



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

ALTERACIONES PRODUCIDAS POR LA  
OBESIDAD EN LA ESTRUCTURA DEL  
CICLO DE SUEÑO-VIGILIA Y LOS PERFILES  
DIARIOS DE LEPTINA, INSULINA,  
TRIGLICÉRIDOS, CORTISOL Y GLUCOSA  
EN EL RATÓN DE LOS VOLCANES  
*Neotomodon alstoni* (Merriam, 1898)

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

CITLALLI FUENTES GRANADOS

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. MANUEL MIRANDA ANAYA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR: DRA. PILAR DURÁN HERNÁNDEZ  
DR. RENÉ DE JESÚS CÁRDENAS VÁZQUEZ

MÉXICO, D.F.

MARZO, 2011



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.



POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
 FACULTAD DE CIENCIAS  
 DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/111/11

ASUNTO: Oficio de Jurado

UNIVERSIDAD NACIONAL  
 AUTÓNOMA DE MÉXICO

**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
 Director General de Administración Escolar, UNAM  
 Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **18 de octubre de 2010** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del (la) alumno (a) **FUENTES GRANADOS CITLALLI** con número de cuenta **301149279** con la tesis titulada **"Alteraciones producidas por la obesidad en la estructura del ciclo de sueño-vigilia y los perfiles diarios de leptina, insulina, triglicéridos, cortisol y glucosa en el ratón de los volcanes *Neotomodon alstoni* (Merriam, 1898)"**, realizada bajo la dirección del (la) **DR. MANUEL MIRANDA ANAYA**:

- Presidente: DRA. PILAR DURÁN HERNÁNDEZ
- Vocal: DR. MAURICIO DÍAZ MUÑOZ
- Secretario: DR. MANUEL MIRANDA ANAYA
- Suplente: M. EN C. AGUSTÍN CARMONA CASTRO
- Suplente: DR. RENÉ DE JESÚS CÁRDENAS VÁZQUEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
 "POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
 Cd. Universitaria, D.F., a 28 de febrero de 2011

*M. del Coro Arizmendi*  
 Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga  
 Coordinadora del Programa

## **AGRADECIMIENTOS.**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme una educación de calidad y permitir fortalecer mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por brindarme el apoyo económico para mis estudios de Posgrado (Clave de Becario: 220274 y CVU: 262059), así como al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) quien brindó gran parte de los apoyos económicos para el material y equipo empleado en este trabajo de investigación (Clave del proyecto: IN202808).

Al Dr. Manuel Miranda Anaya, por asesorarme durante la realización de este trabajo, por su paciencia y por brindarme su amistad. Muchísimas gracias Manuel.

A los miembros de mi comité tutorial: Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez y Dra. Pilar Durán Hernández, quienes semestre a semestre contribuyeron de manera importante en el desarrollo de este trabajo. Dr. René gracias por su asesoría para la determinación de los parámetros plasmáticos. Dra. Pilar, gracias por su asesoría en la lectura y el análisis de los registros de sueño.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES.**

Al Dr. León Cintra McGlone<sup>‡</sup> por fungir como miembro de mi comité tutorial por algún tiempo, siempre lo recordaremos.

Al M. en C. Agustín Carmona Castro, por darse el tiempo de revisar este trabajo, contribuir en algunos detalles importantes relacionados con el desarrollo de esta investigación, por su apoyo en la obtención de los animales, y por su valiosa amistad.

Al Dr. Mauricio Díaz Muñoz, por contribuir en la revisión de este trabajo. Gracias por sus valiosos comentarios y por el interés mostrado en este proyecto.

A mis padres: Isabel Granados y Félix José Luis Fuentes, por formar parte importante de todos mis éxitos. Gracias por la educación que me han brindado, por su apoyo y amor incondicionales, y por enseñarme a luchar, los quiero muchísimo.

A mis hermanas Nelli e Itzel, por proporcionarme su ayuda siempre que la he requerido. Gracias por todo el apoyo y el amor que me han brindado a lo largo de nuestra vida, las quiero muchísimo.

A mi tía Raquel Granados<sup>‡</sup>, quien siempre me brindó su cariño en gran parte de mi vida, siempre estarás presente en mis pensamientos porque fuiste y serás una persona importantísima para mí.

A mi tía Natividad Granados, por su constante preocupación, por su cariño y su apoyo. A mi abuela Gertrudiz López, por sus muestras de afecto. Las quiero mucho.

A Javier García Martínez, por apoyarme en gran medida durante el desarrollo de este trabajo, pues sin tu ayuda me hubiera resultado aún más complicado afrontar los momentos difíciles. Gracias por tu apoyo y por todo el amor que me has brindado. Te quiero mucho mi amor.

A mis amigos Natalia, Sandra, Félix, Lizbeth, Omar, Laura, Norma, Jazmín y Carmen, quienes me han brindado momentos muy agradables en estos 10 años de amistad, siendo un apoyo emocional necesario en mi vida. Los quiero a todos.

A mi amigo Víctor Hugo Rico por acompañarme durante gran parte del desarrollo de este trabajo, muchas gracias por todo.

A mi amigo Jorge Arturo Martínez, por brindarme un momento de su tiempo y asesorarme en el uso de los programas de estadística.

Al personal del Bioterio de la Facultad de Ciencias, en el cual desarrollé gran parte del trabajo experimental.

**DEDICATORIA.**

A mis padres y hermanas:  
**Isabel Granados López.**  
**Félix José Luis Fuentes Zárate.**  
Nelli Y. Fuentes Granados.  
Itzel Fuentes Granados.

Gracias por estar a mi lado y brindarme todo su apoyo.

## I. ÍNDICE.

APARTADOS.	PÁGINAS.
<b>I. ÍNDICE</b> .....	iv
<b>II. ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	vi
<b>III. ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	vii
<b>IV. ABREVIATURAS</b> .....	viii
<b>V. RESUMEN</b> .....	xii
<b>VI. ABSTRACT</b> .....	xiii
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	2
2.1 El sistema circadiano.....	2
2.2 Sistema circadiano, metabolismo y obesidad.....	5
2.2.1 Patrones rítmicos en la concentración de leptina.....	9
2.2.2 Patrones rítmicos en la concentración de insulina.....	10
2.2.3 Patrones rítmicos en la concentración de triglicéridos.....	11
2.2.4 Patrones rítmicos en la concentración de glucocorticoides.....	12
2.2.5 Patrones rítmicos en la concentración de glucosa.....	13
2.3 El ciclo de sueño-vigilia.....	14
2.4 El ciclo de sueño-vigilia y la obesidad.....	19
2.5 El ratón de los volcanes como modelo animal.....	21
2.5.1 El ratón de los volcanes y el estudio de la obesidad.....	22
2.5.2 El ratón de los volcanes y el ciclo de sueño-vigilia.....	23
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	23
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	24
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	24
5.1 Objetivo general.....	24
5.2 Objetivos específicos.....	24
<b>6. METODOLOGÍA</b> .....	25
6.1 Obtención, cuidado y mantenimiento de los animales.....	25
6.2 Análisis de los parámetros plasmáticos.....	26
6.3 Pruebas de tolerancia a la glucosa (PTG) .....	27
6.4 Registros de sueño .....	28
6.5 Análisis estadístico de los datos.....	28
<b>7. RESULTADOS</b> .....	29
7.1 Análisis de los parámetros plasmáticos.....	29
7.1.1 Patrones diarios en la concentración de leptina.....	32
7.1.2 Patrones diarios en la concentración de insulina.....	33
7.1.3 Patrones diarios en la concentración de triglicéridos.....	35
7.1.4 Patrones diarios en la concentración de cortisol.....	37

7.1.5 Patrones diarios en la concentración de glucosa.....	39
7.2 Pruebas de tolerancia a la glucosa (PTG) .....	40
7.2.1 PTG en fases opuestas del ciclo de luz-oscuridad.....	40
7.2.2 PTG en la misma fase del ciclo de luz-oscuridad.....	43
7.3 Registros de sueño .....	45
7.3.1 Porcentaje total de los estados de vigilancia en 24 h.....	46
7.3.2 Porcentaje total de los estados de vigilancia en el ciclo de luz-oscuridad (LO 12:12).....	46
7.3.3 Distribución temporal de los estados de vigilancia en un periodo de 24 h.....	47
<b>8. DISCUSIÓN.....</b>	<b>49</b>
8.1 Análisis de los parámetros plasmáticos.....	49
8.1.1 Leptina.....	50
8.1.2 Insulina.....	51
8.1.3 Triglicéridos.....	52
8.1.4 Cortisol.....	53
8.1.5 Glucosa.....	54
8.2 Pruebas de tolerancia a la glucosa (PTG) .....	55
8.3 Registros de sueño .....	57
8.4 Consideraciones importantes del uso del ratón de los volcanes como modelo de obesidad .....	58
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>61</b>
<b>10. REFERENCIAS.....</b>	<b>61</b>



## II. ÍNDICE DE FIGURAS.

---

<b>Figura 1.</b> Mecanismo central del reloj molecular de mamíferos.....	4
<b>Figura 2.</b> El NSQ y la homeostasis energética.....	6
<b>Figura 3.</b> Mecanismo central del reloj molecular de mamíferos y su vínculo con el metabolismo.....	7
<b>Figura 4.</b> Apariencia poligráfica típica de la actividad eléctrica cerebral y muscular del ratón y la rata adultos en las distintas fases del ciclo sueño-vigilia.....	15
<b>Figura 5.</b> Modelo de los mecanismos neuronales que dan lugar a la vigilia, el SOL y el SMOR.....	18
<b>Figura 6.</b> Fotografía de <i>Neotomodon alstoni</i> .....	21
<b>Figura 7.</b> Fotografía del ratón de los volcanes delgado y obeso.....	23
<b>Figura 8.</b> Porcentaje de ratones cuyos perfiles diarios se ajustaron al modelo de Cosinor.....	31
<b>Figura 9.</b> Perfiles diarios de leptina en los animales delgados y obesos, hembras y machos.....	33
<b>Figura 10.</b> Perfiles diarios de insulina en los animales delgados y obesos, hembras y machos.....	35
<b>Figura 11.</b> Perfiles diarios de triglicéridos en los animales delgados y obesos hembras y machos.....	37
<b>Figura 12.</b> Perfiles diarios de cortisol en los animales delgados y obesos, hembras y machos.....	38
<b>Figura 13.</b> Perfiles diarios de glucosa en los animales delgados y obesos, hembras y machos.....	40
<b>Figura 14.</b> Curvas de las PTG en los ratones de los volcanes delgados y obesos de ambos géneros (comparación por fase).....	42
<b>Figura 15.</b> Curvas de las PTG en los ratones de los volcanes delgados y obesos de ambos géneros (comparación por fase y por grupo).....	44
<b>Figura 16.</b> Valores promedio de las áreas bajo la curva de las PTG.....	45
<b>Figura 17.</b> Trazos electroencefalográficos típicos de los tres estados de vigilia en el macho adulto del ratón de los volcanes.....	45
<b>Figura 18.</b> Porcentajes de los tres estados de vigilia durante 24 h.....	46
<b>Figura 19.</b> Porcentajes de los tres estados de vigilia durante el ciclo LO 12:12.....	47
<b>Figura 20.</b> Porcentajes de los tres estados de vigilia cada 2 h durante el ciclo LO 12:12.....	48

### III. ÍNDICE DE TABLAS.

---

<b>Tabla 1.</b> Concentraciones promedio máximas y mínimas para los perfiles diarios de leptina, insulina, triglicéridos, cortisol y glucosa en el ratón de los volcanes...	30
<b>Tabla 2.</b> Valores obtenidos del ajuste por Cosinor para los perfiles promedio de leptina, insulina, triglicéridos, cortisol y glucosa en el ratón de los volcanes...	31
<b>Tabla 3.</b> Tiempo promedio en minutos que permanecieron los machos, delgados y obesos, del ratón de los volcanes en los tres estados de vigilancia durante el ciclo de luz-oscuridad (LO: 12:12).....	47

#### IV. ABREVIATURAS.

<b>5 HT</b>	Serotonina.
<b><math>\alpha</math>-MSH</b>	Hormona estimulante de los melanocitos.
<b>ACTH</b>	Hormona adrenocorticotrópica.
<b>ADA</b>	Adenosina.
<b>AgRP</b>	Proteínas relacionadas con agouti.
<b>AMP</b>	Monofosfato de adenosina.
<b>AMPK</b>	Cinasa activada por monofosfato de adenosina.
<b>Ap2</b>	Proteína citosólica transportadora de lípidos.
<b>ARC</b>	Núcleo arqueado.
<b>BMAL1</b>	Proteína tipo ANRT de músculo y cerebro (brain- and muscle- ANRT- like protein).
<b><i>C/ebp<math>\alpha</math></i></b>	Gen que codifica para las proteínas $\alpha$ que se ligan al elemento CCAAT del promotor.
<b>CART</b>	Transcritos regulados por anfetamina y cocaína.
<b>CKI<math>\epsilon/\delta</math></b>	Caseína cinasas I épsilon y delta.
<b>CLOCK</b>	Proteína del gen que elimina del ritmo circadiano de actividad locomotriz (circadian locomotor output cycles kaput).
<b>CRH</b>	Factor liberador de corticotropinas.
<b><i>Cry</i></b>	Gen <i>cryptochrome</i> .
<b>dDPM<math>\epsilon</math></b>	Núcleo reticular mesencefálico profundo.
<b>DMH</b>	Hipotálamo dorsomedial.
<b>DPGi</b>	Núcleo reticular paragigantocelular dorsal.
<b>DRN</b>	Núcleo rafe dorsal.
<b>ECG</b>	Electrocorticograma.
<b>EDS</b>	Somnolencia excesiva durante el día.
<b>EEG</b>	Electroencefalograma.

<b>EMG</b>	Electromiograma.
<b>EPAS 1</b>	Proteína endotelial 1 con dominio PAS.
<b>FAS</b>	Sintetasa de ácidos grasos.
<b>FEO</b>	Oscilador sincronizado por alimento.
<b>FFA</b>	Ácidos grasos libres.
<b>GABA</b>	Ácido $\gamma$ amino-butírico.
<b>GiV</b>	Núcleo reticular gigantocelular ventral.
<b>Gly</b>	Glicina.
<b>GLUT 1/4</b>	Transportadores de glucosa 1 y 4.
<b>Hcrt</b>	Neuronas secretoras de hipocretinas (orexinas).
<b>HD</b>	Hembras delgadas del ratón de los volcanes (peso < 60 g).
<b>HDL</b>	Lipoproteínas de alta densidad.
<b>HIS</b>	Histidina.
<b>HOB I</b>	Hembras obesas del ratón de los volcanes (peso > 60 g).
<b>HOB II</b>	Hembras muy obesas del ratón de los volcanes (peso > 80 g).
<b>IL-6</b>	Interleucina-6.
<b>IMC</b>	Índice de masa corporal.
<b>IRS3</b>	Sustrato del receptor de insulina 3.
<b>LC</b>	Locus coeruleus.
<b>LH</b>	Hipotálamo lateral.
<b>MC4R</b>	Receptor 4 de melanocortina.
<b>MCH</b>	Hormona concentradora de melanina.
<b>MD</b>	Machos delgados del ratón de los volcanes (peso < 60 g).
<b>MOB</b>	Machos obesos del ratón de los volcanes (peso > 60 g).
<b>MPOA</b>	Área preóptica medial.
<b>NA</b>	Noradrenalina.

<b>NAD<sup>+</sup>/H</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido en su estado oxidado y reducido, respectivamente.
<b>NADP<sup>+</sup>/H</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su estado oxidado y reducido, respectivamente.
<b>NoMOR</b>	Sueño de no-movimientos oculares rápidos.
<b>NPY</b>	Neuropéptido Y.
<b>NSQ</b>	Núcleo supraquiasmático.
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud.
<b>PARP1</b>	Poli (ADP-Ribosa) Polimerasa 1.
<b>PEPCK</b>	Fosfoenolpiruvato-carboxicinas.
<b><i>Per</i></b>	Gen <i>period</i> .
<b>PGC1<math>\alpha</math></b>	Coactivador 1 $\alpha$ del receptor gamma activado por proliferadores de peroxisomas.
<b>PGO</b>	Ondas ponto-genículo-occipitales.
<b>PH</b>	Hipotálamo posterior.
<b>POMC</b>	Propiomelanocortina.
<b>PPAR<math>\alpha</math></b>	Receptor de los activadores de la proliferación de peroxisomas $\alpha$ .
<b>PPRE</b>	Elemento de respuesta a los proliferadores peroxisómicos.
<b>PVN</b>	Núcleo paraventricular.
<b><i>Reverba</i></b>	Factor $\alpha$ de transcripción reversa del virus de eritroblastosis (transcription factor reverse erythroblastosis virus $\alpha$ ).
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico.
<b><i>Rora</i><math>\delta</math></b>	Receptor $\alpha/\delta$ huérfano relacionado con el receptor de ácido retinoico (retinoic acid receptor-related orphan receptor).
<b>RORE</b>	Elemento de respuesta a ROR (ROR response element).
<b>SCN</b>	Sistema Nervioso Central.
<b>SILV</b>	Ratones de los volcanes silvestres.
<b>SLD</b>	Núcleo sublaterodorsal.

<b>SM</b>	Síndrome metabólico.
<b>SMOR</b>	Sueño con movimientos oculares rápidos.
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central.
<b>SOL</b>	Sueño de ondas lentas.
<b>SPZ</b>	Zona subparaventricular del hipotálamo.
<b>TLD</b>	Núcleos tegmentales latero-dorsales.
<b>TMN</b>	Núcleo tuberomamilar.
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral $\alpha$ .
<b>TPP</b>	Núcleos tegmentales pedúnculo pontinos.
<b>vIPAG</b>	Periacueductal ventrolateral gris.
<b>VLPO</b>	Núcleo preóptico ventrolateral.
<b>VMH</b>	Región ventromedial del hipotálamo.
<b>ZT</b>	Tiempo del zeitgeber

## V. RESUMEN.

La obesidad es un problema mundial de salud pública que puede conducir al desarrollo del síndrome metabólico (SM), enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo II (Grundy, 2005). Aunque las causas que generan la obesidad son complejas, investigaciones recientes señalan un vínculo entre el reloj circadiano y el balance energético (Froy, 2010).

El ratón de los volcanes (*Neotomodon alstoni*), endémico del Eje Neovolcánico Transversal de México, ha sido utilizado en el estudio de los ritmos circadianos (Fuentes-Granados, *et al.*, 2009) y del sueño (Ayala-Guerrero, *et al.*, 1998). Después de 6 meses bajo condiciones de cautiverio y alimentado con una dieta normal para roedores de laboratorio, el 60% de los individuos muestran obesidad y signos característicos del SM (Carmona Castro, 2006). Esto indica que *N. alstoni* podría ser un modelo interesante para estudiar las afecciones de estos padecimientos con procesos fisiológicos fundamentales, como es el caso de la regulación de la fisiología circadiana.

Este trabajo, busca establecer las diferencias en los perfiles diarios de las concentraciones plasmáticas de leptina, insulina, triglicéridos, cortisol y glucosa, así como en las características electrocorticográficas generales que definen el sueño, entre individuos adultos delgados y obesos del ratón de los volcanes.

Los resultados mostraron ritmos diarios estadísticamente significativos en los perfiles de glucosa, triglicéridos y cortisol en los ratones delgados de ambos géneros, y en el perfil de insulina en los machos; mientras que los ratones obesos de ambos géneros sólo presentaron un ritmo en el perfil de cortisol, y de triglicéridos en las hembras; las concentraciones plasmáticas fueron mayores en los individuos obesos en casi todos los parámetros (excepto el cortisol), especialmente en las hembras. Los picos de leptina, insulina, triglicéridos y glucosa se encontraron durante el día, y el pico de cortisol durante la noche.

En el ratón de los volcanes la arquitectura del ciclo sueño-vigilia es polifásica, tanto en los ratones delgados como obesos. Aunque los resultados mostraron una amplia variabilidad interindividual, se observó una tendencia en la cual los animales obesos incrementaron el porcentaje de sueño de ondas lentas y disminuyeron su porcentaje de vigilia en comparación con los ratones delgados, mientras que el porcentaje de sueño con movimientos oculares rápidos fue similar en ambos grupos. Estas diferencias, son congruentes con otras investigaciones en roedores con obesidad inducida por la dieta o que tienen deficiencia de leptina, quienes presentan alteraciones en la arquitectura del ciclo de sueño-vigilia (Jenkins, *et al.*, 2005; Laposky, *et al.*, 2006).

## VI. ABSTRACT.

Obesity is an increasing public health problem linked to the metabolic syndrome (MS), cardiovascular problems and type II diabetes (Grundy, 2005). Although the causes of obesity are complex, recent research has found a relationship between the circadian clock and energy balance (Froy, 2010).

The volcano mouse (*Neotomodon alstoni*), an endemic rodent from Trans-Mexican Volcanic Belt, has been used in studies of circadian rhythms (Fuentes-Granados, *et al.*, 2009) and sleep (Ayala-Guerrero, *et al.*, 1998). After 6 months in captivity and fed regular diet for laboratory rodents, 60% of individuals show already obesity and signs characteristic of MS (Carmona Castro, 2006), making of this mouse a putative model for studying the relationship between the circadian system and metabolic disorders.

The aim of the present work is to analyze daily profiles of plasmatic parameters related with MS (leptin, insulin, triglycerides, cortisol and glucose), and the general electrocorticographic characteristics of sleep-wake cycle, between lean and obese adults volcano mice.

The results of this study show statistically significant daily changes in the profiles of glucose, triglycerides and cortisol in lean mice of both genders, whereas in the insulin were found only in lean males; the obese mice show rhythms in their cortisol profile and triglycerides only in obese female. In almost all parameters values tend to be higher in obese animals (except cortisol), especially females. The highest concentrations of leptin, insulin, triglyceride and glucose levels were found during the day, while the peak for cortisol was found at night.

The analysis of the sleep-wake cycle indicates a poly-phasic architecture in this rodent. The comparison between males indicates wide individual variability, but a trend was observed in obese animals to increase the percentage of slow wave sleep for 24 h and decrease time waking compared to lean animals, the percentage of rapid eye movement sleep was similar between groups. The differences observed in this species, are consistent with other reports in which leptin deficient or obesity induced rodents, shows alteration in the sleep-wake pattern (Jenkins, *et al.*, 2005; Laposky, *et al.*, 2006).



## 1. INTRODUCCIÓN.

La incidencia de obesidad en el mundo ha incrementado drásticamente en las últimas décadas, particularmente en mujeres de edad reproductiva y en niños escolares y adolescentes (López-Alarcón y Rodríguez-Cruz, 2008; Zambrano, *et al.*, 2010). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el 2005 existían aproximadamente 1600 millones de adultos que padecían sobrepeso y al menos 400 millones obesidad, cifras que podrían alcanzar los 2300 millones de adultos con sobrepeso y más de 700 millones con obesidad para el año 2015. Anteriormente la obesidad se consideraba un problema exclusivo de los países desarrollados, sin embargo esta enfermedad ha incrementado considerablemente en los países emergentes y en vías de desarrollo, como lo es México, sobre todo en el medio urbano (Fausto-Guerra *et al.*, 2006; WHO, 2006; Monteverde, *et al.*, 2010).

