J. M., Basdevant, A., Bougneres, P., Lebouc, Y., Froguel, P. y Guy-Grand, B. (1998). A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature*, 392: 398-401.
- Comuzzie, A. G. y Allison, D. B. (1998). The search for human obesity genes. *Science*, 280: 1374-1377.
- Chagnon, Y. C., Perusse, L., Weisnagel, S. J., Rankinen, T. y Bouchard, C. (2000). The human obesity gene map: The 1999 update. *Obes. Res.*, 8(1): 89-117.
- Chávez, T.C. (1999). Diversidad y comportamiento poblacional de una comunidad de roedores de la sierra del ajusco. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, UNAM. México.
- Chen, H., Charlat, O., Tartaglia, L. A., Woolf, E.A ., Weng, X., Ellis, S.J., Lakey, N. D., Culpepper, J., Moore, K, J., Breitbart, R.E.,

- Duyk, G. M. Tepper, R. I. y Morgenstern, J. P. (1996). Evidence that the diabete gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell*, 84: 491-495.
- Chignon, Y. C., Perusse, L., Weisnagel, S. J., Rankinen, T. y Bouchanrd, C. (2000). The human obesity gene map: the 1999 update. *Obes. Res.*, 8(1): 91-117.
- Chua, S. C. Jr., Chung, W., Wu-Peng, X. S., Zhang, Y., Liu, S. M., Tartaglia, L. y Leibel, R. L. (1996). Phenotypes of mouse diabetes and Rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor. *Science*, 271: 994-996.
- Dean, BL y McEntyre, J. *The Genetic Landscape of Diabetes*. (1999). Bios Scientific Publishers Ltd. NCBI.
- DeCoursey,(a) PJ (2004), Overview of Biological Timing from Unicells to Humans 3. En:Dunlap JC,. Loros JJ y. DeCoursey, PJ Eds. *Chronobiology*. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts, U.S.A.402 pp
- DeCoursey (b), PJ (2004), Functional organization of circadian system in multicelular animals. En:Dunlap JC,. Loros JJ y. DeCoursey, PJ Eds. *Chronobiology*. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts, U.S.A.402 pp
- Despres, J.P (1993). Abdominal obesity as an important component of insulin-resistance syndrome. *Nutrition*, 9(5):452-459.
- Dunlap,J.C. 1999. Molecular bases for circadian clocks. *Cell* 96: 271-290.
- Eckel, R. H., Grundy, S. M y Zimmet, P.Z.(2005). The metabolic syndrome. *Lancet*, 365(9468):1415-1428.
- Friedmam, J. E., Ishizuka, T., Liu, S., Bedol, D., Koletsky, R. J. y Ernsberger, P. (1997). Metabolic Consequences of a nonsense mutation in the leptin receptor gene ( $fa^k$ ) in the obese spontaneously hypertensive Koletsky rat (SHROB). *Clin. Endocrinol. Diabetes*. 106(Suppl. 3): 82-84.
- Gruart A, JM, Escobar C y Aguilar R (2002). Los relojes que gobiernan la vida. Fondo de cultura económica. pp
- Hernández , M. N. y Perlemuter, L. (1997). Leptin: a genetic solution to obesity?. *Presse. Med.*, 26(16): 770-773.
- Hoggard, N., Hunter, L., Duncan, J., Williams, L. M., Trayhurn, P. y Mercer, J. C. (1997). Leptin and leptin receptor m RNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 94: 11073-11078.