Según cifras de la OMS, cada año mueren en el mundo alrededor de 2.6 millones de personas a causa del sobrepeso y la obesidad (WHO 2006). En nuestro país las enfermedades relacionadas con estos trastornos se encuentran entre las principales causas de mortalidad (Villa, *et al.*, 2004; Aguilar-Salinas, *et al.*, 2005). Estas enfermedades incluyen al síndrome metabólico (SM), en el cual, además del exceso de peso, se presentan al menos tres de las siguientes alteraciones: hipertrigliceridemia, hiperleptinemia, hiperinsulinemia, una disminución en la concentración sérica de lipoproteínas de alta densidad (*HDL*), hipertensión, intolerancia a la glucosa y el acúmulo de grasa visceral, lo cual aumenta la probabilidad de desarrollar problemas cardiovasculares y diabetes tipo II (Grundy, 2005). De acuerdo con cifras de la OMS, el 44% de los casos mundiales de diabetes, el 23% de cardiopatías isquémicas y del 7 al 41% de algunos tipos de cáncer están asociados al sobrepeso y la obesidad (WHO, 2006).

Aunque las causas que generan la obesidad son complejas, actualmente el problema se ha incrementado principalmente como resultado del consumo de alimentos hipercalóricos (ricos en grasas y azúcares con escasas vitaminas, minerales y otros micronutrientes) y una disminución en la actividad física debido a la naturaleza cada vez más sedentaria de muchos trabajos, a los cambios en los medios de transporte y a la creciente urbanización (Rivera, *et al.*, 2004; Fausto-Guerra, *et al.*, 2006, WHO, 2006; Monteverde, *et al.*, 2010).

Asimismo, las disfunciones en el sistema circadiano se encuentran involucradas en la patogénesis de la obesidad, la diabetes tipo II y el síndrome metabólico (Zvonic, *et al.*, 2007); de tal manera que la obesidad (y los problemas de salud que ésta conlleva) no necesariamente es resultado de la ingesta excesiva de alimento, sino de su consumo en el momento equivocado del día (Buijs, *et al.*, 2006). Esto se ve reflejado en la sociedad moderna, en la cual los horarios laborales ocasionan cambios en el patrón de alimentación y en el ciclo de sueño-

vigilia de sus trabajadores, quienes tienden a alimentarse durante las últimas horas del día y disminuir el tiempo de sueño como consecuencia del ritmo acelerado de la vida moderna. Tan sólo en la población adulta, el tiempo de sueño ha disminuido en promedio 1.5 h desde el siglo pasado, mientras que los índices de obesidad van en aumento (Garaulet-Aza, *et al.*, 2009). Además, la restricción y los trastornos del sueño contribuyen al desarrollo de resistencia a la insulina y de diabetes tipo II, ya sea de manera directa al generar alteraciones en los componentes de la regulación homeostática de la glucemia, o indirectamente al afectar la regulación del apetito llevando a un incremento de peso y obesidad (Spiegel, *et al.*, 2005).

Las conductas de alimentación y su coordinación con el ciclo de sueño vigilia son vitales para un organismo. Los ciclos anormales de sueño alteran el reloj circadiano y modifican el patrón regular en la ingesta de alimento, lo cual se ve reflejado en las concentraciones de glucosa, ácidos grasos y triglicéridos en sangre, así como en la funcionalidad de hormonas como la insulina, la leptina y los glucocorticoides (Bray y Young, 2006; Ramsey, *et al.*, 2007).

Por todo lo anterior, es importante abordar la problemática de la obesidad desde perspectivas distintas y, aunque en la actualidad se han llevado a cabo múltiples esfuerzos por dilucidar las causas relacionadas con esta enfermedad, el uso de una variedad más amplia de modelos biológicos que permitan un estudio comparativo de este problema, podrían enriquecer la comprensión de los mecanismos fisiológicos que lo originan. El ratón de los volcanes muestra una tendencia a desarrollar obesidad espontánea en cautiverio, por lo cual podría ser un modelo útil para estudiar la relación que existe entre la obesidad y las funciones fisiológicas reguladas por el reloj, incluyendo los trastornos en el ciclo sueño-vigilia.

## **2. ANTECEDENTES.**

### **2.1 El sistema circadiano.**

Los ritmos circadianos son variaciones en la expresión genética que afectan varios procesos fisiológicos y conductuales que ocurren en un período cercano a un día. Estas oscilaciones circadianas les permiten a los organismos anticipar su metabolismo y adaptarse ante cambios externos que varían de manera predecible, incrementando así la posibilidad de aprovechar los recursos de manera más eficiente en un ambiente cambiante. El ciclo sueño-vigilia, el metabolismo de los lípidos y los carbohidratos, la secreción hormonal, la sensibilidad a la insulina, la presión sanguínea y el tiempo de alimentación, son algunos fenómenos que se expresan de manera circadiana (Ramsey, *et al.*, 2007; Duez y Staels, 2008).

En los mamíferos, el sistema circadiano está constituido por una serie de estructuras organizadas de manera jerárquica. El Núcleo Supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo actúa

como el marcapasos central y, a través de conexiones neurales y/o factores humorales, regulariza varios osciladores periféricos hallados en diversos órganos, como por ejemplo el tejido adiposo blanco, el hígado, el páncreas, el intestino y las glándulas adrenales. En condiciones ambientales constantes, el período de oscilación del NSQ es cercano a 24 h, sin embargo éste se modifica por señales ambientales cíclicas (fenómeno denominado sincronización) como el fotoperiodo, la disponibilidad de alimento, la interacción social y las variaciones de temperatura. Aunque el ciclo de luz-oscuridad es la señal sincronizadora de mayor importancia, cuando un organismo está sujeto a restricción de alimento es capaz de modificar sus ritmos circadianos para anticiparse conductual y fisiológicamente a la disponibilidad de alimento, aún si el NSQ se encuentra lesionado, lo cual sugiere la existencia de un oscilador sincronizado por alimento (feeding-entrainable oscillator: *FEO*); sin embargo, aunque hasta la fecha se desconoce su ubicación exacta, parecen estar involucradas regiones del hipotálamo dorsomedial (*DMH*), el núcleo parabraquial, el núcleo accumbens y órganos periféricos encargados de procesar nutrientes (Froy, 2010).

A nivel molecular, las oscilaciones del reloj están determinadas por la expresión rítmica de proteínas que interactúan de manera compleja mediante asas de transcripción-traducción, tanto en el NSQ como en los órganos periféricos (Garaulet-Aza, 2009). Los cambios en la concentración de estas proteínas, su localización intracelular, las modificaciones post-traduccionales que sufren (e.g. acetilación, deacetilación), así como el retraso entre su transcripción y traducción originan un ciclo cercano a 24 h (Froy, 2010).

El componente central del reloj molecular (Figura 1) involucra los factores de transcripción CLOCK (proteína del gen que elimina el ritmo circadiano de actividad locomotriz), o su parólogo NPAS, y BMAL1 (proteína tipo ANRT de músculo y cerebro), los cuales forman un dímero en el citosol que se trasloca hacia el núcleo acoplándose a los sitios E-box de los promotores de tres genes *period* (*Per1*, *Per2* y *Per3*), dos genes *cryptochrome* (*Cry1*, *Cry2*), el gen del factor de transcripción *Rev-erba* (factor  $\alpha$  de transcripción reversa del virus de eritroblastosis) y *Rora* (Receptor  $\alpha$  huérfano relacionado con el receptor de ácido retinoico). Cuando los genes *Per* y *Cry* son traducidos, las proteínas PER y CRY resultantes forman dímeros y se traslocan al núcleo inhibiendo la actividad del dímero CLOCK: BMAL1 y por lo tanto su propia transcripción, así como la del gen *Rev-erba*, lo cual promueve indirectamente la transcripción de *Bmal1*. La expresión de *Per* y *Bmal1* en fases opuestas determina en gran medida la duración de ciclo circadiano, aunque la mayoría de los genes mencionados anteriormente se expresan de manera circadiana (excepto *Clock*, el cual es constitutivo) (Garaulet-Aza, 2009; Froy, 2010).

Además de los elementos del reloj molecular mencionados anteriormente, existen otros componentes que desempeñan un papel importante en la regulación del mismo, como las caseína cinasas I épsilon y delta (CKI $\epsilon/\delta$ ), que por una parte fosforilan a las proteínas PER para su degradación y por otra fosforilan al dímero PER:CRY permitiendo su traslocación nuclear, así como los receptores nucleares REV-ERB $\alpha$ , ROR $\alpha$  y ROR $\delta$ , que inhiben y promueven la expresión de *Bmal1*, respectivamente, mediante su acción a través de RORE (Elemento de respuesta a ROR).

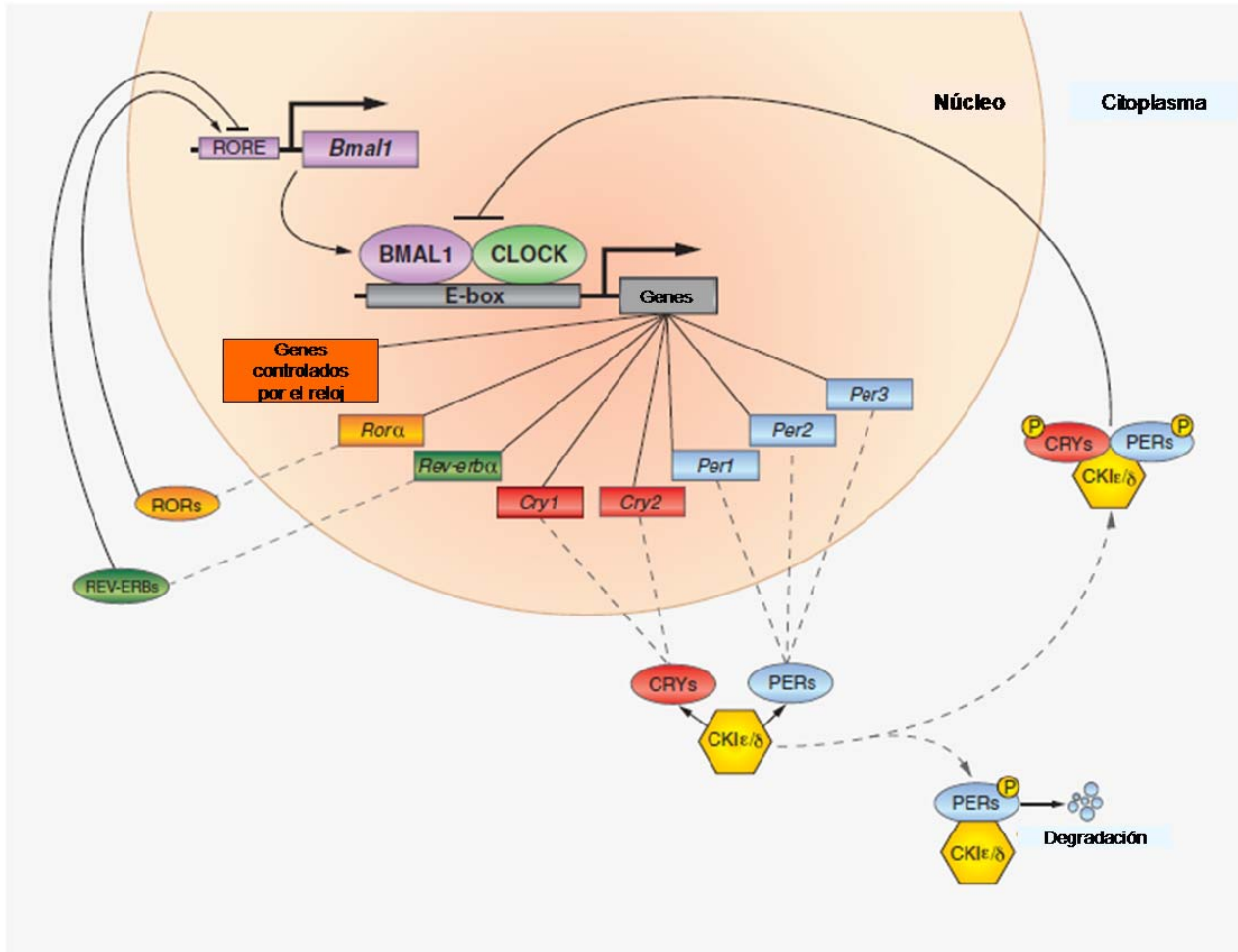


Figura 1. Mecanismo central del reloj molecular de mamíferos. Los factores de transcripción CLOCK y BMAL1 forman dímeros en el citoplasma que se traslocan hacia el núcleo, donde se unen a los sitios E-box activando la transcripción de los genes *Per*, *Cry*, *Rora* y *Rev-Erba*. Las proteínas PER y CRY resultantes forman dímeros en el citoplasma, y al traslocarse al núcleo inhiben la actividad del complejo CLOCK: BMAL1. La fosforilación de PERs y CRYs por la CKI $\epsilon/\delta$ , con la posterior degradación de PERs es un importante modulador de la ritmicidad circadiana. RORs y REV-ERB $\alpha$ , regulan la transcripción de *Bmal1*, a través de RORE (Imagen modificada de Ramsey, *et al.*, 2007).

## **2.2 Sistema circadiano, metabolismo y obesidad.**

El NSQ regula la ingesta de alimento y la homeostasis energética al comunicarse con los núcleos hipotalámicos de la zona subparaventricular (*SPZ*), la región dorsomedial (*DMH*) y la región ventromedial (*VMH*), en la cual se encuentra el núcleo arqueado (*ARC*) (Figura 2). Estas estructuras a su vez inervan otras regiones como el núcleo paraventricular (*PVN*), el hipotálamo lateral (*LH*) y el núcleo preóptico ventrolateral (*VLPO*) que participan en la secreción de corticosteroides, la alimentación y la vigilia, así como en el sueño. La lesión de la *VMH*, el *PVN* y el *DMH* origina obesidad, mientras que la ablación del *LH* lleva a la anorexia debido a una inhibición en la secreción de neuropéptidos orexigénicos (i.e. que estimulan el apetito) como la hormona concentradora de melanina (*MCH*), la orexina A y la orexina B (Ramsey, *et al.*, 2007; Froy, 2010).

La información acerca del estado metabólico del organismo llega al NSQ mediante aferencias desde el *PVN*, el cual es inervado por el sistema nervioso simpático y parasimpático, o bien a través de señales hormonales (como la leptina y la grelina) o de nutrientes que atraviesan la barrera hematoencefálica (como la glucosa y los aminoácidos). Asimismo, el NSQ recibe aferencias del *ARC*, al cual también llega la información del estado metabólico mediante aferencias desde la eminencia media circunventricular o bien por la recepción directa de hormonas y nutrientes (Buijs *et al.*, 2006, Chun-Xia *et al.*, 2006; Froy, 2010).

La leptina, hormona producida por el tejido adiposo blanco que se secreta de manera rítmica y en respuesta a la alimentación, posee receptores en distintas regiones hipotalámicas que incluyen al NSQ, lo cual sugiere que podría mediar la comunicación entre el sistema circadiano y la homeostasis energética. Esta hormona estimula a las neuronas del *ARC* para modular la expresión de transcritos regulados por anfetamina y cocaína (*CART*) y de proopiomelanocortina (*POMC*), los cuales estimularán la secreción de  $\alpha$ -*MSH* (hormona estimulante de los melanocitos) para activar al receptor 4 de melanocortina (*MC4R*), con el fin de disminuir la ingesta de alimento e incrementar el gasto de energía. De manera paralela, la leptina inhibe a las neuronas del *ARC* que expresan neuropéptido Y (*NPY*) y proteínas relacionadas con agouti (*AgRP*), que en condiciones de ayuno estimulan la ingesta de alimento y reducen el gasto energético al inhibir al *MC4R* y a las neuronas que expresan *POMC* y *CART* a través de la liberación de ácido  $\gamma$ -aminobutírico (*GABA*) (Ramsey, *et al.*, 2007).

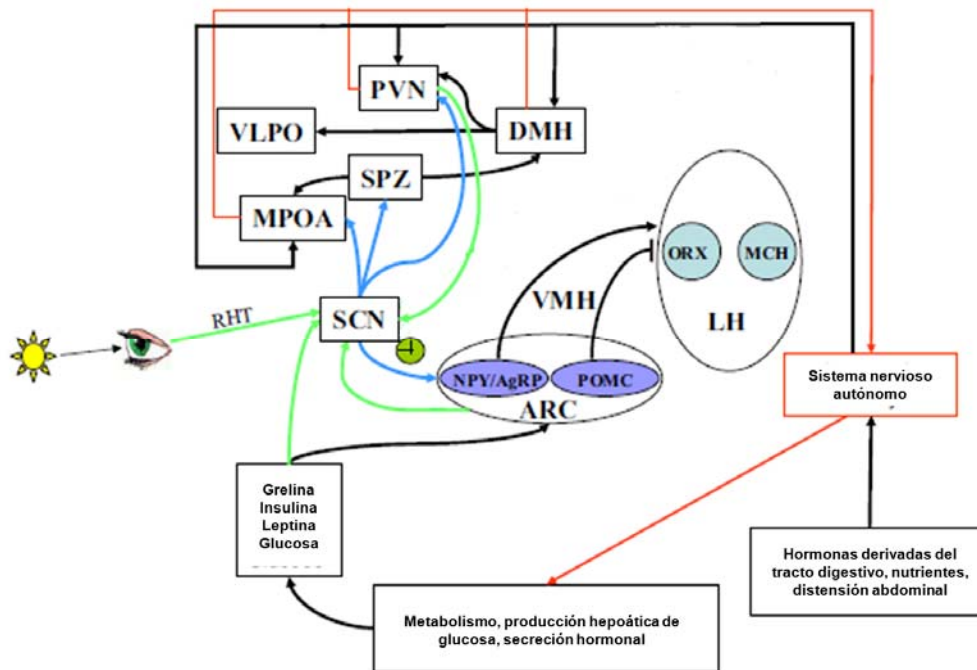


Figura 2. El NSQ y la homeostasis energética. El NSQ puede ser sincronizado por señales luminosas, hormonas y nutrientes, o bien por la información que le llega desde el ARC y el PVN (flechas verdes). A su vez, este núcleo emite eferencias (flechas azules) hacia el ARC, el PVN, el área preóptica medial (MPOA) y la SPZ. Las hormonas y nutrientes pueden afectar directamente al ARC, el cual controla la expresión de orexinas y la MCH en el hipotálamo lateral. La zona subparaventricular del hipotálamo inerva al DMH, que a su vez se comunica con el PVN y el núcleo preóptico ventrolateral (VLPO) regulando la producción de corticosteroides, el sueño y la alimentación. A través del sistema nervioso autónomo, el MPOA, el PVN y el DMH regulan el tejido adiposo, el hígado y otros órganos periféricos (flechas rojas). Las señales como la distensión abdominal, hormonas derivadas del tracto digestivo y nutrientes llegan al sistema nervioso central a través del sistema nervioso autónomo (Imagen modificada de Froy, 2010).

Investigaciones a nivel molecular y en animales con mutaciones en los genes reloj, corroboran la relación del sistema circadiano y el control del balance energético (Eckel-Mahan y Sassone-Corsi, 2009). Los animales con mutaciones en los genes centrales del reloj molecular, como *Clock*, *Bmal* y *Per*, presentan trastornos en el metabolismo de la glucosa y los lípidos, así como en el balance energético. Ratones mutantes y homocigotos para el gen *Clock* (C57BL/6J *Clock*<sup>A19</sup>) consumen cerca del 50% de su alimentación diaria en la fase de luz (siendo animales nocturnos), desarrollan sobrepeso, hiperfagia y síntomas del SM como hiperglicemia, hiperleptinemia, hiperlipidemia y esteatosis hepática (Turek, *et al.*, 2005; William y Schwartz, 2005; Zvonic, *et al.*, 2007), así como una disminución en la expresión de péptidos hipotalámicos como la grelina y las orexinas (Ramsey, *et al.*, 2007; Froy, 2010). Por otra parte, ratones que carecen en su totalidad del gen *Bmal*, o específicamente a nivel del hígado, presentan hipoglucemia en ayuno (Zhang y Kay, 2010), debido a una disminución en la gluconeogénesis, así como trastornos en los ritmos diarios de glucosa y triglicéridos. En ratones mutantes que carecen de *Per2*, el ritmo diario de alimentación y la secreción rítmica de glucocorticoides se pierde, aunque se sigue secretando corticosterona en respuesta a la hipoglucemia (Froy, 2010).

Estudios moleculares recientes han demostrado que los receptores nucleares son proteínas que vinculan el metabolismo con el reloj circadiano (Figura 3), pues los genes que codifican para estos receptores se expresan de manera rítmica en órganos involucrados en el metabolismo de la glucosa y los lípidos, como el hígado, el músculo esquelético y el tejido adiposo (Zhang y Kay, 2010). Algunos receptores importantes son PPAR $\alpha$  (receptor de los activadores de la proliferación de peroxisomas  $\alpha$ ), REV-ERB $\alpha$  y ROR $\alpha$ . El dímero CLOCK: BMAL1 regula la transcripción de *Ppara*, y la proteína resultante se une a PPRE (elemento de respuesta a los proliferadores peroxisómicos), activando la transcripción de *Bmal1* y regulando la expresión de genes involucrados en el metabolismo de la glucosa y los lípidos que participan en el transporte de ácidos grasos libres (FFA). REV-ERB $\alpha$  es un factor de transcripción preadipogénico, expresado de manera rítmica en el tejido adiposo blanco y en el hígado de rata, que facilita la transcripción de genes activados por PPAR $\gamma$ , como *Ap2* y *C/ebp $\alpha$*  (ver anexo de abreviaturas). Por su parte, ROR $\alpha$  regula la lipogénesis y el almacenamiento de lípidos en el músculo esquelético (Ramsey, *et al.*, 2007; Froy, 2010).

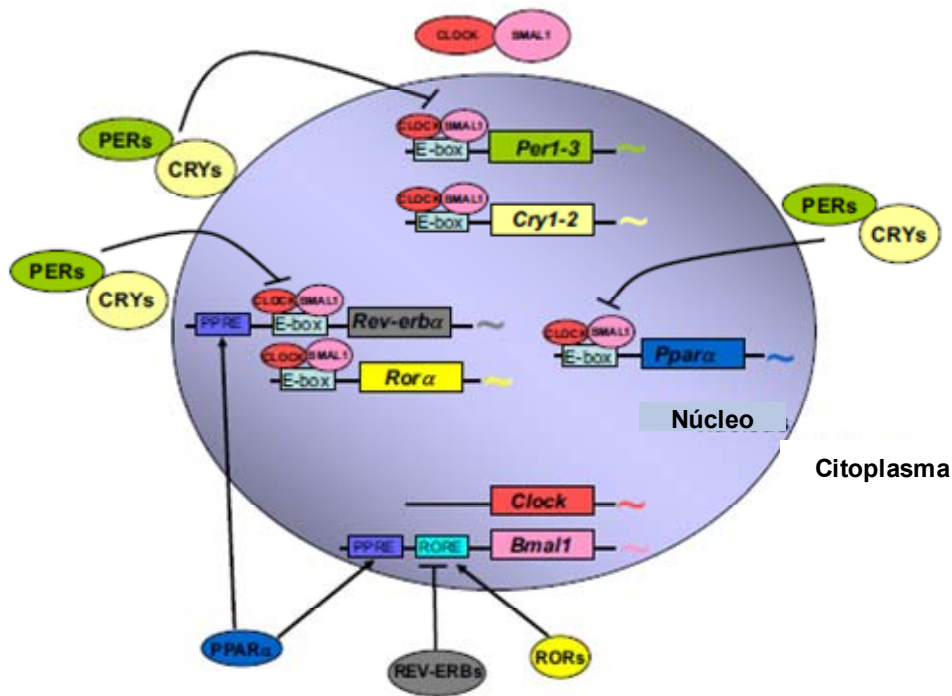


Figura 3. Mecanismo central del reloj molecular de mamíferos y su vínculo con el metabolismo. El mecanismo central del reloj molecular interactúa con receptores que participan en el metabolismo de lípidos y la adipogénesis como REV-ERV $\alpha$  y ROR $\alpha$ . El dímero CLOCK: BMAL1 induce la transcripción de *Ppara*, un receptor nuclear involucrado en el metabolismo de la glucosa y los lípidos. PPAR $\alpha$ , al unirse a PPRE, activa la transcripción de *Rev-erba* y *Bmal1* (Imagen modificada de Froy, 2010).

En el tejido adiposo blanco, la relación entre el reloj circadiano y la homeostasis energética se encuentra bien documentada. Este tejido presenta un patrón rítmico de sensibilidad a la adrenalina, hormona que induce la lipólisis, así como en la expresión de genes que codifican para las hormonas resistina, adiponectina y visfatina en el tejido adiposo visceral y que participan en el metabolismo de la glucosa y los ácidos grasos, sin embargo estos ritmos no se expresan en pacientes obesos (Zvonic, *et al.*, 2007; Froy, 2010). Por otra parte, en animales que carecen de BMAL1 en el tejido adiposo, disminuye la adipogénesis y la expresión de factores adipogénicos y lipogénicos como PPAR $\gamma$ 2, aP2, C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\delta$ , PEPCCK y FAS (ver anexo de abreviaturas). Asimismo, EPAS1, un factor de transcripción hélice-asa-hélice con dominio PAS (bHLH-PAS) relacionado con CLOCK y BMAL, está implicado en la regulación de los adipocitos. La ausencia de EPAS1 altera la manera en que se almacenan los lípidos y disminuye la expresión de GLUT1, GLUT4 e IRS3, elementos importantes que participan en la internalización de glucosa hacia las células (Zvonic, *et al.*, 2007). Por otra parte, en el hígado y en el músculo esquelético, el co-activador transcripcional metabólico PGC1 $\alpha$  (también conocido como PPAR $\gamma$ c1 $\alpha$ ) puede modificar al reloj (regulando la expresión de *Bmal*) y ser regulado por el mismo, pues el RNA mensajero de *Pgc1 $\alpha$*  se expresa rítmicamente en relación con la expresión de *Per2* (Zhang y Kay, 2010).

El tiempo de alimentación por sí mismo regula los osciladores periféricos hallados en órganos como el hígado. En animales nocturnos alimentados *ad libitum* se observa un patrón de alimentación principalmente durante las fases de oscuridad, sin embargo, la restricción de alimento durante las fases de luz revierte la fase del reloj en el hígado de estos animales. Además, estudios recientes sugieren que el ayuno provoca la degradación de CRY1 al activar cinasas dependientes de AMP y la PARP1, que pueden generar un efecto en el reloj (Zhang y Kay, 2010). Asimismo, el estado energético de la célula como un reflejo del patrón de alimentación es capaz de modificar las oscilaciones rítmicas. Cuando los dinucleótidos de nicotinamida adenina se encuentran reducidos (*NADH* y *NADPH*), CLOCK y BMAL1 se dimerizan de forma eficiente y se traslocan al núcleo uniéndose a los sitios E-box de los promotores de los genes antes mencionados; sin embargo, cuando estos dinucleótidos están en su forma oxidada (*NAD<sup>+</sup>* y *NADP<sup>+</sup>*) el dímero CLOCK:BMAL1 no puede unirse a los sitios E-box, de tal manera que la proporción de *NAD(P)<sup>+</sup>* respecto a la de *NAD(P)H* modifica la maquinaria del reloj. Por otra parte, el monofosfato de adenosina (*AMP*), otro indicador del estado energético en la célula, activa a la proteína cinasa activada por *AMP* (*AMPK*) que fosforila la CKI $\epsilon$ , incrementando su actividad y modificando al reloj molecular (Froy, 2010).



Actualmente se reconoce que el reloj circadiano es responsable de las fluctuaciones diarias en la concentración de muchas hormonas involucradas en el metabolismo, como la insulina, el glucagón, la adiponectina, los glucocorticoides, la leptina y la grelina. Estas hormonas son importantes en la regulación de la glucemia, la glucólisis, así como en la concentración de ácidos grasos y triglicéridos, parámetros que se encuentran alterados en pacientes con obesidad y enfermedades como la diabetes tipo II (Duez y Staels, 2008; Froy, 2010). Además, el sistema circadiano modula la expresión y/o actividad de complejos enzimáticos y transportadores involucrados en el metabolismo de la glucosa, los lípidos y los aminoácidos, como la glucógeno fosforilasa, la citocromo oxidasa, la lactato deshidrogenasa, la acetil-CoA carboxilasa, la enzima málica, la sintetasa de ácidos grasos y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Froy, 2010).

### **2.2.1 Patrones rítmicos en la concentración de leptina.**

La leptina desempeña un papel importante en la regulación del balance energético, disminuyendo la ingesta de alimento e incrementando el gasto de energía. Esta hormona se secreta principalmente por el tejido adiposo blanco, por lo cual su concentración en el torrente sanguíneo es proporcional a la cantidad de tejido graso (Chelikani, *et al.*, 2004; Piccione, *et al.*, 2004), aunque el género es un factor que modifica la concentración de esta hormona. De acuerdo con estudios realizados en humanos y ratones, las hembras tienden a presentar mayores concentraciones de leptina respecto a los machos, con una proporción similar de tejido graso, e incluso en humanos se ha observado que este contraste se acentúa durante la fase lútea del ciclo menstrual (Jéquier, 2002); es posible que esta diferencia entre géneros se deba a que la concentración de testosterona se relaciona de manera negativa con los niveles de leptina, como se ha reportado en ratones (Ahrén, 2000).

La concentración plasmática de leptina muestra un patrón rítmico en humanos, en roedores (como la rata y el ratón), e incluso en el caballo, presentándose la mayor concentración de esta hormona en la fase oscura (o escotofase), a pesar de que sus ritmos de actividad y alimentación son distintos (Schoeller, *et al.*, 1997; Kalsbeek, *et al.*, 2001; Piccione, *et al.*, 2004).

Hasta la fecha se desconocen del todo cuáles son los factores que originan el ritmo diario de leptina. En humanos, algunas investigaciones muestran que el ritmo de esta hormona se encuentra influenciado por otras hormonas, como el cortisol y la insulina, y puede modificarse en respuesta a los patrones de alimentación (Schoeller, *et al.*, 1997); sin embargo, estudios más recientes indican que este ritmo no se modifica por la ingesta de alimento, el aumento de insulina o el de cortisol, cuyo pico máximo precede al pico de leptina (Jéquier, 2002). Sin

embargo, se ha encontrado una correlación entre la concentración de insulina y leptina en humanos que padecen diabetes con deficiencia de insulina, quienes también tienen bajas concentraciones de leptina (Ahrén, 2000).

En las ratas, el NSQ podría desempeñar el papel más importante al generar el ritmo diario de leptina, pues esta estructura posee receptores para esta hormona y su lesión elimina el patrón diario observado; además, *in vitro* la leptina puede generar avances de fase en la oscilación de las células del NSQ (Piccione, *et al.*, 2004). Asimismo, se mantiene el ritmo diario de leptina independientemente de factores como la ingesta de alimento y la secreción hormonal (Kalsbeek, *et al.*, 2001, Froy, 2010). Por otra parte, en ratones la liberación nocturna de leptina se correlaciona con la liberación de insulina en respuesta a la alimentación, por lo cual el patrón diario de leptina no se presenta en animales bajo condiciones de ayuno (Boden, *et al.*, 1996; Ahrén, 2000).

### **2.2.2 Patrones rítmicos en la concentración de insulina.**

La insulina es una hormona secretada por las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans del páncreas, en respuesta a las concentraciones elevadas de glucosa en la sangre, que desempeña un papel importante en la regulación del balance energético, modificando el uso de la glucosa y los triglicéridos en el organismo y actuando a nivel hipotalámico para disminuir la ingesta de alimento y aumentar el gasto de energía (Milagro y Marques-Lopes 2002). La insulina eleva la captación de glucosa en el músculo y en el tejido adiposo, activa la glucólisis e inhibe la gluconeogénesis en el hígado, aumenta la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos en el hígado y en el tejido adiposo, eleva la síntesis de glucógeno en el hígado y en el músculo, así como la captación de aminoácidos, promoviendo la síntesis de proteínas musculares (Dominiczak, 2006).

La concentración plasmática de insulina muestra un ritmo diario que se presenta incluso en humanos con sobrepeso y en ayuno; sin embargo existe controversia respecto a los factores que generan este ritmo. Estudios realizados en humanos, muestran diferencias entre los niveles de insulina por la mañana respecto a la tarde, presentando concentraciones superiores en la mañana (posteriores al pico de glucosa) aún después de 72 h de ayuno, en individuos con un peso normal y con sobrepeso (tanto mujeres como hombres); sin embargo, los individuos con sobrepeso muestran concentraciones de insulina más elevadas (en particular las mujeres), indicando un posible estado de resistencia a la insulina (Merl, *et al.*, 2004). Por otra parte, en ratones alimentados *ad libitum*, se ha encontrado un ritmo diario de insulina que muestra su

pico máximo durante la fase nocturna, el cual podría estar asociado con su patrón de alimentación (Ahrén, 2000).

De acuerdo con algunos estudios realizados en humanos, las fluctuaciones en la concentración plasmática de insulina no se presentan de manera paralela al patrón diario de la concentración de glucosa, de tal manera que el ritmo diario de insulina no es consecuencia directa del ritmo de glucosa (Van Cauter, *et al.*, 1991).

### **2.2.3 Patrones rítmicos en la concentración de triglicéridos.**

Los ácidos grasos son extraordinariamente efectivos para el almacenamiento de energía, por lo cual muchos organismos los almacenan como triglicéridos, principalmente en el tejido adiposo blanco. Los triglicéridos desempeñan una función importante en el estado metabólico de los organismos, tanto en períodos de disponibilidad de alimento como en condiciones de ayuno, fungiendo no sólo como reservas de energía, sino también como fuente de ácidos grasos esenciales y no esenciales, así como precursores para la síntesis de fosfolípidos (Coleman y Lee, 2004).

Debido a que los procesos homeostáticos de un organismo, así como sus demandas energéticas, fluctúan significativamente durante el día, los procesos metabólicos del tejido adiposo deben coordinarse con el metabolismo de otros tejidos con el fin de anticipar los cambios en las necesidades del organismo y mantener el balance energético (Zvonic, *et al.*, 2007). En condiciones normales, cuando incrementan las necesidades energéticas, se lleva a cabo la lipólisis, para hidrolizar los triglicéridos en ácidos grasos y glicerol, mientras que al disminuir las necesidades energéticas se genera la lipogénesis, permitiendo la formación de triglicéridos para su almacenamiento. La lipólisis es estimulada por hormonas como el glucagón, la adrenalina y el cortisol, e inhibida por la insulina.

Estudios realizados en roedores, muestran que la concentración plasmática de triglicéridos exhibe un patrón rítmico, presentándose aún en condiciones de ayuno e incluso en animales obesos. Investigaciones en ratas Zucker, tanto obesas como delgadas alimentadas *ad libitum*, muestran un patrón rítmico en la concentración de triglicéridos aunque con fases distintas en la expresión de los niveles máximo y mínimo. En la rata Zucker el pico máximo en la concentración de triglicéridos se presenta en la fase oscura, y la concentración es mayor en los individuos obesos en relación con los delgados (Lanza-Jacoby, 1986). Por otra parte, en el trabajo realizado por Escobar y colaboradores en 1998, se observó que el pico de triglicéridos en las ratas macho Wistar alimentadas *ad libitum*, fue distinto al de los animales con 12 h de ayuno (ambos grupos bajo un ciclo de luz-oscuridad 12:12), ya que en el primer grupo el pico

se presentó dos horas antes del inicio de la fase luminosa (o fotofase), mientras que en las ratas en ayuno se presentó tres horas después de lo esperado (es decir en la fase de luz), además, la concentración sérica de triglicéridos fue mayor en las ratas alimentadas.

#### **2.2.4 Patrones rítmicos en la concentración de glucocorticoides.**

Los mecanismos homeostáticos que regulan la concentración sanguínea de las hormonas glucocorticoides (como el cortisol y la corticosterona), son esenciales para el funcionamiento adecuado de algunos procesos implicados en el balance energético, como la lipogénesis, la lipólisis (mediante la activación de lipasas sensibles a hormonas), la gluconeogénesis, y la expresión de neuropéptidos hipotalámicos que participan en el control del apetito, entre los que se encuentran el *NPY* y el factor liberador de corticotropinas (*CRH*). Los glucocorticoides se han vinculado con el desarrollo de obesidad debido a sus efectos orexigénicos y adipogénicos, o bien al contrarrestar los efectos de la insulina promoviendo la gluconeogénesis y disminuyendo la sensibilidad a la insulina en tejidos periféricos (Leal-Cerro, *et al.*, 2001; Pasquali, *et al.*, 2006).

Los glucocorticoides presentan un patrón de liberación rítmico durante el día, presentándose su mayor concentración justo antes del inicio del período de actividad (Ruiter, *et al.*, 2003; Dickmeis, 2009). De tal manera que en los animales nocturnos la concentración plasmática de glucocorticoides incrementa hacia el final del período de luz, mientras que en los animales diurnos (incluyendo el humano) el pico se presenta durante las primeras horas del amanecer (Sietse, *et al.*, 2005; Dickmeis, 2009).

La secreción rítmica de glucocorticoides se encuentra regulada por el sistema circadiano, siendo el NSQ el que controla su secreción a través del eje hipotálamo-hipófisis-adrenales (HHA) y del sistema nervioso autónomo, independientemente del patrón de alimentación (Sietse, *et al.*, 2005), además, existe un reloj periférico en la glándula adrenal que regula la sensibilidad a la hormona adrenocorticotrópica (*ACTH*). En general, el patrón rítmico en la secreción de glucocorticoides podría contribuir a la sincronización de los relojes celulares autónomos en el cuerpo, interactuando con ellos para regular la homeostasis durante el día (Dickmeis, 2009).

Es probable que la obesidad modifique la concentración plasmática de glucocorticoides; sin embargo, diversos estudios realizados en humanos y roedores no son contundentes al respecto. Se ha reportado que los humanos obesos muestran concentraciones plasmáticas de cortisol iguales, más elevadas o disminuidas respecto a individuos normales (Jessop, *et al.*, 2001). Mientras que modelos animales, como el ratón *ob/ob* y la rata Zucker, presentan una

concentración elevada de corticosterona, lo cual puede revertirse mediante adrenalectomía (Björntorp y Rosmond 2000).

### **2.2.5 Patrones rítmicos en la concentración de glucosa.**

Los mamíferos han desarrollado distintos mecanismos que les permiten regular la concentración de glucosa sanguínea en intervalos estrechos, para el funcionamiento adecuado de las células (especialmente del sistema nervioso), por lo cual alteraciones en su concentración generan enfermedades como la diabetes tipo II.

El sistema nervioso central (incluyendo al NSQ) juega un papel importante en la anticipación del metabolismo de la glucosa conforme a las necesidades del organismo, mientras que el sistema endocrino controla las respuestas inmediatas ante las demandas de ésta. La activación del sistema nervioso simpático y la secreción de hormonas como la adrenalina, el glucagón y la corticosterona incrementan la concentración sanguínea de glucosa, mientras que la activación vagal y la acción de la insulina disminuyen su concentración (Ruiter, *et al.*, 2003).

La glucemia es el resultado de factores como la ingesta de alimento, la producción hepática de glucosa y cambios en su tolerancia, ésta última dependiendo de mecanismos como la secreción de insulina así como de la disponibilidad y la sensibilidad de los receptores de esta hormona. La concentración plasmática de glucosa muestra un patrón rítmico de 24 h generado por el NSQ, independientemente del patrón en la ingesta de alimento también regulado por el mismo núcleo (Kalsbeek, *et al.*, 2001; La Fleur, *et al.*, 2001; Ruiter, *et al.*, 2003; Cailotto, *et al.*, 2005). Sin embargo, en humanos se ha demostrado que el ayuno prolongado de hasta 72 h disminuye gradualmente la glucemia inhibiendo el patrón circadiano (Merl, *et al.*, 2004).

En los roedores nocturnos, la concentración plasmática de glucosa incrementa hacia el final de la fase de luz, justo antes del inicio de su principal período de actividad, disminuyendo durante el transcurso de la escotofase (La Fleur, *et al.*, 2001). Este fenómeno también se observa en humanos, sin embargo al ser de hábitos diurnos el aumento en la concentración de glucosa se presenta durante las primeras horas del amanecer (Kalsbeek, *et al.*, 2001), siendo el momento del día en el cual coinciden el pico más alto de insulina y la mayor sensibilidad a esta hormona en los tejidos periféricos (Ramsey, *et al.*, 2007; Garaulet-Aza, *et al.*, 2009).

Se ha estudiado el ritmo diario en la glucemia y su asociación con patrones hormonales como los glucocorticoides, los cuales generan un efecto hiperglucémico cuando la concentración sanguínea de glucosa disminuye (como en una situación de ayuno). Sin embargo, estas hormonas no son el factor principal que determina la ritmicidad de la glucemia pues, aunque el pico del ritmo diario de los glucocorticoides coincide con el pico de glucosa, el

inhibir la secreción de estas hormonas no altera el ritmo de glucosa. Además, a pesar de que los glucocorticoides disminuyen la sensibilidad a la insulina en los tejidos periféricos, su pico se presenta cuando la sensibilidad a la insulina es mayor, por lo cual el pico de glucosa sanguínea no es el resultado de una disminución en la sensibilidad a la insulina por acción de los glucocorticoides. Por otra parte, se ha propuesto la posibilidad de que el glucagón determine el ritmo diario en la glucemia, como sucede en las ratas bajo condiciones de ayuno, ya que además existe una interconexión nerviosa entre el NSQ y el páncreas (La Fleur, *et al.*, 1999; Ruiter, *et al.*, 2003).

### **2.3 El ciclo de sueño-vigilia.**

El ciclo de sueño-vigilia es una manifestación básica de la actividad del sistema nervioso central (Durán-Hernández, *et al.*, 2007), que se presenta en los mamíferos y probablemente en todos los vertebrados. El sueño es un estado reversible de inactividad conductual de los organismos, acompañado de una postura de inmovilidad o reposo propia de cada especie, en el cual disminuye la capacidad de responder ante estímulos ambientales externos (Montes-Rodríguez, *et al.*, 2006) y se caracteriza por presentar un patrón de ondas cerebrales específicas (Purves, *et al.*, 2004), generado por mecanismos de activación e inhibición neuronal.

El sueño es un proceso vital cuya privación genera trastornos en el organismo, como se ha observado en estudios realizados con ratas, las cuales disminuyen su peso corporal (a pesar del incremento en la ingesta de alimento), la capacidad de controlar su temperatura corporal, son susceptibles a enfermedades infecciosas y fallecen en un período de aproximadamente tres semanas si se mantiene la privación de sueño. Por otra parte, la privación de este en humanos genera un deterioro en la memoria, se reducen las capacidades cognitivas, produce cambios de humor e incluso alucinaciones (Purves, *et al.*, 2004).

Las funciones que se le han atribuido al sueño son diversas, ya que por mucho tiempo se ha propuesto que sirve para restaurar al cerebro y sus neuronas del desgaste ocurrido durante la vigilia, hipótesis que se encuentra sustentada por el efecto de la privación del sueño sobre el organismo, como somnolencia, la capacidad disminuida para responder ante estímulos ambientales, o bien para retener información (Montes-Rodríguez, *et al.*, 2006). Otras funciones que se le han atribuido al sueño son la conservación de energía, ya que durante este estado se restauran los niveles de glucógeno en el cerebro (Purves, *et al.*, 2004), la termorregulación cerebral, la desintoxicación del cerebro, la plasticidad cerebral, el desarrollo y establecimiento

de circuitos neuronales y, en los adultos, se ha vinculado con el aprendizaje y la memoria (Maquet, 2001).

El registro de la actividad electroencefalográfica en mamíferos como el gato, la rata, el ratón y el humano, ha permitido clasificar los estados de vigilancia en dos fases principales: la vigilia y el sueño. Este último se compone a su vez de dos estados distintos y alternantes que poseen mecanismos neurales e indicadores fisiológicos únicos: el sueño de no-movimientos oculares rápidos (NoMOR), en el cual se incluye al sueño de ondas lentas (SOL), y el sueño con movimientos oculares rápidos (SMOR).

Durante la vigilia, se observa un ritmo de actividad eléctrica cerebral rápida y de bajo voltaje; se presentan movimiento oculares coordinados, tono muscular elevado en los músculos antigravitatorios y la interacción del organismo con el medio que le rodea (Purves, *et al.*, 2004; Montes-Rodríguez, *et al.*, 2006; Datta y MacLean, 2007).

El sueño NoMOR se caracteriza por una disminución en la frecuencia de la actividad eléctrica cerebral, una disminución en el tono muscular (respecto al observado en vigilia) y movimientos oculares lentos y asincrónicos. En humanos, el sueño NoMOR se divide en cuatro etapas, cada una de ellas relacionada con el sueño profundo, pues al aumentar el tiempo de sueño las ondas dominantes son de alto voltaje y de baja frecuencia (correspondientes a las etapa III y IV, también denominadas sueño de onda lentas, SOL). Por otra parte, en animales como el gato, la rata y el ratón, el sueño NoMOR se divide en dos etapas: SOL I y II; en la primera se presentan husos de sueño en el electroencefalograma cortical (EEG), mientras que en la segunda etapa sólo se observan ondas de gran amplitud y de baja frecuencia (0.1 a 4 Hz) (Datta y McLean, 2007), como se muestra en la Figura 4.

Por su parte, en el SMOR se presenta una actividad eléctrica cerebral rápida de bajo voltaje, con presencia de ritmo theta ( $\theta$ ) hipocámpico; disminución del tono muscular de los músculos antigravitatorios, en comparación con el sueño NoMOR, se presentan movimientos oculares rápidos y ondas ponto-genículo-occipitales (PGO) (Purves, *et al.*, 2004; Montes-Rodríguez, *et al.*, 2006).