- Jeremy M, Berg John L. Tymoczko, Stryer, L., Clarke, ND y Freeman, WH Biochemistry. Co (2001). New York.
- Kennedy, A., Gettys, T. W., Watson, P., Wallace, P., Ganaway, E., Pan, Q. y Garvey, W. T.(1997). The metabolic significance of leptin in humans: gender-based differences in relationship to adiposity, insulin sensitivity, and energy expenditure. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 82(4): 1293-1300.
- Ko, C.H. y Takahashi, J.S. (2006) Molecular components of the mammalian circadian clock. *Human Molecular Genetics* 15 (2): 271-277pp.
- Lee G.H., Proenca, R., Montez, J. M., Carroll, K. M., Darvishzadeh, J.G., Lee, J. I. y Friedman, J. M. (1996). Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature*, 379: 632-635.
- Lowell, B.B y Spiegelman, B.M. (2000). Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature*, 404: 652-660.
- Meigs, J.B., D'Agostino, R.B.Sr., Wilson, P.W., Cupples, L.A., Nathan, D.M. y SINGER, D. E(1997). Risk variable clustering in the insulin resistance syndrome. The Framingham Offspring Study. *Diabetes*,46(10):1594-1600.
- Montague, C. T., Farooqi, I. S., Whitehead, J. R, Soos, M. A., Rau, H., Wareham, N. J., Sewter, C. P., Digby, J. E., Mohammed, S. N., Hurst, J. A., Cheetham, C. H., Earley, A. R., Barnett, A. H., Prins, J. B. y Stephen, O. R. (1997). Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature*, 387: 903-908
- Morrison, R.F y Farmer, S.R. (1999). Insights into the transcriptional control of adipocyte differentiation. *J.Cell Biochem.*, 33(Suppl.32): 59-67.
- Natalucci G, Riedl S, Gleiss A, Zidek T, y Frisch H .Spontaneous 24-hghrelin secretion pattern in fasting . *European Journal of Endocrinology* 152 (6): 845-850 JUN 2005
- Olivar, L.J.(1984). Reproduccion de *Neotomodon a. alstoni*(Rodentia: Cricetidae) en condiciones de laboratorio. Tesis de Maestria. U.A.M Iztapalapa, México.
- Palou, A., Picó C., Bonet, M. L. y Oliver, P., (2000). The uncoupling protein, thermogenin. *Ins J. Biochem. Cell Biolo.*, 30(1): 7-11.
- Pittendrigh, C.S. 1960. Circadian Rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold spring Harb. Symp. Quant. Biol.*,25:159-184.
- Proietto, J., (1998). Anti-obesity drugs. *Med. J. Aust.* 168(8): 409-412.

- Ricquier, D. y Bouillaud, F. (2000). The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP. *Biochem. J.*, 345: 161-179.
- Rudic, RD, McNamara , P, Curtis, AM, Boston, RC Panda, S, Hogenesch, JB, y FitzGerald, GA BMAL1 and CLOCK, two essential components of the Circadian Clock, are involved in Glucose Homeostasis. *Plos Biology*. November (2004), vol 2, 1893-1895.
- Sander, S., Nian, M. y Liu, P. (2003). Leptin a novel link between obesity, diabetes, cardiovascular risk, and ventricular hipertrophy. *Circulation*, 108(6): 644-646.
- Schwartz, M, W., Figlewitz, D.P., Baskin, D. G., Woods, S.C. y Porte, D., Jr. (1994). Insulin and the central regulation of energy balance: update. *Endocr. Rev.*, 2: 109-113.
- Strobel, A., Issad, T., Camoin, L., Ozata, M. y Strosberg, A. D. (1998). A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nat. Genet.*, 18 (3): 213-215.
- Sweeney, B.M., and Hasting JW. 1960. Effects of temperature upon diurnal rhythms. *Cold spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 25: 87-104.
- Tartaglia, L.A., Dembrsk, M., Weng, X., Deng, N., Culpepper, J., Devos, R., Richards , G. J., Campfield, L.A., Clark, F. T., Deeds, J., Muir, C., Sanker, S., Moriarty, A., Moore, K. J., Smutko, J. S., Mays, G. G., Wolf, E. A., Monroe, C. A. y Tepper, R. I. (1995). Identification and expretion cloning of leptin receptor, OB-R. *Cell*, 83: 1263-1271.
- Villa, R.B. (1953). Mamíferos silvestres del valle de México. *An. Inst. Biol., UNAM*, (23): 269-492.
- Williams, DL y Schwartz, MW. Out of synch: clock mutation causes obesity in mice. (2005). *Cell Metabolism*: June 2005, vol 1, Elsevier INC.
- White, C.L., Braymer, H.D.A. y Bray, G.A. 2005. Effect of a high or low ambient perinatal temperature on adult obesity in Osborne-Mendel y S5B/PI rats. *Am J. Physiol. Regul. Integr. Comp. P hysiol.*, 288: R1376-R1384.
- Woods, S.C., Seeley, R.J., Porte, D. Jr y Schwartz, M.W. (1998). Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science*, 80: 1378- 1383.
- Wu, Z., Puigserver, P. y Spiegelman, B.M. (1999). Transcriptional activation of adipogenesis. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 11 (6): 691-694.
- Yamazaki, S., R. Numano, M. Abe, A. Hida, R.I. Takahashi, et al. 2000. Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* 288:682-685.

Young, J.B. y Landsberg, L. (1982). Diet-induced changes in sympathetic nervous system activity: possible implications for obesity and hypertension. *J. Chronic. Dis.*, 36:879-906.

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. y Friedman, J. (2006). Positional cloning of the mouse *obese* gene and its human homologue. *Nature*, 372: 425-432.