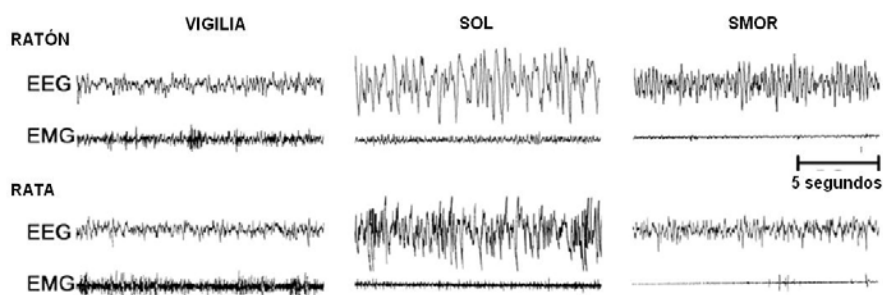


Figura 4. Apariencia poligráfica típica de la actividad eléctrica cerebral y muscular del ratón y la rata adultos en las distintas fases del ciclo sueño-vigilia. SOL: sueño de ondas lentas; SMOR: sueño con movimientos oculares rápidos; EEG: electroencefalograma; EMG: electromiograma (Imagen modificada de Datta y McLean, 2007)

El ciclo sueño-vigilia se expresa de manera rítmica en un período cercano a 24 h, siendo el NSQ la estructura que rige este ciclo y otros procesos fisiológicos sincronizados con el sueño, como la temperatura corporal, la secreción hormonal (e.g. el cortisol, la hormona del crecimiento y la vasopresina), la presión sanguínea y la producción de orina (Purves, *et al.*, 2004). En los humanos adultos y en los primates no-humanos, la distribución circadiana del sueño es monofásica, de tal manera que el sueño NoMOR y SMOR se alternan a lo largo de cuatro o seis ciclos de sueño cada noche; sin embargo, en el ratón, la rata y el gato, la distribución circadiana del sueño es polifásica, siendo la alternancia del sueño NoMOR y del SMOR de menor duración, y llevándose a cabo tanto en el día como en la noche (Datta y McLean, 2007).

El ciclo sueño-vigilia se encuentra regulado por una red compleja de mecanismos neurales que dan lugar a cada uno de los estados, como se muestra en la Figura 5.

El mecanismo de generación de la vigilia involucra sistemas interdependientes que actúan a nivel talámico y extratalámico. Los núcleos *locus coeruleus* (noradrenérgico) y rafe dorsal (serotoninérgico) presentan una frecuencia de disparo máxima durante la vigilia, que disminuye durante el SOL y es mínima durante el SMOR. Esos núcleos envían proyecciones hacia el tálamo y la corteza, encargándose de mantener desincronizada la actividad cortical, junto con los núcleos tegmentales pedúnculo pontinos (TPP), los núcleos tegmentales latero-dorsales (TLD), el núcleo de Meynert y la sustancia innominada del cerebro basal (estos tres últimos mediante neuronas colinérgicas). Por otro lado, la formación reticular proyecta fibras noradrenérgicas y serotoninérgicas hacia el hipotálamo, sub-tálamo y cerebro basal, corteza e hipocampo; a su vez, el hipotálamo posterior envía fibras histaminérgicas difusas hacia la corteza y el tálamo. Además, el hipotálamo lateral inerva al núcleo de rafe, y los núcleos TPP y TLD mediante neuronas que contienen hipocretinas (u orexinas) promoviendo la vigilia y/o la activación cortical (Durán-Hernández, *et al.*, 2007; Datta y McLean, 2007).

Durante el SOL disminuye la actividad neuronal de la corteza y el tálamo, en esta etapa disminuye la frecuencia de disparo de las neuronas del núcleo de rafe, mientras que los núcleos del tracto solitario, talámicos inespecíficos, los de la región preóptica hipotalámica anterior y el cerebro basal anterior se activan al máximo. Estos núcleos poseen neuronas que actúan a través de proyecciones inhibitorias directas e indirectas en los sistemas aminérgicos, colinérgicos y orexinérgicos, por su parte, las neuronas GABAérgicas de la corteza y el hipocampo se activan. El inicio y mantenimiento de SOL parece estar controlado por la activación de los núcleos del rafe *dorsalis* y *centralis* que inhiben el efecto de despertar del sistema reticular, permitiendo al tálamo medial inducir los husos de sueño y la sincronización



cortical. Asimismo, la estimulación eléctrica en el cerebro basal anterior (en las proximidades del núcleo del tracto solitario), en el hipotálamo lateral, en el núcleo antero-ventral del tálamo y en el área preóptica, produce sincronización cortical. Otras regiones implicadas en el SOL incluyen al área preóptica media, la banda diagonal de Broca, el área preóptica magnocelular y la sustancia innominada subpálida (que constituyen una región compleja que contiene vías y elementos neuronales en donde se integran procesos hormonales, metabólicos y conductuales), así como las neuronas de la sustancia innominada y del globo pálido (Durán-Hernández, *et al.*, 2007; Datta y McLean, 2007).

El SMOR es el resultado de la activación de sustratos neuronales localizados en el tallo cerebral a nivel de la protuberancia. Esta fase del sueño está regulada por dos poblaciones neuronales: las neuronas que activan los mecanismos colinérgicos/colinoceptivos en varias regiones de la formación reticular pontina (incluyendo el área reticular tegmental dorsal, las áreas reticulares laterales, porciones de la médula y la formación reticular mesencefálica) se activan durante el SMOR, mientras que las neuronas del *locus ceruleus* y del núcleo rafe dorsal se inactivan. La atonía muscular y las ondas PGO caracterizan al SMOR, la primera es causada por una hiperpolarización de las motoneuronas de la médula espinal, así como por una inhibición de la actividad tálamo-cortical; mientras que las espigas PGO se originan en el núcleo colinérgico mesopontino, así como en las neuronas de los núcleos TLD y TPP de la formación reticular pontina, estas espigas se propagan desde la región pontina al cuerpo geniculado lateral y a la corteza occipital (Durán-Hernández, *et al.*, 2007; Datta y McLean, 2007).

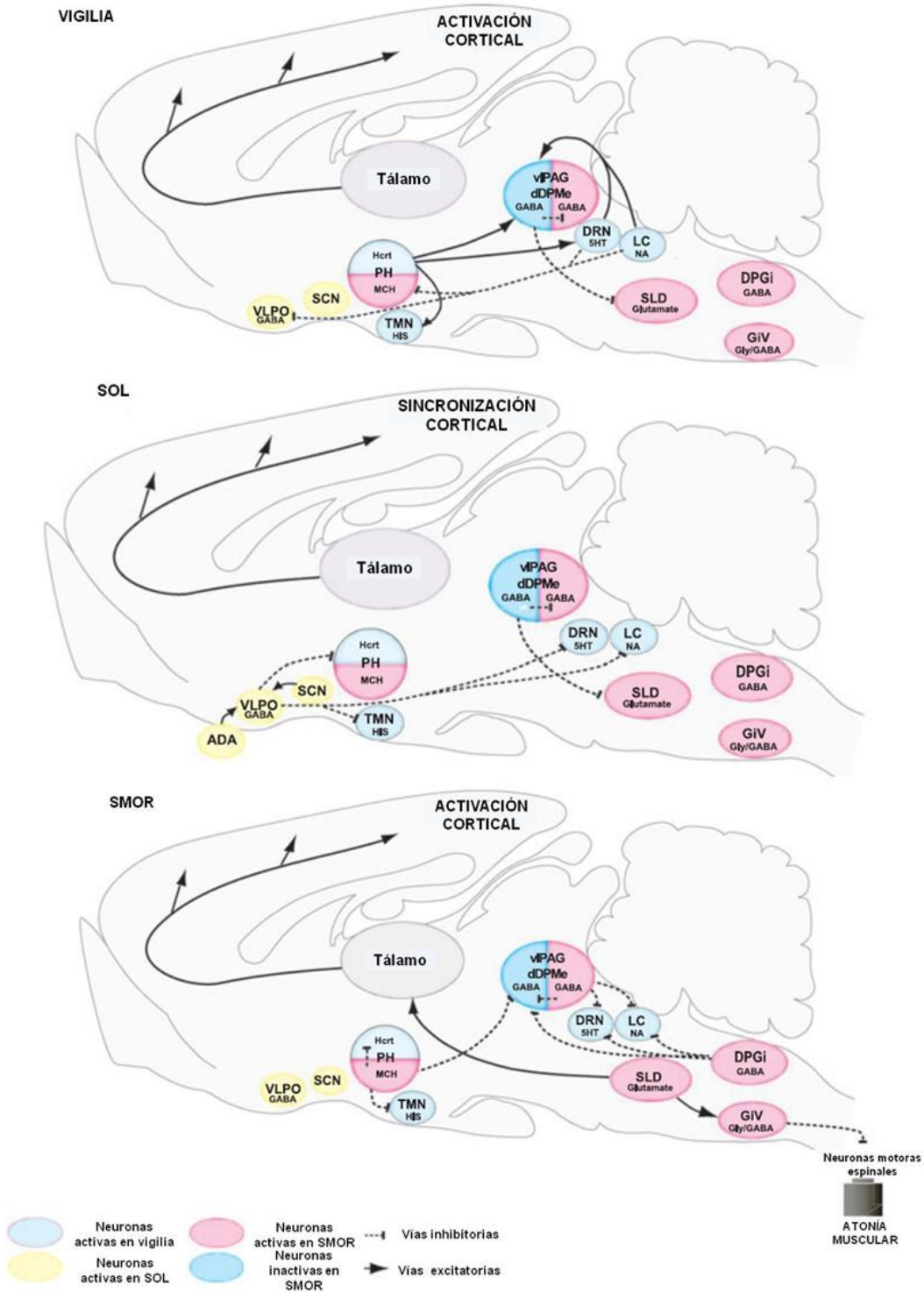


Figura 5. Modelo de la red compleja de mecanismos neuronales que dan lugar a la vigilia, el sueño de ondas lentas (SOL) y el sueño con movimientos oculares rápidos (SMOR). Abreviaturas: 5HT, serotonina; ADA, adenosina; DPGi, núcleo reticular paragigantocelular dorsal; dDPMe, núcleo reticular mesencefálico profundo; DRN, núcleo rafe dorsal; GABA, ácido  $\gamma$  amino-butírico; GIV, núcleo reticular gigantocelular ventral; Gly, glicina; Hcrt, neuronas secretoras de hipocretinas (orexinas); HIS, histamina; LC, locus coeruleus; NA, noradrenalina; MCH, neuronas que secretan hormona concentradora de melanina; PH, hipotálamo posterior; SCN, núcleo supraquiasmático; SLD, núcleo sublaterodorsal; TMN, núcleo tuberomamilar; vPAG, periacueductal ventrolateral gris; VLPO, núcleo preóptico ventrolateral (Imagen modificada de Fort, *et al.*, 2009).

## **2.4 El ciclo de sueño-vigilia y la obesidad.**

Las alteraciones en el ciclo de sueño-vigilia están vinculadas con disfunciones metabólicas, que a su vez generan anomalías en el sueño, formando así un mecanismo de retroalimentación que desarrolla patologías como la obesidad y otros problemas de salud asociados con la misma (Trenell, *et al.*, 2007; Wolk y Somers, 2007).

Actualmente, existe evidencia que sugiere que la disminución en la duración del sueño en los humanos se encuentra asociada con un aumento en el índice de masa corporal (IMC: peso en kilogramos dividido por el cuadrado de la talla en metros), y con un aumento en la incidencia de diabetes tipo II. La relación entre el IMC y la duración del sueño, indica que los individuos con sobrepeso y obesidad (IMC= 25-29.9 y 30-39.9 kg/m<sup>2</sup>, respectivamente), duermen menos que los individuos con un IMC normal (IMC= 18.5-24.9 kg/m<sup>2</sup>). Sin embargo, las personas con obesidad extrema (IMC= <40kg/m<sup>2</sup>) duermen más que aquellas con menor grado de obesidad (Kalsbeek, *et al.*, 2001).

Hasta la fecha, no se ha esclarecido la relación causa-efecto que existe entre la duración del sueño y la obesidad en los humanos, pues el dormir períodos de 6 h o mayores de 8 h se asocian con trastornos metabólicos. En las personas obesas que duermen durante períodos prolongados, uno de los malestares más comunes es la somnolencia excesiva durante el día (*EDS excessive daytime sleepiness*), el cual se ha vinculado con desórdenes respiratorios del sueño (como la apnea obstructiva); sin embargo, existen estudios que sugieren que la obesidad es un factor de riesgo para el desarrollo de *EDS* independientemente de los desórdenes respiratorios y la edad (William y Schwartz, 2005). Es posible que trastornos como la *EDS* sean resultado de un incremento en la secreción de citocinas que promueven el sueño, particularmente del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (*TNF  $\alpha$* ) y la interleucina-6 (IL-6), ambas secretadas por los adipocitos (Jenkins, *et al.*, 2005).

Por otra parte, se ha demostrado que la restricción de sueño en humanos puede afectar el balance energético a través de tres vías: incrementando el apetito, la disponibilidad de tiempo para comer y disminuyendo el gasto de energía (Van Cauter y Knutson, 2008), lo cual genera una ganancia de peso corporal. Estas vías se relacionan con alteraciones hormonales, como cambios en la concentración de cortisol, tirotrópica, hormona del crecimiento, leptina y grelina, modificando además sus ritmos diarios (Taheri, *et al.*, 2004; Wolk y Somers, 2007).

Estudios realizados en humanos saludables, indican que la restricción parcial de sueño (6 días consecutivos durmiendo 4 h, seguidos por un período de recuperación de 7 días con 9 h de sueño) es capaz de modificar la concentración sanguínea de leptina, siendo en promedio

19% menor en los individuos con dicha restricción, así como el patrón rítmico de esta hormona y del cortisol, pues el pico de leptina y la concentración más baja de cortisol se adelantan 2 h y 1.5 h respectivamente, en comparación con los individuos que duermen el tiempo adecuado. Además, en las personas con restricción de sueño disminuye la tolerancia a la glucosa alrededor del 40% respecto a la situación normal y se eleva la concentración de grelina, incrementando la ingesta de alimento particularmente rico en carbohidratos (Van Cauter y Knutson, 2008; Garaulet-Aza, *et al.*, 2009). Asimismo, los individuos que padecen apnea obstructiva del sueño muestran un incremento en la concentración de grelina y alteraciones relacionadas con el SM, como la resistencia a la insulina, la hipertensión, la disminución en la concentración de *HDL* y el acúmulo de grasa visceral (Harsch, *et al.*, 2003; Wolk y Somers, 2007). En las ratas con privación de sueño, se han observado cambios en los niveles de grelina y de leptina de manera similar a lo ocurrido en humanos (Bodosi, *et al.*, 2004).

Es probable que las orexinas A y B que se sintetizan en el hipotálamo lateral sean el vínculo entre el sueño y los patrones de alimentación, ya que estas hormonas desempeñan un papel importante en la regulación del balance energético, estimulando el apetito, así como en el ciclo de sueño-vigilia, promoviendo la vigilia (Sakurai, 2004; Adamantidis y Lecea, 2009). En humanos con privación de sueño, el incremento de orexinas activa al sistema nervioso simpático, el cual disminuye la concentración de leptina y la sensibilidad a la insulina (Van Cauter y Knutson, 2008). Por otro lado, las mutaciones en el receptor de la orexina B o la delección del gen que codifica para orexinas generan narcolepsia en perros y ratones, respectivamente. Asimismo, en los humanos con narcolepsia se encuentran disminuidos los niveles de orexinas y se presenta un incremento en el índice de masa corporal (Ramsey, *et al.*, 2007).

La obesidad es capaz de modificar la distribución temporal de los estados de vigilancia, como se ha reportado en estudios realizados con ratones C57B6/L con obesidad inducida por una dieta rica en grasas, en los cuales se reduce la vigilia y aumenta el SOL principalmente durante la escotofase (Jenkins, *et al.*, 2005). En ratones mutantes *ob/ob* (con deficiencia de leptina y de fenotipo obeso), la arquitectura del sueño se fragmenta, mostrándose un mayor número de despertares durante el tiempo de sueño, un aumento en las transiciones de fase, brotes de sueño más frecuentes (aunque de menor duración) y un aumento en el tiempo de sueño NoMOR, respecto a los ratones silvestres (Laposki *et al.*, 2006). Mientras tanto, en la rata Zucker (un modelo genético de obesidad), el efecto de la obesidad en las fases del sueño no es tan claro, ya que estos animales muestran un porcentaje mayor de SOL en comparación con las ratas Wistar no obesas; sin embargo, al comparar ratas Zucker no obesas con obesas,

éstas últimas presentan un incremento sólo en el número de transiciones del sueño NoMOR al sueño MOR, sin aumentar el tiempo total de sueño NoMOR (Megirian *et al.*, 1998).

Por otra parte, como ya se señaló anteriormente, la restricción de sueño altera los ritmos diarios y la concentración de hormonas que participan en el balance energético, como la leptina y la grelina; sin embargo estas hormonas a su vez son capaces de modificar el ciclo de sueño-vigilia. La administración de grelina incrementa la proporción de sueño NoMOR en los humanos y en los ratones, aunque parece no afectar esta fase del sueño en las ratas (Prinz, 2004). Por otra parte, la deficiencia de leptina en los ratones mutantes *ob/ob* fragmenta la arquitectura del sueño, produce alteraciones en la consolidación del sueño y en la ritmicidad diurna (Laposky, *et al.*, 2006; Ramsey, *et al.*, 2007).

### **2.5 El ratón de los volcanes como modelo animal.**

El ratón de los volcanes, *Neotomodon alstoni*, (Figura 6) es un roedor endémico de México descrito originalmente por Merriam en 1898. Desde entonces, su posición taxonómica ha sido motivo de controversia debido a la proximidad filogenética del género *Neotomodon* con el género *Peromyscus* (Villalpando *et al.*, 2000); sin embargo, actualmente se sitúa dentro del orden Rodentia, familia Muridae y subfamilia Sigmodontinae (Chávez, 2005).



Figura 6. *Neotomodon alstoni* (Chávez, 2005)  
Foto: Gerardo Ceballos

El ratón de los volcanes habita exclusivamente en el Eje Neovolcánico Transversal de México, situado entre los 18° y 22° latitud Norte con un intervalo altitudinal que oscila entre los 2,600 a 4,500 m sobre el nivel del mar (Luis, *et al.*, 2000). Su hábitat se encuentra constituido por bosque mixto de pino y encino en las partes bajas, mientras que en las partes más altas se encuentran asociaciones de pino y abeto, culminando cerca de la línea de nieve perpetua en bosque formado casi exclusivamente por pino. Asimismo, la presencia de zacatón es un factor

principal del hábitat de este ratón, ya que construye sus madrigueras principalmente entre las raíces de gramíneas amacolladas mostrando una preferencia de microhábitat en el zacatonal y el bosque-zacatonal (Davis y Follansbee, 1945; Chávez, 2005).

*Neotomodon alstoni* es un roedor de hábitos nocturnos que inicia su actividad al atardecer y la termina cerca de la media noche, mostrando su pico de actividad entre las 20:00 y las 21:00 h (Davis y Follansbee, 1945). Es un animal omnívoro que se alimenta de tallos, brotes y hojas de plantas herbáceas (Chávez, 2005), así como de frutos (fresa y zarzamora en la temporada de lluvias, y capulincillo a finales del año), granos de polen de diversas plantas, y artrópodos del orden Coleóptera, hormigas y larvas de lepidópteros (Álvarez y Mayo-Aceves, 1993).

Este roedor es muy dócil y capaz de reproducirse en condiciones de cautiverio durante todo el año, al igual que en su hábitat natural, con una tasa de natalidad más elevada de abril a septiembre. Las hembras presentan varios ciclos estrales al año, con una duración promedio de 4.5 días, y períodos de gestación de 25 a 35 días, después del cual paren una camada de 3 crías en promedio. Estudios de este animal en el laboratorio, señalan que puede tratarse de una especie monogámica en la cual los machos exhiben cuidado parental (Luis, *et al.*, 2000, 2004, 2009).

Estudios previos del ratón de los volcanes, han demostrado que puede ser empleado como modelo biológico en investigaciones de genética (Rodríguez Romero, 1974), morfología (Villalpando, *et al.*, 2000; 2005), ecología (Álvarez y Mayo-Aceves, 1993), reproducción (Granados y Hoth, 1989; Luis, *et al.*, 2000, 2004, 2009; Fuentes-Granados, 2008; Luis-Díaz, *et al.*, 2008), conducta (Granados, *et al.*, 1996), biología molecular (Martínez-Merlos, 1997; Macías, *et al.*, 2004; Pérez-Solis, *et al.*, 2010), ritmos circadianos (Fuentes-Granados, *et al.*, 2009) y sueño (Ayala-Guerrero, *et al.*, 1998), ya que desde los primeros años de su estudio en cautiverio ha mostrado cualidades como su extraordinaria docilidad, su facilidad de adaptación a las condiciones ordinarias de laboratorio, así como una fertilidad y longevidad apreciablemente más prolongada en comparación con otros roedores comúnmente empleados en el laboratorio (Granados y Hoth, 1989), llegando a vivir hasta 5 años (Ayala-Guerrero, *et al.*, 1998).

### **2.5.1 El ratón de los volcanes y el estudio de la obesidad.**

Desde hace algunos años, el ratón de los volcanes se ha propuesto como modelo para el estudio de la obesidad y la esteatosis hepática (EH) en el desarrollo del SM, ya que se ha observado que alrededor del 9.9 % de los ratones adultos en cautiverio son susceptibles al desarrollo de lipomatosis (alteración caracterizada por un abundante depósito regional de tejido

adiposo subcutáneo) y exhiben un fenotipo obeso (Carmona Castro, 1994), como se muestra en la Figura 7. Asimismo, los individuos obesos presentan EH microvacuolar periportal y concentraciones más elevadas de triglicéridos respecto a sus descendientes no obesos nacidos en cautiverio y animales silvestres (Diego Magaña, 1999), así como intolerancia a la glucosa e hiperinsulinemia (durante la hiperglucemia postprandial); además, el 60% de los ratones silvestres en cautiverio desarrollan lipomas en un período de 4 a 6 meses después de su captura (Carmona Castro, 2006).



Figura 7. Ratón de los volcanes delgado (derecha) y obeso (izquierda). Del lado izquierdo se muestra una regla con una escala de 7.5 cm.

### **2.5.2 El ratón de los volcanes y el ciclo de sueño-vigilia.**

El único estudio electroencefalográfico del sueño que se ha realizado con el ratón de los volcanes es el del grupo de Ayala-Guerrero en 1998, quienes utilizando machos adultos con un peso corporal de 75 a 85 g describieron cuatro estados de vigilancia (vigilia activa, vigilia quieta, SOL y SMOR), los cuales mostraron los patrones electrofisiológicos típicos hallados en otros mamíferos. Los períodos de sueño en el ratón se encontraron distribuidos a lo largo del ciclo nictemeral, por lo cual es un animal polifásico, encontrando que pasa el  $64.5 \pm 9$  % del tiempo total de registro (24 h) en SOL (promedio  $\pm$  desviación estándar) y el  $7.6 \pm 1.3$  % del tiempo en SMOR, bajo condiciones de luz constante.

### **3. JUSTIFICACIÓN.**

La incidencia de obesidad en el mundo ha aumentado drásticamente en las últimas décadas, por lo cual es importante abordar esta problemática desde perspectivas distintas, y aunque en la actualidad se han llevado a cabo múltiples esfuerzos por dilucidar las causas relacionadas con esta enfermedad, y que las terapias y tratamientos actuales ayudan a reducir algunas de

las alteraciones vinculadas con la misma, el uso de una variedad más amplia de modelos biológicos que permitan un estudio comparativo de este problema de salud podrían enriquecer la comprensión de los mecanismos fisiológicos que lo originan. El ratón de los volcanes muestra una tendencia a desarrollar obesidad espontánea en cautiverio, por lo cual podría ser un modelo útil para estudiar la relación que existe entre la obesidad y las funciones fisiológicas reguladas por el reloj, incluyendo los trastornos en el ciclo sueño-vigilia.

#### **4. HIPÓTESIS.**

La obesidad induce trastornos en el sistema circadiano de regulación metabólica y en el ciclo de sueño-vigilia, y a su vez estos trastornos pueden generar obesidad, por lo cual los ritmos diarios de la concentración plasmática de leptina, insulina, triglicéridos, cortisol y glucosa serán distintos en fase y en amplitud entre los ratones de los volcanes delgados y obesos, en estos últimos esperándose encontrar concentraciones más elevadas en la mayoría de los parámetros plasmáticos.

En cuanto a la arquitectura del sueño, en un ciclo de 24 h los animales obesos podrían mostrar un porcentaje menor de vigilia, un aumento en el SOL y posiblemente una disminución en el SMOR respecto a los ratones delgados.

#### **5. OBJETIVOS.**

##### **5.1. Objetivo general.**

Evaluar los ritmos diarios de varios parámetros plasmáticos relacionados con el balance energético, así como las características electrocorticográficas generales que definen el sueño, entre animales adultos, obesos y delgados, del ratón de los volcanes *Neotomodon alstoni*.

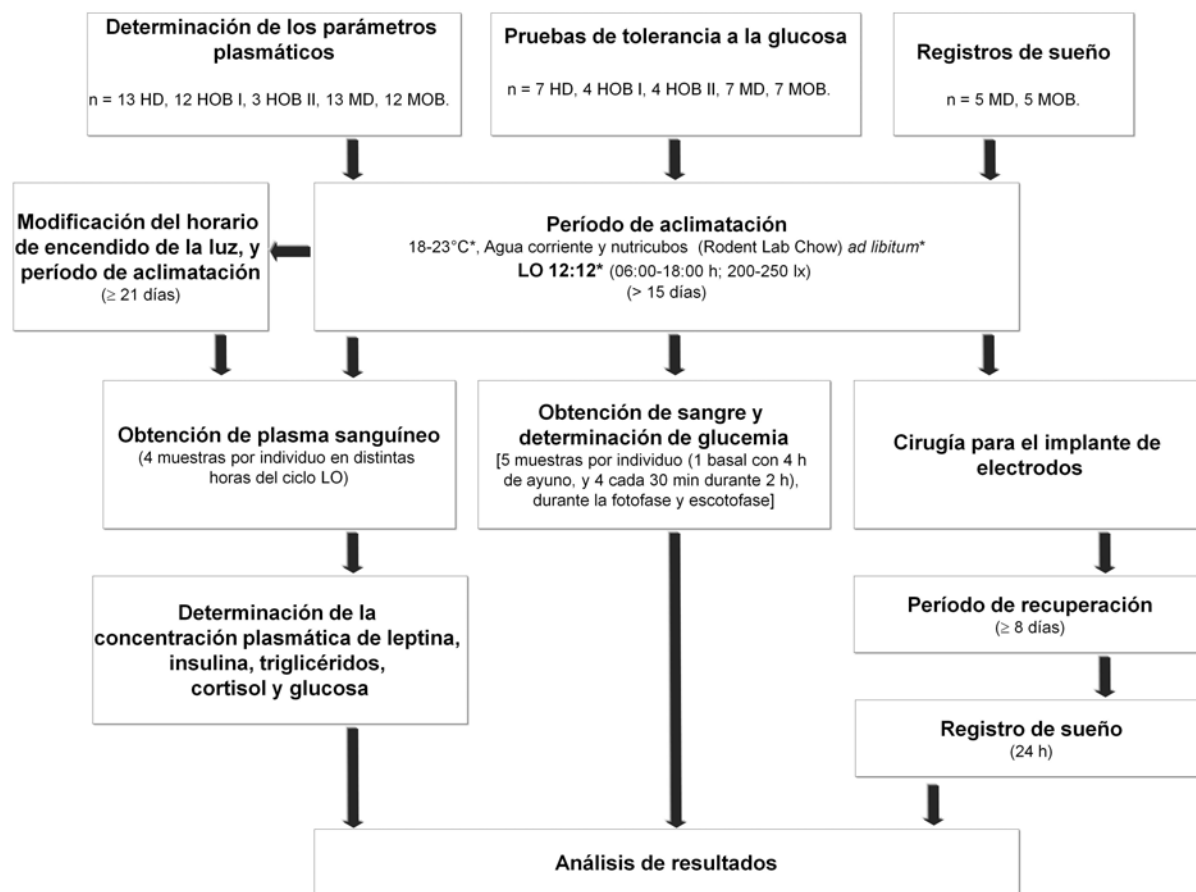
##### **5.2. Objetivos específicos.**

- a) Establecer e interpretar las diferencias en la amplitud y la acrofase de los perfiles diarios de leptina, insulina, triglicéridos, cortisol y glucosa entre ratones adultos, obesos y delgados, de ambos géneros.
- b) Evaluar si existen diferencias en la arquitectura del ciclo sueño-vigilia mediante el análisis de los porcentajes de los tres estados de vigilancia: vigilia, sueño de ondas lentas (SOL) y sueño con movimientos oculares rápidos (SMOR), obtenidos mediante electrocorticograma, entre machos adultos, obesos y delgados.
- c) Discutir la posibilidad de proponer al ratón de los volcanes como un modelo útil para el estudio de la obesidad y las funciones fisiológicas reguladas de manera circadiana.



## 6. METODOLOGÍA.

En el siguiente esquema se describe de manera general la metodología que se llevó a cabo durante el desarrollo de este trabajo experimental, la cual se detalla en los siguientes párrafos.



\* Condiciones mantenidas durante todo el tiempo que duró el experimento.

Abreviaturas: HD: Hembras delgadas; HOB I: Hembras obesas; HOB II: Hembras muy obesas; MD: Machos delgados; MOB: Machos obesos.

### 6.1 Obtención, cuidado y mantenimiento de los animales.

En este trabajo se emplearon cincuenta y tres ratones adultos de la especie *Neotomodon alstoni*, veintiocho hembras y veinticuatro machos, de los cuales el 40% de los individuos nacieron en el Bioterio de la Facultad de Ciencias (BFC) y el 60% de ellos se capturaron en el campo.

Los animales silvestres (SILV), únicamente adultos, fueron colectados en una zona de la Sierra del Volcán Ajusco ubicada entre los kilómetros 48 y 51 de la Carretera Federal México-Cuernavaca, cerca del poblado de Parres localizado 20 Km al sur de la Ciudad de México con un intervalo altitudinal de 2440 a 4550 msnm. Los ratones fueron capturados mediante trampas

tipo *Sherman* para roedores pequeños (27 x 10 x 7 cm) empleando como cebo hojuelas de avena con crema de cacahuete, posteriormente fueron trasladados al BFC donde se desparasitaron, sexaron y mantuvieron en condiciones de temperatura ambiental de 18 a 23°C y en un ciclo de luz-oscuridad 12:12 (luz: 06:00-18:00 h; 200-250 lx), alimentándose con nutricubos Rodent Laboratory Chow 5001 (Purina Inc) y agua corriente *ad libitum*. Después de un período cercano a seis meses, los ratones que se emplearían durante el trabajo experimental se colocaron en cajas individuales, manteniéndose las condiciones ambientales y de alimentación anteriormente descritas. Este período en el cual los animales SILV permanecieron en cautiverio permitió su aclimatación en condiciones semejantes a las de los ratones nacidos en el BFC (F1, descendientes de animales silvestres), con un intervalo de edad de 13 a 15 meses.

Los cincuenta y tres ratones empleados durante este trabajo se dividieron conforme al género y el peso corporal, de tal manera que se obtuvieron los siguientes grupos experimentales: Hembras delgadas de  $46 \pm 4$  g (HD), machos delgados de  $47 \pm 4$  g (MD), hembras obesas de  $71 \pm 7$  g (HOB I), hembras muy obesas de  $95 \pm 12$  g (HOB II), y machos obesos de  $71 \pm 8$  g (MOB). Los animales de 60 g en adelante fueron considerados como obesos de acuerdo con datos preliminares basados en el índice de Lee (Carmona en 2006), el cual se establece mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Indice Lee} = \sqrt[3]{\text{Peso corporal}} / \text{Longitud naso anal} \times 10^4$$

donde el peso corporal está dado en gramos y la longitud naso anal en mm

Una vez separados por grupo, todos los animales se mantuvieron en las condiciones de temperatura, fotoperíodo y alimentación señaladas anteriormente; sin embargo, durante el transcurso del experimento se modificó el horario de encendido y apagado de la luz mediante retrasos en el fotoperíodo, con la finalidad de determinar los cinco parámetros plasmáticos durante el ciclo nictemeral. Además, el peso de los animales fue monitoreado semanalmente todo el tiempo que duró el trabajo experimental.

## **6.2 Análisis de los parámetros plasmáticos.**

La determinación de la concentración plasmática de leptina, insulina, triglicéridos, cortisol y glucosa se llevó a cabo mediante la toma de muestras de sangre en cuatro horas distintas del ciclo nictemeral (al inicio del encendido de la luz, al inicio del apagado de la luz, a la mitad del

período de luz y a la mitad del período de oscuridad). Las muestras en cada individuo se obtuvieron con una separación mínima de cuatro días entre ellas, y el período para la sincronización de los animales en respuesta a la modificación del encendido y apagado de la luz fue mínimo de 21 días.

Los animales permanecieron en ayuno durante cuatro horas previas a la toma de muestras, con el fin de descartar el efecto del tiempo de alimentación en los perfiles diarios, posteriormente se anestesiaron con isoflurano (Dorin, Halocarbon Labs, USA) para obtener aproximadamente 840  $\mu$ l de sangre por punción en el seno retroorbital empleando tubos capilares con heparina, los cuales se centrifugaron a 3500 *rpm* durante 5 min para obtener finalmente un volumen de plasma aproximado de 360  $\mu$ l, el cual se extrajo de los capilares empleando una jeringa Hamilton de 100  $\mu$ l. El plasma obtenido de cada toma por individuo se almacenó en tubos eppendorf por separado, con el fin de analizar los parámetros en tiempos distintos y no afectar los resultados arrojados por el deterioro de las muestras debido a la congelación y la descongelación; todas las muestras de plasma se almacenaron a -70°C hasta el momento de su análisis.

La concentración plasmática de glucosa y triglicéridos se determinó empleando un ensayo enzimático-colorimétrico con los kits Spinreact Glucose-LQ y Spinreact Triglycerides-LQ (Spinreact, S.A.U., España) y leyendo la absorbancia a 500 nm mediante el uso de un espectrofotómetro (Termo Spectronic 4001/4, USA).

Por otra parte, las concentraciones de leptina, insulina y cortisol fueron determinadas mediante ensayos de ELISA, utilizando los kits Leptin ELISA, Ultra Sensitive Mouse Insulin ELISA (Cristal Chem Inc) y Cortisol ELISA Kit (Calbiotech Inc.), respectivamente. La absorbancia de los ensayos de leptina e insulina se leyó mediante un lector de microplacas (Spectramax 190, Mol. Devices, USA) en un intervalo a 450 nm, con corrección por absorbancia a 630 nm, mientras que la absorbancia de cortisol se leyó a 450 nm.

### **6.3 Pruebas de tolerancia a la glucosa (PTG).**

Las pruebas de tolerancia a la glucosa se llevaron a cabo después de la obtención de muestras para la determinación de los parámetros plasmáticos, empleando 7 HD de  $44 \pm 2$  g, 7 MD de  $47 \pm 2$  g, 4 HOB I de  $73 \pm 2$  g, 4 HOB II de  $92 \pm 3$  y 7 MOB de  $71 \pm 1$  g, de los cuales se obtuvieron muestras de sangre tanto a la mitad de la fotofase como de la escotofase. Para ello, tras un período de ayuno de 4 horas, los animales fueron anestesiados con isoflurano (dosis/efecto) y mediante la punción del seno retroorbital se obtuvo una muestra de sangre de 35  $\mu$ l en tubos capilares con heparina, para determinar la concentración basal de glucosa (tiempo

cero) mediante el uso de tiras reactivas y un glucómetro (Accutrend GCT, Roche Diagnostics). Posteriormente, se les inyectó una solución de glucosa al 50% (2.5 g/kg, vía intraperitoneal) y a cada individuo se le tomó una muestra de sangre de aproximadamente 35  $\mu$ l cada 30 min durante las siguientes 2 h (30, 60, 90 y 120 min) para obtener las curvas de tolerancia a la glucosa.

#### **6.4 Registros de sueño.**

Para el análisis electrocorticográfico del sueño en el ratón de los volcanes, se emplearon cinco machos adultos delgados de  $47 \pm 2$  g y cinco machos adultos obesos de  $72 \pm 2$  g. Los animales fueron anestesiados empleando una mezcla de Xilacina (10 mg/kg, vía intraperitoneal) y Ketamina (30 mg/kg, vía intramuscular), así como isoflurano inhalado y anestesia local (Lidocaina). Posteriormente se implantaron electrodos bipolares de acero inoxidable en la corteza occipital izquierda (en un cuadrante de 2 mm con respecto a Lambda y a Bregma) para registrar el electrocorticograma (ECG), y dos electrodos flexibles de acero inoxidable en los músculos dorsales del cuello para el registro del electromiograma (EMG). Después de haber sido implantados los electrodos se fijaron al cráneo con acrílico dental y, sólo en caso necesario, se suturó la piel de los animales.

Los ratones implantados estuvieron en recuperación por lo menos 8 días, posteriormente pasaron por un periodo breve de habituación en una cámara sonoamortiguada y faradizada colocados de manera individual en un acuario de vidrio (60 x 47 x 50 cm), donde tenían libertad de movimiento y disponibilidad de agua y alimento *ad libitum*, bajo condiciones de LO 12:12 (luz: 06:00-18:00 h). Los registros de sueño se mantuvieron durante 24 horas continuas, en relación con el encendido de la luz, conectando los electrodos por medio de cables flexibles a dos amplificadores ISODAM8A de WPI. Las señales eléctricas se capturaron en segmentos de 10 minutos (200 muestreos por segundo) mediante una tarjeta de adquisición de datos (MP100, BIOPAC,) y una computadora de escritorio. La señal fue visualizada y capturada mediante el paquete Acqknowledge 3.8.1 de BIOPAC.

#### **6.5 Análisis estadístico de los datos.**

Los datos de los perfiles diarios de leptina, insulina, triglicéridos, cortisol y glucosa, fueron ordenados y graficados mediante el programa Microsoft Excel 2007, obteniendo el promedio, la desviación estándar y el error estándar de las cuatro horas de muestreo en los cinco grupos experimentales. Además, mediante el programa de estadística STATGRAPHICS Centurion XVI v. 16.1.05 se llevaron a cabo diversas pruebas de ANOVA de una vía para comparar las

concentraciones de los cinco parámetros plasmáticos en los cuatro horarios del perfil diario por grupo, así como las concentraciones de los parámetros en los distintos grupos experimentales a la misma hora de muestreo. Todos los resultados se contrastaron utilizando una prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ). Asimismo, los datos fueron tratados con un análisis de Cosinor (mediante el programa COSANA, desarrollado por la Dra. Ana Benedicto Silva, del grupo multidisciplinario de desarrollo de ritmos biológicos (ICB/USP, Brasil) tomando en cuenta un período de 24 h (correspondientes a las 12 h de luz y 12 h de oscuridad) para la evaluación de los parámetros cronobiológicos de acrofase, amplitud y porcentaje de ajuste por Cosinor.

Los datos obtenidos de la prueba de tolerancia a la glucosa fueron graficados mediante el programa Microsoft Excel 2007. En los cinco grupos, se determinó la capacidad de asimilar la glucosa inyectada calculando el área bajo la curva mediante el programa OriginPro v. 7.0.

Los resultados de los registros de sueño se analizaron tomando en cuenta épocas de 10 segundos mediante el programa Acqknowledge 3.8.1 de BIOPAC, identificándose de manera visual los siguientes estados de vigilancia: vigilia, sueño de ondas lentas (SOL), sueño con movimientos oculares rápidos (SMOR). La duración y la frecuencia de estos tres estados se analizaron mediante el programa Estadsue (elaborado por Miguel Ángel Guevara de la Universidad Autónoma de Guadalajara en 1997). Además, mediante el programa de estadística STATGRAPHICS Centurion XVI v. 16.1.05 se llevaron a cabo diversas pruebas de ANOVA, de una y dos vías, para comparar los porcentajes de vigilancia en ambos grupos de ratones, cada 2 h, 12 h y 24 h. Todos los resultados se contrastaron utilizando una prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

## **7. RESULTADOS.**

### **7.1 Análisis de los parámetros plasmáticos.**

Al llevar a cabo el análisis de las concentraciones plasmáticas de los distintos parámetros, se hallaron variaciones diarias en la mayoría de ellos, así como una tendencia en la cual los ratones obesos (especialmente las hembras) presentaron las concentraciones más elevadas de leptina, insulina, triglicéridos y glucosa, pero no de cortisol.

Las concentraciones promedio máximas y mínimas de los cinco parámetros se encontraron en horas diferentes para los perfiles resultantes sin y con el ajuste de Cosinor. En la Tabla 1 se muestran estos valores, con su respectivo error estándar, para los perfiles no ajustados de leptina, insulina, triglicéridos, cortisol y glucosa. Asimismo, de la Figura 9 a la 13 se muestran los valores de acrofase promedio ( $\pm$  EE) de los perfiles individuales ajustados por Cosinor. Los perfiles diarios de leptina, insulina, triglicéridos y glucosa, tuvieron en casi todos los grupos (excepto en las HOB II) su máxima concentración durante la fase luminosa; mientras que en los

perfiles diarios de cortisol la acrofase se encontró durante el inicio de la fase oscura en todos los grupos.

**Tabla No. 1**  
**Concentraciones promedio máximas y mínimas ( $\pm$ EE) para los perfiles diarios de leptina, insulina, triglicéridos, cortisol y glucosa en el ratón de los volcanes.**

		Machos				Hembras			
		↑	ZT	↓	ZT	↑	ZT	↓	ZT
<b>Leptina (ng/ml)</b>	Delgados	0.45 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	06	0.17 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	00	0.44 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	18	0.24 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	00
	Obesos I	1.68 $\pm$ 0.42 <sup>A</sup>	06	0.91 $\pm$ 0.26 <sup>A</sup>	18	2.65 $\pm$ 0.70 <sup>A</sup>	06	1.34 $\pm$ 0.51 <sup>A</sup>	12
<b>Insulina (ng/ml)</b>	Delgados	1.09 $\pm$ 0.28 <sup>★</sup>	06	0.33 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	18	0.85 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	12	0.56 $\pm$ 0.29 <sup>a</sup>	00
	Obesos I	1.60 $\pm$ 0.42	06	0.82 $\pm$ 0.19 <sup>A</sup>	00	2.18 $\pm$ 0.59 <sup>a</sup>	06	0.91 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	00
	Obesos II	—	—	—	—	6.14 $\pm$ 1.67 <sup>A</sup>	18	2.68 $\pm$ 1.05 <sup>A</sup>	00
<b>Triglicéridos (mg/dl)</b>	Delgados	117 $\pm$ 20 <sup>★</sup>	12	34 $\pm$ 5 <sup>a</sup>	00	113 $\pm$ 25	12	36 $\pm$ 6 <sup>★,a</sup>	00
	Obesos I	134 $\pm$ 22	06	73 $\pm$ 20 <sup>A</sup>	00	169 $\pm$ 41	12	60 $\pm$ 11 <sup>★,a</sup>	00
	Obesos II	—	—	—	—	221 $\pm$ 53	18	148 $\pm$ 27 <sup>A</sup>	12
<b>Cortisol (ng/ml)</b>	Delgados	71 $\pm$ 8 <sup>★</sup>	18	22 $\pm$ 1	06	99 $\pm$ 11	18	28 $\pm$ 2 <sup>★</sup>	06
	Obesos I	49 $\pm$ 6 <sup>★</sup>	18	23 $\pm$ 1	06	85 $\pm$ 18	18	24 $\pm$ 1 <sup>★</sup>	06
<b>Glucosa (mg/dl)</b>	Delgados	115 $\pm$ 11 <sup>★</sup>	18	77 $\pm$ 4	00	98 $\pm$ 10	12	72 $\pm$ 6 <sup>★</sup>	00
	Obesos I	111 $\pm$ 11	12	94 $\pm$ 7	06	140 $\pm$ 29	12	82 $\pm$ 6	00
	Obesos II	—	—	—	—	118 $\pm$ 19	18	91 $\pm$ 13	06

Los valores de las concentraciones plasmáticas se expresan como el promedio  $\pm$  el error estándar

↑ = Concentración más elevada; ↓ = Concentración más baja; ZT = tiempo del zeitgeber; ★ = diferencias entre la concentración máxima y mínima en cada parámetro dentro de un mismo grupo ( $p < 0.05$ ); a vs A = diferencias entre las concentraciones máximas y mínimas en el mismo parámetro y mismo género, pero en animales con distinta condición de peso ( $p < 0.05$ ).

Como se muestra en la Tabla 2, la mayoría de los perfiles promedio por grupo se ajustaron al modelo de Cosinor, tanto en los animales delgados como obesos. Además, el porcentaje de ratones cuyos perfiles diarios se ajustaron por Cosinor, fue distinto para cada grupo y parámetros analizados (Figura 8).

Tabla No. 2

Valores obtenidos del ajuste por Cosinor para los perfiles promedio de leptina, insulina, triglicéridos, cortisol y glucosa en el ratón de los volcanes

		Machos			Hembras		
		Amplitud	% de ajuste	Valor de p	Amplitud	% de ajuste	Valor de p
Leptina (ng/ml)	Delgados	0.1	47	0.207	0.1	27	0.462
	Obesos I	0.4	78	0.022*	0.6	67	0.064
Insulina (ng/ml)	Delgados	0.4	99	0*	0.2	97	0*
	Obesos I	0.3	47	0.210	0.8	97	0*
	Obesos II	—	—	—	2.2	99	0*
Triglicéridos (mg/dl)	Delgados	44.2	91	0.003*	43.8	95	0*
	Obesos I	33.4	92	0.002*	64.3	96	0*
	Obesos II	—	—	—	18.5	20	0.569
Cortisol (ng/ml)	Delgados	27.3	99	0*	40.8	100	0*
	Obesos I	15	99	0*	38.5	100	0*
Glucosa (mg/dl)	Delgados	12.8	44	0.236	13.5	82	0.013*
	Obesos I	8.4	84	0.010*	31.2	96	0*
	Obesos II	—	—	—	13.9	98	0*

Los valores mostrados corresponden a las curvas promedio de los perfiles diarios con el ajuste por Cosinor, en los distintos grupos de ratones estudiados. Las estrellas señalan los perfiles que tuvieron un ajuste significativo ( $p < 0.05$ ).

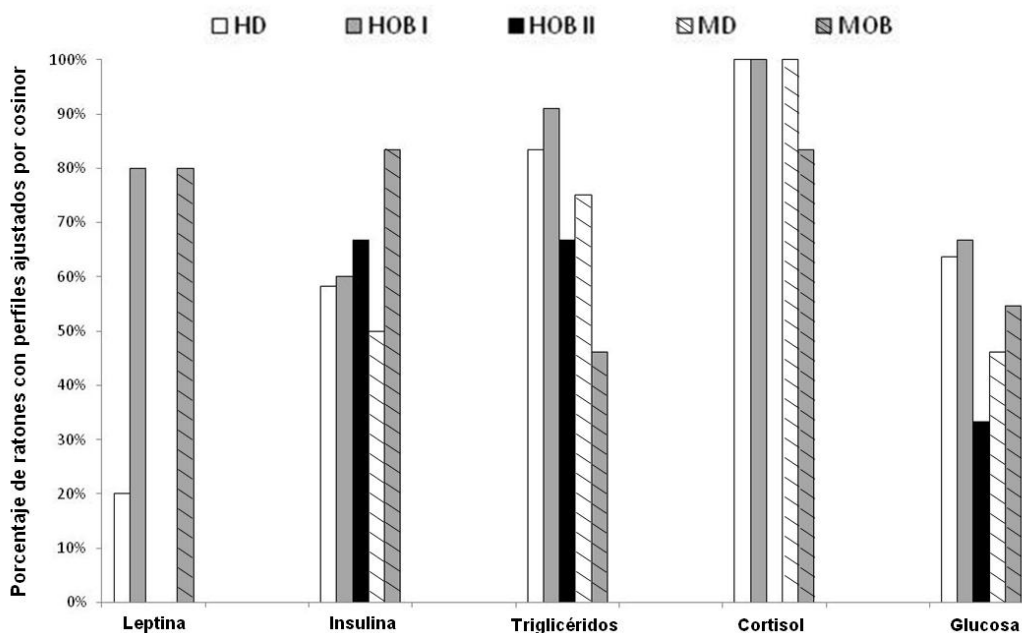


Figura 8. Porcentaje de ratones por grupo que tuvieron perfiles diarios con un ajuste significativo mediante Cosinor ( $p < 0.05$ ). No existen datos para el grupo de las HOB II en los perfiles diarios de leptina y de cortisol.

### 7.1.1 Perfiles diarios en la concentración de leptina.

Las Figuras 9 A y 9 B muestran que los animales obesos de ambos géneros presentaron las concentraciones de leptina más elevadas en todos los horarios en los cuales se obtuvieron las muestras de plasma, esto además en relación con su peso corporal (Figura 9 C). Las HOB I tendieron a presentar niveles de leptina más elevados respecto a los MOB, aunque no se encontraron diferencias entre estos grupos.

El perfil promedio sin ajuste de las HOB I fue distinto al de las HD, pues se encontraron diferencias en tres de los cuatro horarios de muestreo (a las 00, 06 y 18 h), como se muestra en la Figura 9A; asimismo, las concentraciones máximas y mínimas de leptina fueron distintas entre estos grupos, aunque se encontraron en distinta fase, pues en las HD el pico de leptina se presentó al inicio de la fase oscura y en las HOB I al inicio de la fotofase, mientras que la concentración más baja se encontró a la medianoche y al mediodía en las HD y HOB I, respectivamente (Tabla 1). Respecto a los machos, aunque los MOB tuvieron concentraciones de leptina más altas que los MD, entre estos grupos sólo se encontraron diferencias al inicio de la fase luminosa (06 h), correspondiente a la acrofase de los perfiles sin ajuste para ambos grupos (Tabla 1 y Figura 9B). Asimismo, las concentraciones más bajas de leptina fueron diferentes entre estos grupos, aunque se encontraron en fases distintas (a las 00 h y 18 h para los MD y los MOB, respectivamente).

Las comparaciones por género de los perfiles diarios no mostraron diferencias entre las HD y los MD, ni entre las HOB I y los MOB.

Respecto a las acrofases (Figura 9 D), los perfiles promedio sin el ajuste por Cosinor presentaron el pico de leptina al inicio de la fase de luz en los MD ( $0.45 \pm 0.13$  ng/ml) y en ambos grupos de ratones obesos ( $1.68 \pm 0.42$  ng/ml y  $2.65 \pm 0.70$  ng/ml, para los machos y las hembras respectivamente), mientras que en las HD la acrofase se encontró al inicio de la escotofase ( $0.44 \pm 0.18$  ng/ml). Sin embargo, la acrofase correspondiente al promedio de los ajustes individuales de leptina se encontró en la fotofase en los dos grupos de ratones delgados ( $\sim 3$  h antes del inicio de la oscuridad en las hembras y cerca del medio día en los machos) y en los MOB (al inicio de la luz), mientras que en las HOB I el pico se halló  $\sim 1$  h antes del encendido de la luz. Sólo se encontraron diferencias en las acrofases correspondientes al promedio de los ajustes individuales de leptina, entre el grupo de las HD y el de las HOB I (Figura 9D).

El perfil promedio de leptina para el grupo de los MOB fue el único que se ajustó al modelo de Cosinor (Tabla 2); asimismo, el porcentaje de ratones delgados de ambos géneros cuyos perfiles se ajustaron por Cosinor fue menor en relación con el de los animales obesos de



ambos géneros, siendo el 20% y el 80%, respectivamente (Figura 8). Sin embargo, al considerar los valores promedio obtenidos de los perfiles sin ajuste, no se encontraron diferencias entre el valor más alto y más bajo en ninguno de los grupos (Tabla 1).

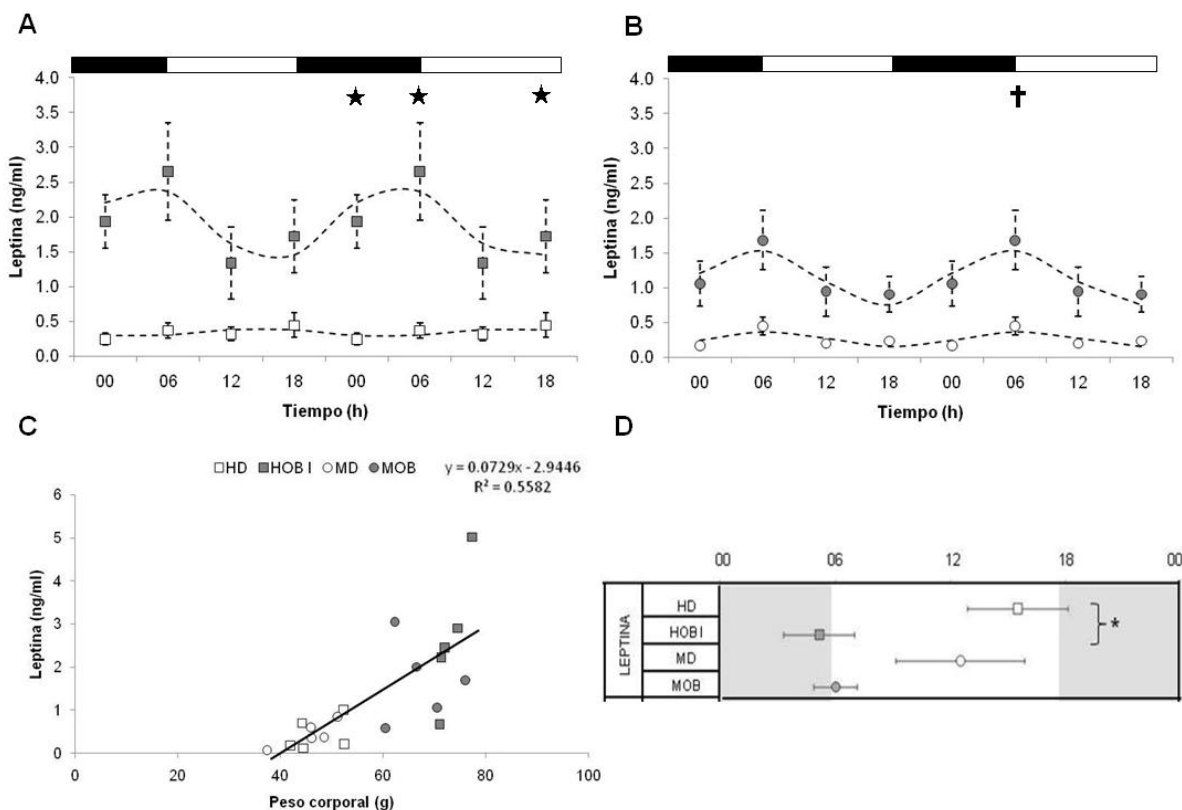


Figura 9. Perfiles diarios de leptina en los animales delgados y obesos, hembras (A) y machos (B). Los símbolos muestran los valores promedio obtenidos de los perfiles sin ajuste ( $\pm$  EE), las líneas punteadas corresponden al perfil promedio del ajuste por Cosinor. La barra superior en cada gráfica indica el ciclo de luz y oscuridad; las estrellas muestran las diferencias halladas entre las HD y las HOB I, y la cruz entre los MD y los MOB ( $p < 0.05$ ). La figura C corresponde a la concentración máxima de leptina en los perfiles diarios sin ajuste, en relación con el peso corporal; nótese como los animales obesos de ambos géneros muestran mayores concentraciones de esta hormona. En la figura D se observan las acrofasas promedio ( $\pm$  EE) de los perfiles individuales ajustados de leptina; en el costado izquierdo se señalan los grupos estudiados, el asterisco indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). HD (cuadrados blancos); HOB I (cuadrados grises); MD (círculos blancos) y MOB (círculos grises).

### 7.1.2 Perfiles diarios en la concentración de insulina.

Las Figuras 10 A y 10 B muestran que los animales obesos de ambos géneros tuvieron las concentraciones de insulina más elevadas, esto además en relación con su peso corporal (Figura 10 C). Las hembras HOB I tendieron a presentar valores más altos que los MOB, aunque no se encontraron diferencias entre estos grupos, mientras que las HOB II tuvieron las concentraciones de insulina más elevadas de todos los grupos.

El perfil promedio sin ajuste de las HOB I no fue significativamente distinto respecto al de las HD, mientras que el perfil de las HOB II presentó diferencias en las cuatro horas muestreadas en relación con las HD, y en tres horas respecto a las HOB I (00 h, 12 h y 18 h), como se

muestra en la Figura 10 A. Asimismo, se hallaron diferencias en las concentraciones máximas y mínimas de las HOB II, respecto a los otros dos grupos de hembras; las concentraciones máximas se encontraron en horas distintas entre los tres grupos (al mediodía en las HD, al inicio de la fotofase en las HOB I, y al inicio de la escotofase en las HOB II), mientras que las concentraciones mínimas se presentaron a la mitad de la fase oscura, 00 h, en los tres grupos de hembras (Tabla 1).

En lo que respecta a los machos, al comparar el perfil promedio sin ajuste de los MD y los MOB no se encontraron diferencias en ninguna hora de muestreo (figura 10 B). Las concentraciones más altas en ambos grupos se presentaron al inicio de la fase luminosa (06 h), aunque no hubo diferencias entre ellos, mientras que las concentraciones más bajas se encontraron a las 18 h y 00 h para los animales delgados y obesos, respectivamente, siendo diferentes entre los dos grupos (Tabla 1).

Las comparaciones por género de los perfiles diarios sin ajuste no mostraron diferencias entre las HD y los MD, ni entre las HOB I y los MOB, pero sí entre los MOB y las HOB II, ya que fueron distintos en tres de las cuatro horas de muestreo (00 h, 06 h y 18 h), presentándose las concentraciones mayores de insulina en las HOB II.

En cuanto a las acrofases (Figura 10 D), los perfiles promedio sin el ajuste de Cosinor presentaron las concentraciones más elevadas de insulina al inicio de la fase de luz en los MD ( $1.09 \pm 0.28$  ng/ml) y en los MOB y HOB I ( $1.60 \pm 0.42$  ng/ml y  $2.18 \pm 0.59$  ng/ml, respectivamente), mientras que en las HD se encontró al mediodía ( $0.85 \pm 0.22$  ng/ml) y en las HOB II al inicio de la oscuridad ( $6.14 \pm 1.67$  ng/ml). Sin embargo, la acrofase correspondiente al promedio de los ajustes individuales de insulina se encontró en la fotofase en todos los grupos: ~1, 3 y 4 h después del encendido de la luz en los MD, HOB I y MOB, respectivamente, y dos horas después del mediodía en las HD y las HOB II.

Los perfiles promedio de casi todos los grupos se ajustaron al modelo de Cosinor, excepto el de los MOB (Tabla 2); aunque, en este último grupo se encontró el porcentaje más alto de individuos cuyos perfiles se ajustaron por Cosinor, superior al 80% (Figura 8). Sin embargo, al considerar los valores promedio obtenidos de los perfiles sin ajuste, únicamente se encontraron diferencias entre el valor más alto y más bajo en el grupo de los MD (Tabla 1).

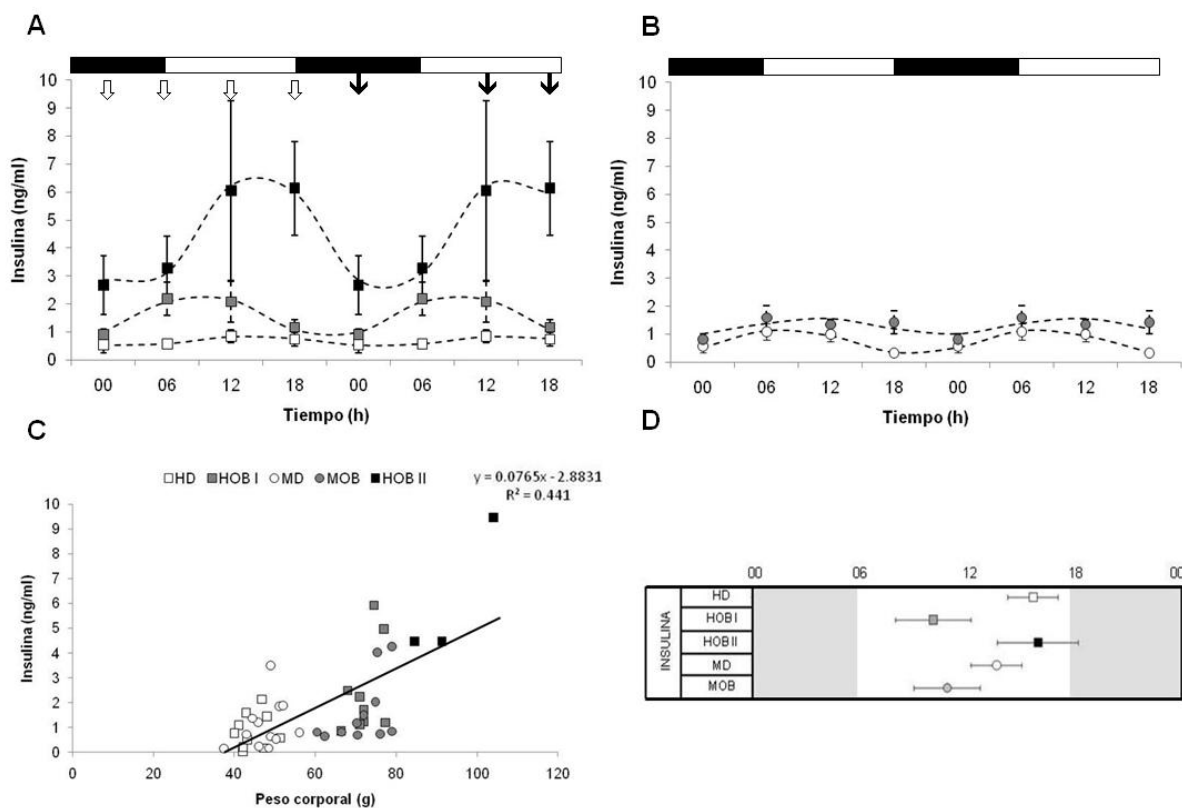


Figura 10. Perfiles diarios de insulina de los animales delgados y obesos, hembras (A) y machos (B). Los símbolos muestran los valores promedio obtenidos de los perfiles sin ajuste ( $\pm$  EE), las líneas punteadas corresponden al perfil promedio del ajuste por Cosinor. La barra superior en cada gráfica indica el ciclo de luz y oscuridad; las flechas blancas muestran las diferencias halladas entre las HD y las HOB II, y las flechas negras entre las HOB I y las HOB II ( $p < 0.05$ ). La figura C corresponde a la concentración máxima de insulina en los perfiles diarios sin ajuste, en relación con el peso corporal; nótese como los animales obesos de ambos géneros muestran mayores concentraciones de esta hormona. En la figura D se observan las acrofasas promedio ( $\pm$  EE) de los perfiles individuales ajustados de insulina; en el costado izquierdo se señalan los grupos estudiados. HD (cuadrados blancos); HOB I (cuadrados grises); HOB II (cuadrados negros); MD (círculos blancos) y MOB (círculos grises).

### 7.1.3 Perfiles diarios en la concentración de triglicéridos.

Las Figuras 11 A y 11 B muestran que los animales obesos de ambos géneros tendieron a presentar los niveles de triglicéridos más elevados en casi todas las horas de muestreo, aunque no se observó una correlación clara entre estos niveles y el peso corporal (Figura 11 C). Las HOB I tuvieron valores más altos que los MOB, aunque no se encontraron diferencias entre estos grupos, mientras que las HOB II tuvieron las concentraciones de triglicéridos más elevadas de todos los grupos.

El perfil promedio sin ajuste de las HOB I no fue significativamente distinto respecto al de las HD, aunque estos dos grupos si lo fueron en relación al de las HOB II, encontrándose diferencias a las 00 h y a las 18 h (Figura 11 A). Asimismo, se hallaron diferencias en las

concentraciones mínimas de las HOB II respecto a las HD y las HOB I, aunque en las HOB II estos niveles se encontraron al mediodía y en los otros dos grupos a la medianoche (Tabla 1).

En lo que concierne a los machos, al comparar el perfil de los MD con el de los MOB, sólo se encontraron diferencias a la medianoche (00 h), fase en la cual se encontraron las concentraciones más bajas para ambos grupos (Figura 11 B y Tabla 1).

Las comparaciones por género de los perfiles diarios no mostraron diferencias entre las HD respecto a los MD, entre las HOB I y los MOB, ni entre las HOB II y los MOB.

En cuanto a las acrofases (Figura 11 D), los perfiles promedio sin el ajuste por Cosinor mostraron el pico de triglicéridos al mediodía en los MD ( $117 \pm 20$  mg/dl), en las HD y en las HOB I ( $113 \pm 25$  mg/dl y  $169 \pm 41$  mg/dl, respectivamente), mientras que en los MOB se encontró al inicio de la fotofase ( $134 \pm 22$  mg/dl) y en las HOB II al inicio de la escotofase ( $221 \pm 53$  mg/dl). Sin embargo, la acrofase correspondiente al promedio de los ajustes individuales de triglicéridos se encontró en la fase de luminosa para todos los grupos:  $\sim 3$  y  $2$  h antes del mediodía, en los MOB y HOB II respectivamente, y  $\sim 1$  h en las HD, HOB I y MD.

Los perfiles promedio de casi todos los grupos se ajustaron al modelo de Cosinor, excepto el de las HOB II (Tabla 2); sin embargo, en la mayoría de los grupos el 60% o más de los individuos presentaron un ajuste significativo según Cosinor (Figura 8), excepto el de los MOB. No obstante, al considerar los valores promedio de los perfiles sin ajuste, únicamente se encontraron diferencias entre las concentraciones más altas (al mediodía) y más bajas (a la medianoche) en ambos grupos de ratones delgados y en las HOB I (Tabla 1).

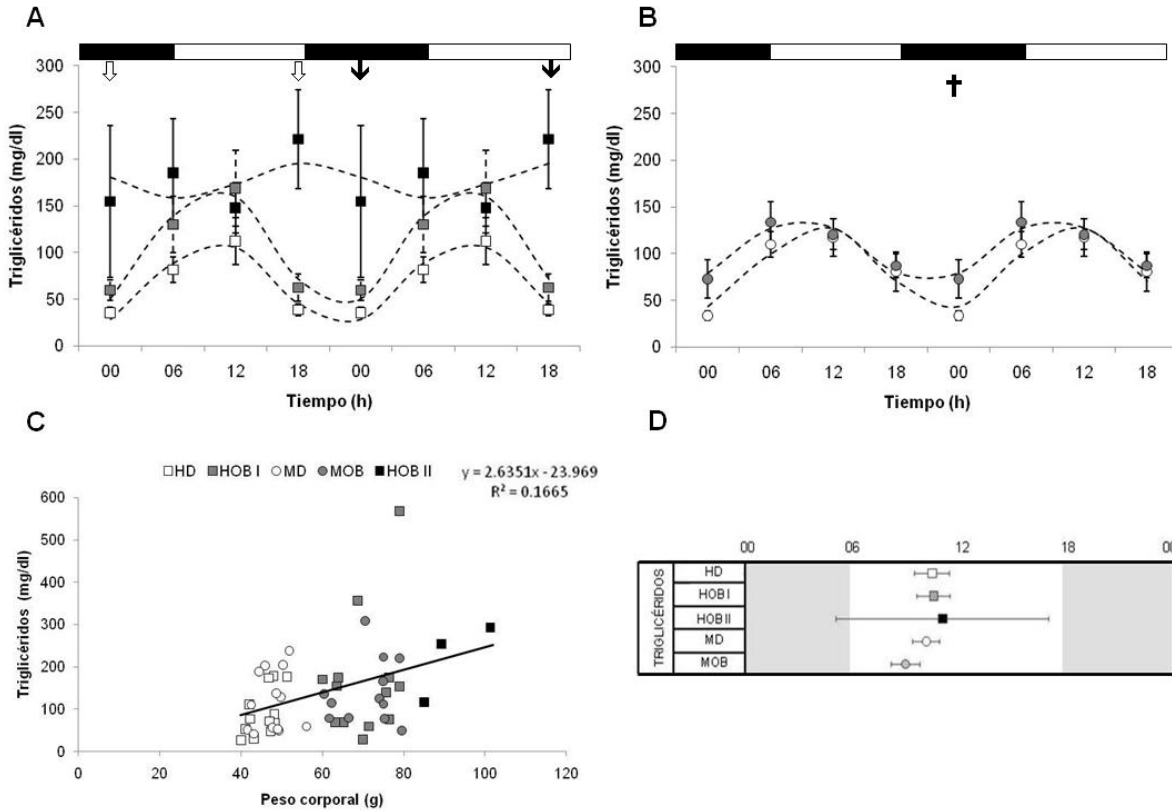


Figura 11. Perfiles diarios de triglicéridos en los animales delgados y obesos, hembras (A) y machos (B). Los símbolos muestran los valores promedio obtenidos de los perfiles sin ajuste ( $\pm$  EE), mientras que las líneas punteadas corresponden al perfil promedio del ajuste por Cosinor. La barra superior en cada gráfica indica el ciclo de luz y oscuridad; las flechas blancas muestran las diferencias halladas entre las HD y las HOB II, las flechas negras entre las HOB I y las HOB II, y la cruz entre los MD y los MOB ( $p < 0.05$ ). La figura C corresponde a la concentración máxima de triglicéridos en los perfiles diarios sin ajuste, en relación con el peso corporal. En la figura D se observan las acrofases promedio ( $\pm$  EE) de los perfiles individuales ajustados de triglicéridos; en el costado izquierdo se señalan los grupos estudiados. HD (cuadrados blancos); HOB I (cuadrados grises); HOB II (cuadrados negros); MD (círculos blancos) y MOB (círculos grises).

#### 7.1.4 Perfiles diarios en la concentración de cortisol.

Las Figuras 12 A y 12 B muestran que los animales delgados de ambos géneros tendieron a presentar los niveles de cortisol más elevados en casi todas las horas muestreadas, aunque no se observa una correlación clara entre estos niveles y el peso corporal (Figura 12 C). Las HD tuvieron concentraciones más altas que los MD, aunque sólo se encontraron diferencias entre estos grupos a las 06 h (inicio de la escotofase). No hubo diferencias en el perfil promedio sin ajuste entre las HD y las HOB I, entre los MD y los MOB, ni entre las HOB I y los MOB.

Respecto a las acrofases (Figura 12 D), los perfiles promedio sin el ajuste por Cosinor presentaron las concentraciones más elevadas de cortisol al inicio de la fase oscura para todos los grupos, HD:  $99 \pm 11$  ng/ml; HOB I:  $85 \pm 18$  ng/ml; MD:  $71 \pm 8$  ng/ml y MOB:  $49 \pm 6$  ng/ml; sin embargo, en todos los grupos, la acrofase correspondiente al promedio de los ajustes

individuales de cortisol se encontró en horas distintas después del apagado de la luz: ~1 h en los MOB, ~1 h con 30 min en ambos grupos de ratones delgados, y ~2 h en las HOB I.

Los perfiles promedio de todos los grupos se ajustaron al modelo de Cosinor, (Tabla 2); asimismo, el 100% de los individuos tuvieron perfiles con un ajuste significativo en la mayoría de los grupos estudiados, excepto en el de los MOB que tuvo un 80% (Figura 8). Además, conforme a los perfiles promedio sin ajuste, se encontraron diferencias entre las concentraciones más altas (al inicio de la oscuridad) y más bajas (al inicio de la fotofase) para todos los grupos (Tabla 1).

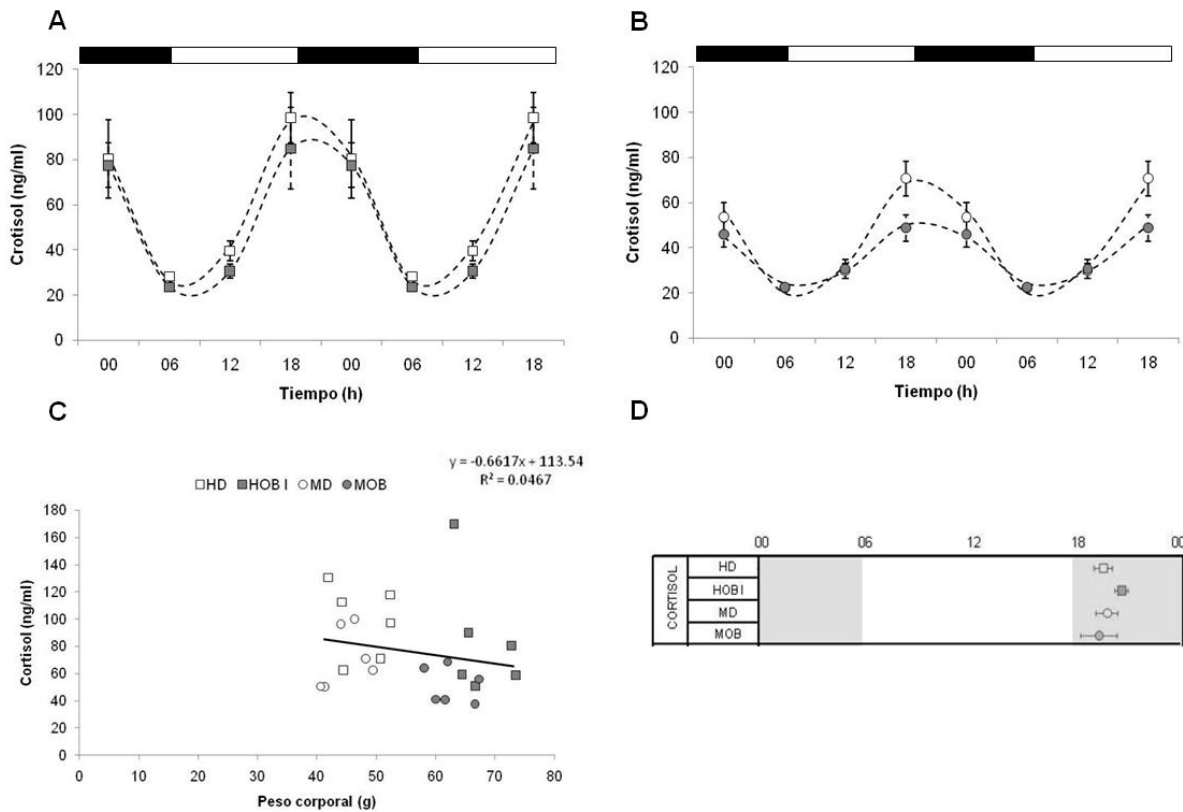


Figura 12. Perfiles diarios de cortisol en los animales delgados y obesos, hembras (A) y machos (B). Los símbolos muestran los valores promedio obtenidos de los perfiles sin ajuste ( $\pm$  EE), mientras que las líneas punteadas corresponden al perfil promedio del ajuste por Cosinor. La barra superior en cada gráfica indica el ciclo de luz y oscuridad. La figura C corresponde a la concentración máxima de cortisol en los perfiles diarios sin ajuste, en relación con el peso corporal, nótese que los animales delgados de ambos géneros tuvieron concentraciones mayores de esta hormona. En la figura D se observan las acrofasas promedio ( $\pm$  EE) de los perfiles individuales ajustados de cortisol; en el costado izquierdo se señalan los grupos estudiados. HD (cuadrados blancos); HOB I (cuadrados grises); MD (círculos blancos) y MOB (círculos grises).

### 7.1.5 Perfiles diarios en la concentración de glucosa.

Las Figuras 13 A, 13 B y 13 C muestran que no existe una diferencia clara entre los perfiles diarios de glucosa en los distintos grupos, ni entre las concentraciones de ésta en relación con el peso corporal. Los animales obesos de ambos géneros presentaron niveles de glucosa similares respecto a los delgados, y aunque en algunas horas de muestreo los ratones obesos tendieron a presentar concentraciones más elevadas, no se encontraron diferencias entre los grupos.

En cuanto a las acrofases (Figura 13 D), los perfiles promedio sin el ajuste por Cosinor muestran el pico de glucosa al mediodía en los MOB ( $111 \pm 11$  mg/dl), en las HD y en las HOB I ( $98 \pm 10$  mg/dl y  $140 \pm 29$  mg/dl, respectivamente), y al inicio de la oscuridad en los MD y en las HOB II ( $115 \pm 11$  mg/dl y  $118 \pm 19$  mg/dl, respectivamente). Sin embargo, la acrofase correspondiente al promedio de los ajustes individuales de glucosa se encontró en horas distintas, pero después del mediodía en todos los grupos: ~15 min en las HOB II, ~1 h con 30 min en los MD y los MOB, y ~2 horas con 30 min en las HOB I.

Las comparaciones por género de los perfiles diarios no mostraron diferencias entre las HD respecto a los MD, ni entre las HOB I y los MOB.

Los perfiles promedio de casi todos los grupos se ajustaron al modelo de Cosinor, excepto el de los MD (Tabla 2), sin embargo en este grupo el porcentaje de individuos con perfiles ajustados fue superior (46%) respecto al de las HOB II (33%), mientras que en los otros tres grupos más del 55% de los individuos tuvieron perfiles con ajuste significativo según Cosinor (Figura 8). No obstante, al considerar los valores promedio obtenidos de los perfiles sin ajuste, únicamente se encontraron diferencias entre el valor más alto y más bajo en ambos grupos de ratones delgados (Tabla 1).

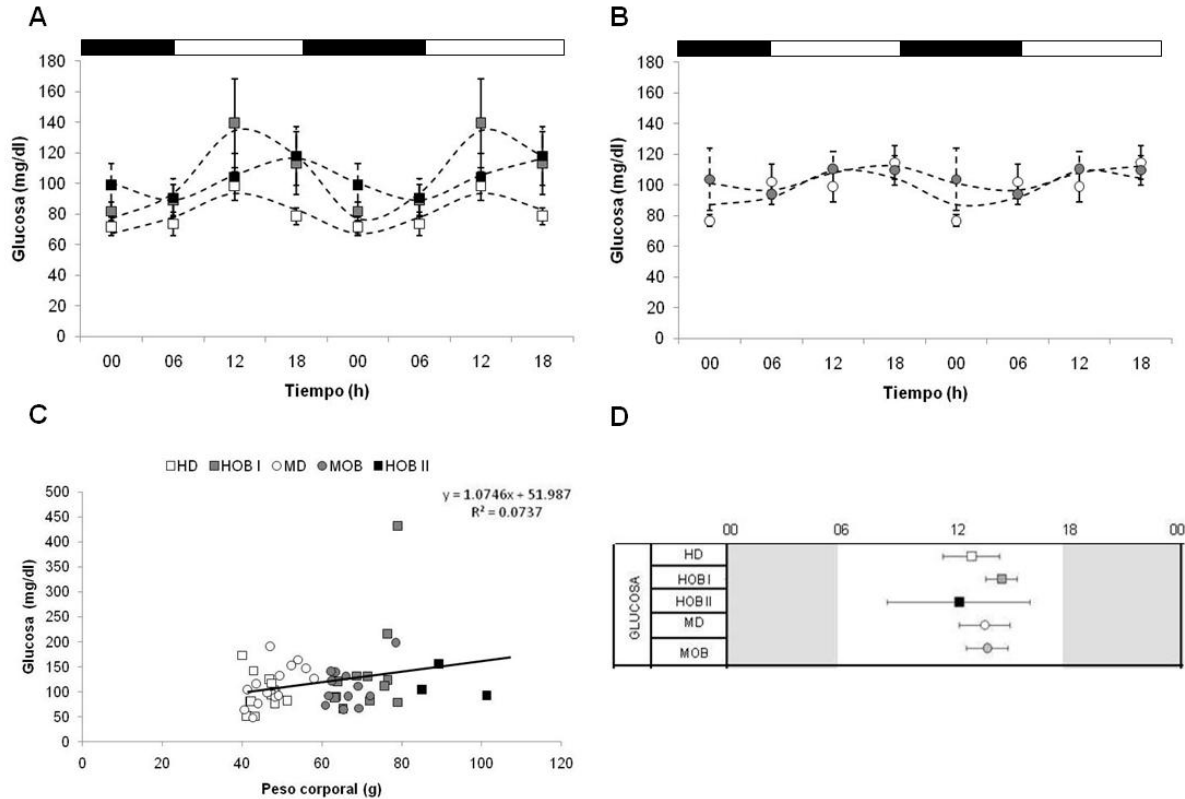


Figura 13. Perfiles diarios de glucosa en los animales delgados y obesos, hembras (A) y machos (B). Los símbolos muestran los valores promedio obtenidos de los perfiles sin ajuste ( $\pm$  EE), las líneas punteadas corresponden al perfil promedio del ajuste de Cosinor. La barra superior en cada gráfica indica el ciclo de luz y oscuridad. La figura C corresponde a la concentración máxima de glucosa en los perfiles diarios sin ajuste, en relación con el peso corporal. En la figura D se observan las acrofases promedio ( $\pm$  EE) de los perfiles individuales ajustados de glucosa; en el costado izquierdo se señalan los grupos estudiados. HD (cuadrados blancos); HOB I (cuadrados grises); HOB II (cuadrados negros); MD (círculos blancos) y MOB (círculos grises).

## 7.2 Pruebas de tolerancia a la glucosa (PTG).

### 7.2.1 PTG en fases opuestas del ciclo de luz-oscuridad.

La Figura 14 muestra las curvas resultantes de las PTG en los grupos estudiados, al mediodía y a la medianoche.

Las Figuras 14 A y 14 B muestran que, después de la inyección de glucosa, la glucemia en los ratones delgados de ambos géneros aumentó más en la fase de oscuridad respecto a la fase de luz, presentándose diferencias sólo en las HD a los 30 min, posteriormente la glucemia disminuyó paulatinamente durante la siguiente hora y media hasta alcanzar casi los niveles basales. La misma prueba realizada al mediodía mostró un comportamiento similar al observado a la medianoche, sin embargo la glucosa en sangre no aumentó tanto tras la inyección de glucosa, disminuyó a los 60 min y se mantuvo hasta finalizar la prueba.

Los valores promedio de las áreas bajo la curva en unidades relativas (UR) fueron de  $4410 \pm 606$  UR y  $7410 \pm 868$  UR en las HD, y de  $9032 \pm 2616$  UR y  $8106 \pm 2480$  UR en los MD, al



mediodía y a la medianoche, respectivamente en los dos grupos. Así, el área bajo la curva a la medianoche fue mayor que al mediodía en las hembras, y ocurrió de manera inversa en los machos; sin embargo, estas diferencias fueron significativas sólo en las hembras (Figura 16).

En las HOB I, no hubo diferencias entre horarios (Figura 14 C), sin embargo puede observarse una tendencia en la cual, después de la inyección de glucosa, la glucemia fue mayor a la medianoche, y al finalizar la prueba ésta no regresó a sus niveles basales; al mediodía, posterior a la inyección, la glucemia permaneció elevada todo el tiempo que duró la prueba. No hubo diferencias entre los valores promedio del área bajo la curva en las HOB I en los dos horarios ( $10270 \pm 2354$  y  $10849 \pm 1320$  UR, en la mitad de la fotofase y de la escotofase, respectivamente).

En lo que concierne al grupo de las HOB II y de los MOB (Figuras 14 D y 14 E), la glucemia fue mayor en la prueba realizada al mediodía, aunque sólo se encontraron diferencias significativas en la glucemia basal en las HOB II, y a los 60 min después de la administración de glucosa en los MOB. Al finalizar la prueba, los ratones no lograron alcanzar su glucemia basal en ninguna de las fases. Los valores promedio del área bajo la curva, fueron mayores al mediodía en comparación con la medianoche, aunque no se encontraron diferencias entre ellos (HOB II:  $22819 \pm 5463$  UR y  $13433 \pm 2108$  UR; MOB:  $17443 \pm 4738$  UR y  $7303 \pm 949$  UR, a la mitad del día y de la noche, respectivamente).

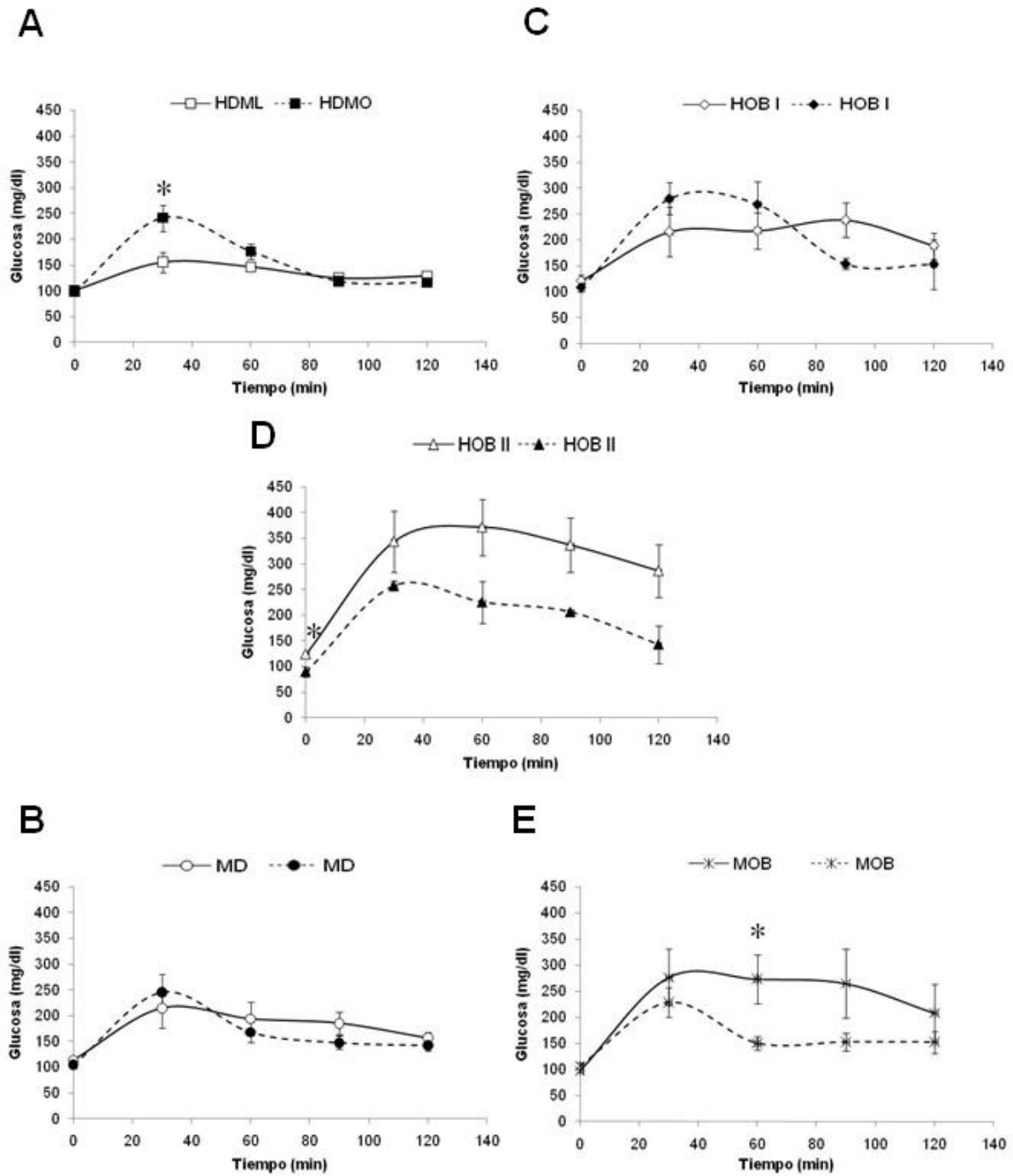


Figura 14. Curvas de las PTG en los ratones de los volcanes delgados y obesos de ambos géneros, durante el mediodía y la medianoche. Los símbolos muestran los valores promedio por grupo ( $\pm$ EE); las curvas con las líneas punteadas y símbolos negros corresponden a las pruebas realizadas en la fase de oscuridad, mientras que las curvas con las líneas continuas y los símbolos blancos corresponden a la fase de luz. A: HD (cuadrados); B: MD (círculos); C: HOB I (rombos); D: HOB II (triángulos); E: MOB (cruces). El asterisco señala las diferencias significativas entre las dos fases en un mismo grupo ( $p < 0.05$ ).

### **7.2.2 PTG en la misma fase del ciclo de luz-oscuridad.**

La Figura 15 muestra las curvas resultantes de las pruebas de tolerancia a la glucosa en los ratones delgados y obesos, tanto hembras (A y B) como machos (C y D), en la misma fase del ciclo luz-oscuridad, al mediodía (A y C) o a la medianoche (B y D).

Como muestra la Figura 15 A, no se encontraron diferencias entre las concentraciones basales de glucosa en los tres grupos de hembras estudiados al mediodía (como también puede observarse en los perfiles diarios de glucosa, Figura 13), sin embargo, después de la inyección de glucosa el grupo de las HOB II tuvo las concentraciones de glucosa más elevadas, seguido por el grupo de las HOB I y finalmente por el de las HD, encontrándose diferencias desde los 30 hasta los 120 min entre las HD y las HOB II, y a los 60 min entre las HOB I y las HOB II. Además, aunque ninguno de los tres grupos logró alcanzar el valor basal de glucemia al finalizar el tiempo de la prueba, las HOB I y las HOB II todavía mantuvieron concentraciones de glucosa notoriamente elevadas.

En las hembras, las curvas de las PTG a la medianoche (Figura 15 B) muestran que, después de la inyección de glucosa, las HOB I y las HOB II tendieron a presentar las concentraciones de glucosa más elevadas respecto a las HD; sin embargo, sólo se encontraron diferencias a los 60 min entre las HOB II en relación con los otros dos grupos, ya que estas presentaron los niveles de glucosa más altos en este punto de la curva. Asimismo, al igual que en las curvas del mediodía, los tres grupos de hembras disminuyeron sus niveles de glucosa hacia el final de la prueba, aunque no recuperaron sus concentraciones basales.

En los machos, las curvas de las PTG al mediodía (Figura 15 C) muestran un comportamiento similar al de las hembras, ya que a partir de los 30 min y hasta el final de las pruebas los MOB tendieron a presentar los niveles más altos de glucosa respecto a los MD, sin embargo, a diferencia de las hembras, no se encontraron diferencias en ningún punto de la curva. Además, aunque ninguno de los dos grupos logró alcanzar su glucemia basal al finalizar la prueba, los MOB todavía mantuvieron concentraciones de glucosa notoriamente elevadas.

Las curvas de las PTG a la medianoche no muestran diferencias claras entre los MD y los MOB, pues en ambos grupos se observa una disminución gradual de las concentraciones de glucosa desde los 60 min hasta finalizar la prueba.

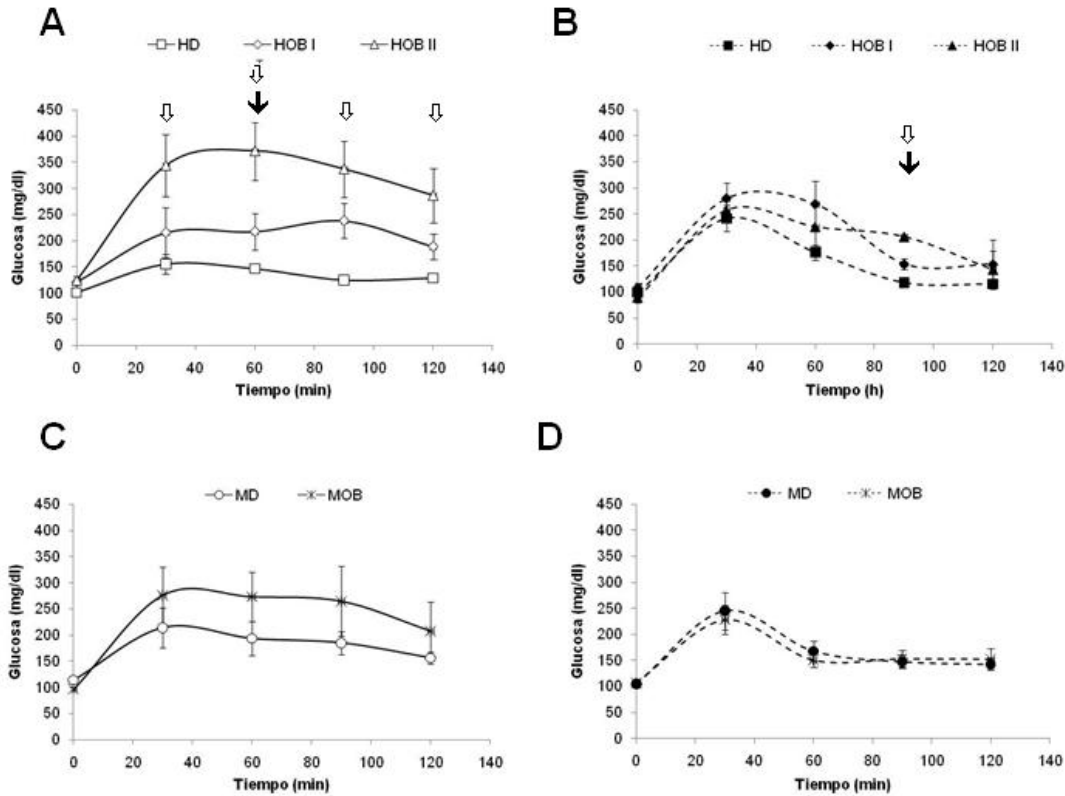


Figura 15. Curvas de las PTG en ratones de los volcanes delgados y obesos, hembras (A y C) y machos (B y D), durante el mediodía (curvas superiores) y la medianoche (curvas inferiores). Los símbolos muestran los valores promedio por grupo con su respectivo error estándar. La curva con la línea punteada y símbolos negros corresponde a las pruebas realizadas en la fase de oscuridad, mientras que la curva con la línea continua y los símbolos blancos corresponde a la fase de luz. A: HD (cuadrados); B: HOB I (rombos); C: HOB II (triángulos); D: MD (círculos); E: MOB (cruces). Las flechas blancas muestran las diferencias halladas entre las HD y las HOB II, y las flechas negras entre HOB I y HOB II ( $p < 0.05$ ). Los círculos señalan las diferencias significativas entre las HD y las HOB II y los rombos las diferencias entre las HOB I y las HOB II ( $p < 0.05$ ).

En la Figura 16, se muestran los valores promedio ( $\pm$ EE) de las áreas bajo la curva de las PTG en las hembras, observándose que al mediodía el área fue mayor en las HOB II ( $22819 \pm 5463$  UR), seguido por el de las HOB I ( $10270 \pm 2354$  UR) y finalmente por el de las HD ( $4410 \pm 606$  UR). A la medianoche se observó algo similar, encontrándose los siguientes valores para los tres grupos de hembras:  $13433 \pm 2108$  UR en las HOB II,  $10849 \pm 1320$  UR en las HOB I, y  $7410 \pm 868$  UR en las HD. En ambas fases se hallaron diferencias entre las HOB II y las HD.

Los valores promedio del área bajo la curva de las PTG entre los MD y los MOB no fueron distintos al mediodía ni a la medianoche, siendo de  $9032 \pm 2616$  UR en los MD y  $17443 \pm 4738$  UR en los MOB durante la fotofase, y  $8106 \pm 2480$  UR en los MD y  $7303 \pm 949$  UR en los MOB durante la escotofase.

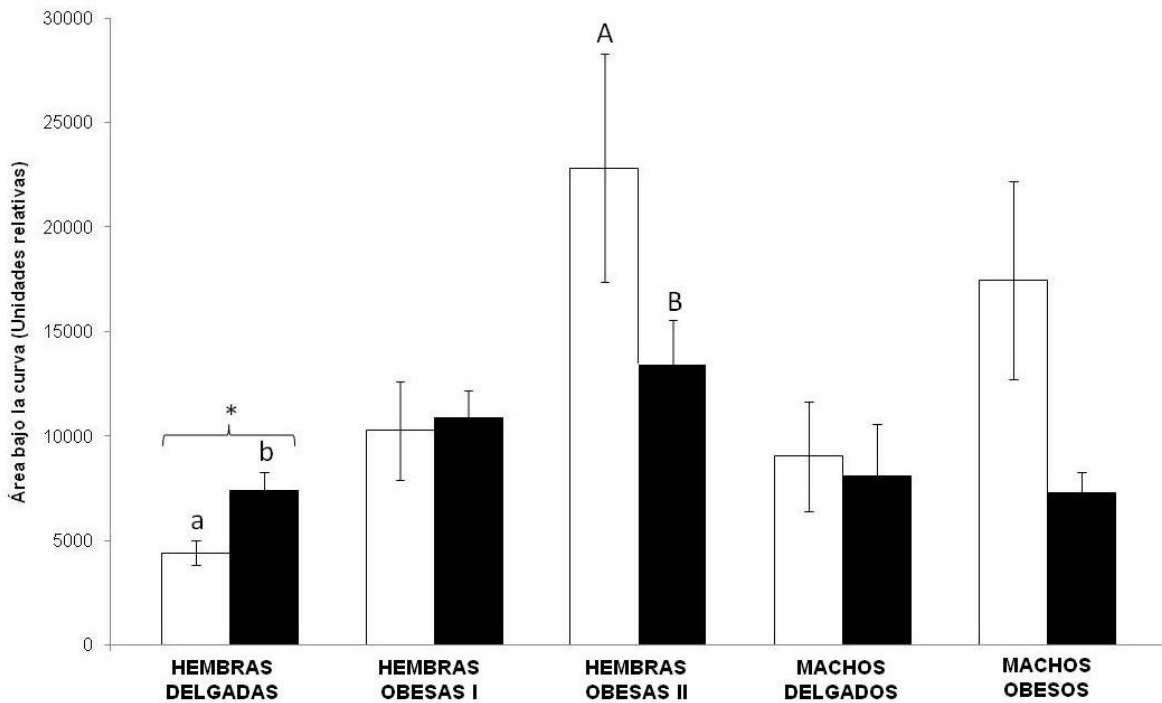


Figura 16. Valores promedio de las áreas bajo la curva por grupo, con su respectivo error estándar. Las barras blancas corresponden a las PTG al mediodía y las barras negras a las PTG a la medianoche. Los asteriscos señalan las diferencias significativas entre fases distintas en el mismo grupo, mientras que las letras indican las diferencias entre dos grupos, del mismo género y peso distinto, en la misma fase ( $p < 0.05$ ).

### 7.3 Registros de sueño.

Los registros de sueño se llevaron a cabo únicamente en machos adultos del ratón de los volcanes, debido a que en roedores hembras al parecer incrementa la variabilidad de los estados de vigilia en función del ciclo estral (Fang y Fishbein, 1996). En la Figura 17 se muestran los trazos electroencefalográficos típicos de los tres estados de vigilia que fueron considerados en este trabajo experimental: vigilia, sueño de ondas lentas (SOL) y sueño con movimientos oculares rápidos (SMOR). El ratón de los volcanes es un animal polifásico, ya que sus períodos de sueño se encontraron distribuidos a lo largo del ciclo nictemeral.

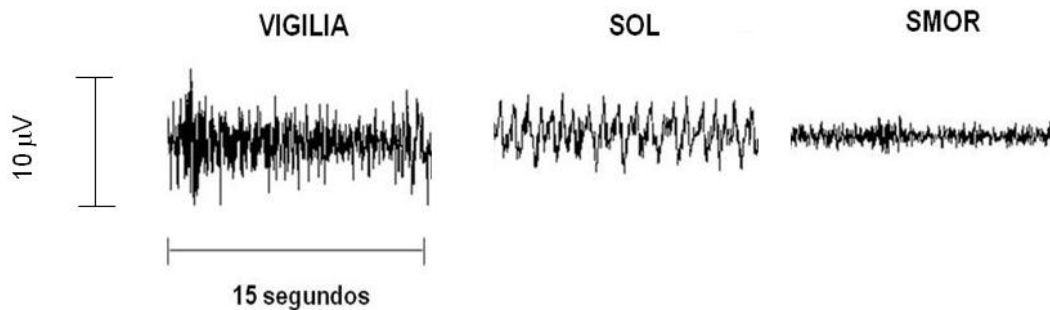


Figura 17. Trazos electroencefalográficos típicos de los tres estados de vigilia en el macho adulto del ratón de los volcanes. SOL: Sueño de ondas lentas, SMOR: Sueño con movimientos oculares rápidos.

### 7.3.1 Porcentaje total de los estados de vigilancia en 24 h.

Como se observa en la Figura 18, durante las 24 h en las cuales se llevaron a cabo los registros de sueño, bajo un ciclo de luz-oscuridad 12:12, los MD tuvieron un porcentaje promedio de vigilia significativamente mayor respecto a los MOB, mientras que estos últimos tuvieron un porcentaje mayor de SOL ( $72 \pm 4.7\%$  y  $25 \pm 4.6\%$ ;  $54 \pm 7.1\%$  y  $45 \pm 6.1\%$ , de vigilia y SOL en los animales delgados y obesos, respectivamente). En el porcentaje de SMOR no se encontraron diferencias entre ambos grupos ( $3 \pm 1.1\%$  y  $2 \pm 0.5\%$  en los MD y los MOB, respectivamente).

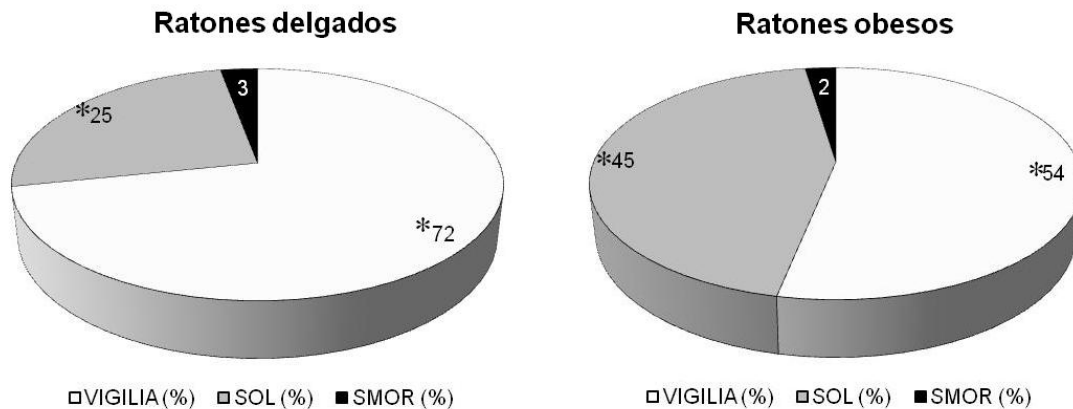


Figura 18. Valores promedio de los porcentajes de los tres estados de vigilancia, en ratones de los volcanes delgados y obesos, durante un período de registro de 24 h. El asterisco señala las diferencias significativas entre ambos grupos ( $p < 0.05$ ).

### 7.3.2 Porcentaje total de los estados de vigilancia en el ciclo de luz-oscuridad (LO 12:12).

Al tomar en cuenta el ciclo de luz-oscuridad, se observó una distribución similar de los tres estados de vigilancia durante la fotofase y la escotofase (Figura 19). Asimismo, aunque no se encontraron diferencias entre los MD y los MOB, los MD tendieron a presentar un porcentaje mayor de vigilia en ambas fases del fotoperíodo ( $74 \pm 5.4\%$  y  $70 \pm 6.3\%$ ;  $50 \pm 8.6\%$  y  $54 \pm 8.1\%$ , en los MD y los MOB durante la fotofase y la escotofase, respectivamente), mientras que los MOB tuvieron un porcentaje mayor de SOL ( $23 \pm 4.7\%$  y  $28 \pm 6.2\%$ ;  $47 \pm 7.8\%$  y  $43 \pm 7.4\%$ , MD y MOB durante la fase de luz y oscuridad, respectivamente). El porcentaje de SMOR fue similar entre ambos grupos y fases ( $3 \pm 0.6\%$  y  $3 \pm 0.9\%$ ;  $2 \pm 1.3\%$  y  $3 \pm 1.3\%$ , MD y MOB durante la fotofase y la escotofase, respectivamente). Asimismo, cabe mencionar que los animales presentaron una gran variabilidad interindividual, como se puede observar en los valores del error estándar mostrados en la Tabla 3, en la cual se muestra el promedio del tiempo en minutos ( $\pm EE$ ) que los ratones de ambos grupos permanecieron en los tres estados de vigilancia.

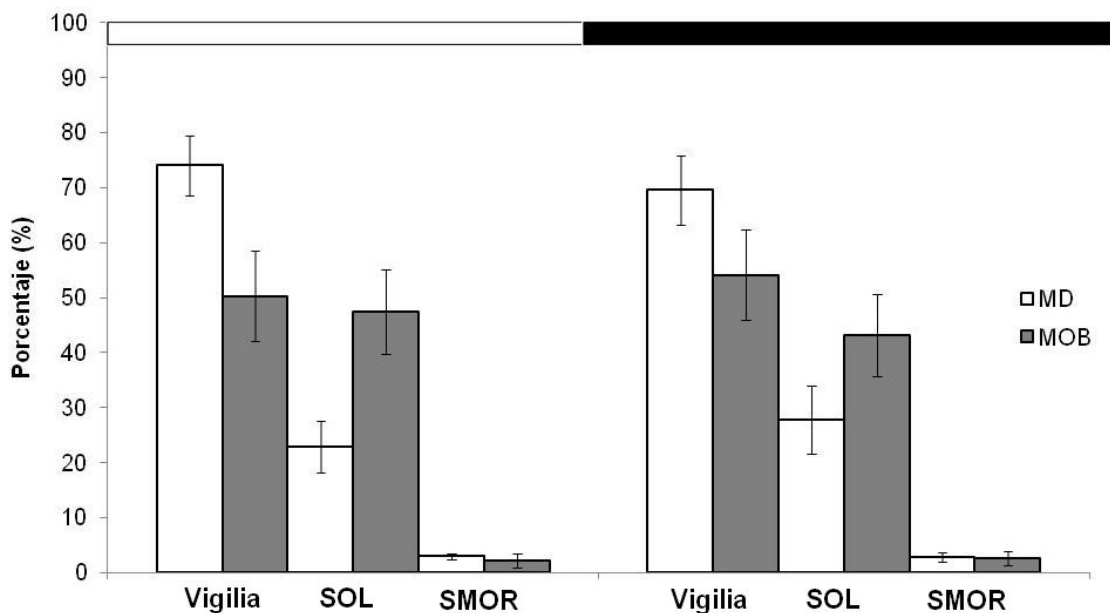


Figura 19. Valores promedio de los porcentajes de los tres estados de vigilancia ( $\pm$ EE) en los ratones de los volcanes delgados (barras blancas) y obesos (barras oscuras), durante un ciclo de luz-oscuridad 12:12 (barra superior). Nótese como los machos obesos (MOB) tienden a presentar un porcentaje mayor de sueño de ondas lentas en ambas fases del fotoperíodo, mientras que los machos delgados (MD) presentan un porcentaje mayor de vigilia. SOL: Sueño de ondas lentas, SMOR: Sueño con movimientos oculares rápidos.

Tabla No. 3

Tiempo promedio en minutos ( $\pm$ EE) que permanecieron los machos, delgados y obesos, del ratón de los volcanes en los tres estados de vigilancia durante el ciclo de luz-oscuridad (LO: 12:12).

		Fotofase	Escotofase
Vigilia (min)	Delgados	533.8 $\pm$ 39.2	500.9 $\pm$ 45.6
	Obesos	362.2 $\pm$ 59.1	390.1 $\pm$ 58.5
SOL (min)	Delgados	165.2 $\pm$ 33.9	200 $\pm$ 44.3
	Obesos	341.6 $\pm$ 55.9	310.8 $\pm$ 53.4
SMOR (min)	Delgados	21.6 $\pm$ 9.5	20.3 $\pm$ 9.3
	Obesos	16.2 $\pm$ 4.2	19.1 $\pm$ 6.3

El tiempo en minutos de los tres estados de vigilancia se expresa como el promedio por grupo ( $\pm$  EE). SOL: Sueño de ondas lentas, SMOR: Sueño con movimientos oculares rápidos.

### 7.3.3 Distribución temporal de los estados de vigilancia en un periodo de 24 h.

Con el fin de presentar de manera más detallada la distribución temporal de los tres estados de vigilancia, durante las 24 h de registro, en la Figura 20 se muestran los porcentajes promedio ( $\pm$ EE) de vigilia, SOL y SMOR en intervalos de dos horas. Aunque en esta figura no se

observan diferencias en la distribución de los tres estados de vigilia, si se nota la misma tendencia descrita anteriormente, en la cual los MD presentaron un porcentaje mayor de vigilia y los MOB un porcentaje mayor de SOL, mientras que el porcentaje de SMOR fue similar entre ambos grupos, tanto en la fase de luz como de oscuridad.

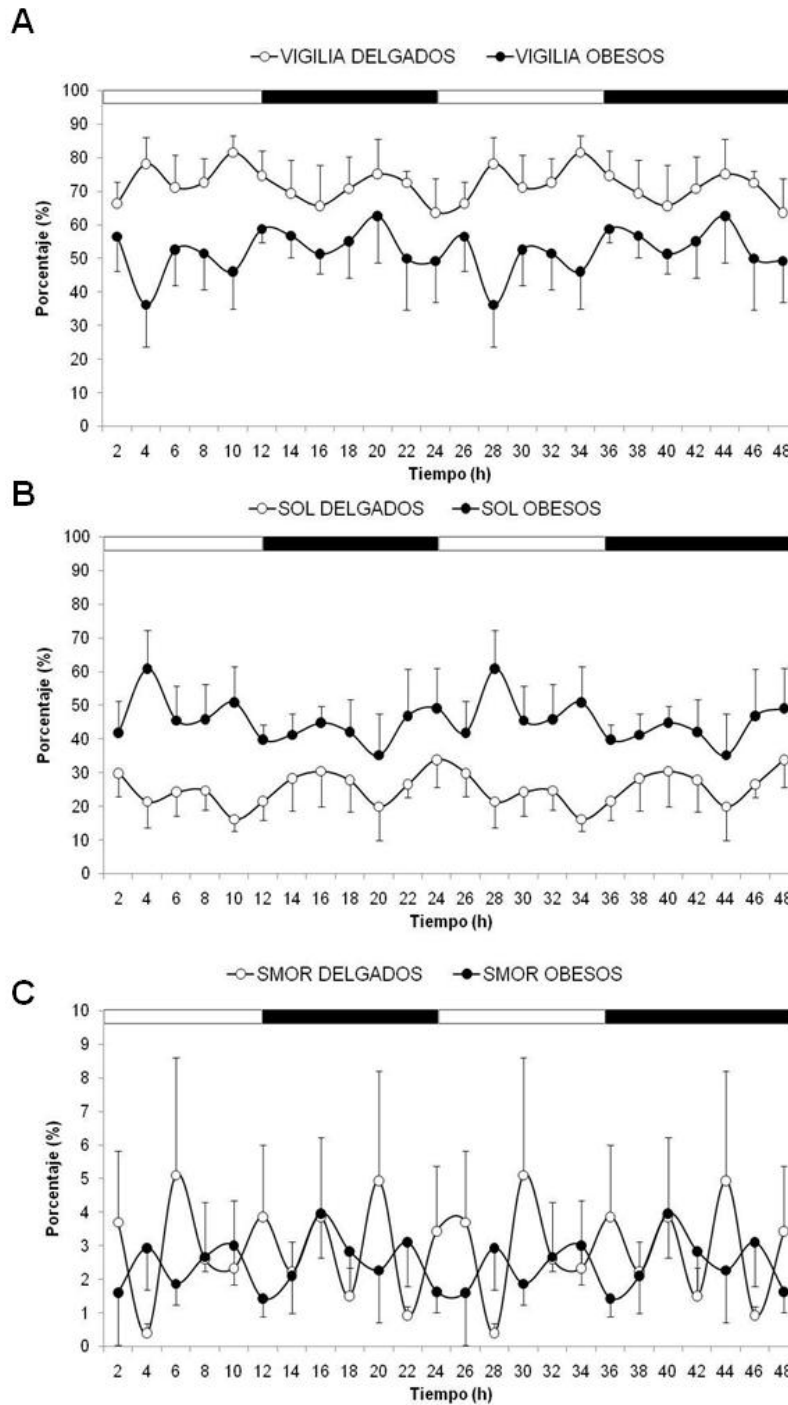


Figura 20. Valores promedio ( $\pm$ EE) de los porcentajes de vigilia (A), de SOL (B) y de SMOR (C) cada dos horas, en los MD y los MOB durante un ciclo de luz-oscuridad 12:12. La distribución temporal de los estados de sueño se muestra en doble gráfica.



## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 Análisis de los parámetros plasmáticos.

El uso de modelos animales silvestres para diversas investigaciones científicas tiene implícita una amplia variabilidad interindividual en los resultados, lo cual es típico de las poblaciones naturales (Heideman, 2004). Es probable que esto ocurra con el ratón de los volcanes, ya que los perfiles diarios de leptina, insulina, triglicéridos, cortisol y glucosa, así como los valores de acrofase, fueron distintos entre individuos, como se puede ver reflejado en el error estándar de los valores promedio de las Figuras 9 a la 13. En este trabajo, la variabilidad en los resultados podría ser consecuencia de factores como la edad, el ciclo hormonal de las hembras, el uso de animales silvestres y F1, así como de la historia genética y ambiental previa de los animales, especialmente de los ratones silvestres.

De acuerdo con las pruebas de ANOVA, las concentraciones mínimas y máximas de los perfiles plasmáticos en los ratones delgados fueron distintas para la mayoría de los parámetros (excepto en el perfil de leptina para ambos grupos de animales delgados, y en el de insulina para las HD) en comparación con los animales obesos, pues en estos últimos sólo se encontraron diferencias en los perfiles de cortisol y en el perfil de triglicéridos para las HOB I. Sin embargo, a diferencia de los ratones delgados, la mayoría los individuos obesos tuvieron perfiles que ajustaron al modelo de Cosinor, en comparación con los delgados. De esta manera, al tomar en cuenta las pruebas de ANOVA (consideradas de mayor importancia), es posible que la mayoría de los perfiles diarios en los animales obesos no sean rítmicos y se requieran más horarios de muestreo para corroborar lo obtenido mediante el análisis por Cosinor.

Es difícil esclarecer la fase en la cual se encontró la concentración máxima de leptina, insulina, triglicéridos y glucosa en los distintos grupos, ya que las acrofases de los perfiles promedio sin el ajuste por Cosinor y las del promedio de los ajustes individuales no coinciden entre sí, lo cual podría deberse a la variabilidad interindividual de los perfiles diarios, o bien a que las horas de muestreo se encuentran distantes entre sí, por lo cual quizá sea necesario tomar muestras con mayor frecuencia.

Las concentraciones plasmáticas de leptina, insulina y triglicéridos fueron superiores en los ratones obesos de ambos géneros, encontrándose diferencias en las concentraciones más bajas de estos tres parámetros. Las concentraciones mínimas de leptina en las HOB I fueron 82% más altas respecto a las HD, las de insulina el 39 % y las de triglicéridos el 40%, encontrándose porcentajes incluso mayores en las HOB II, las cuales tuvieron el 79% y el 76%

más de insulina y triglicéridos en comparación con las HD. En los MOB, los picos de leptina, insulina y triglicéridos fueron 81%, 59% y 54% superiores en relación con los MD.

Los niveles más altos de cortisol fueron 14% y 31% mayores en las HD y los MD en comparación con las HOB y los MOB respectivamente, sin embargo no se encontraron diferencias entre éstas, mientras que las concentraciones más bajas de cortisol fueron similares entre los grupos. Esto último también ocurrió para los niveles de glucosa, pues tanto las concentraciones máximas como mínimas fueron similares entre los distintos grupos. En los siguientes párrafos, se discuten los aspectos particulares para cada parámetro.

### **8.1.1 Leptina.**

En este trabajo se encontraron niveles plasmáticos de leptina mayores en los ratones obesos de ambos géneros, lo cual se atribuye al hecho de que esta hormona se secreta principalmente por el tejido adiposo blanco (Chelikani, et al., 2004; Piccione, et al., 2004), por lo cual es posible que los ratones obesos de mayor peso corporal tengan un porcentaje más alto de tejido graso, puesto que existe una relación lineal entre el peso de los animales y las concentraciones de leptina en el plasma (Figura 9 C). Además, estos resultados son consistentes con otras investigaciones realizadas en ratones, ya que las hembras tuvieron aproximadamente el 31% más de leptina respecto a los machos (aunque no se encontraron diferencias significativas), probablemente como resultado de una correlación negativa entre la concentración de testosterona y los niveles de leptina, como ocurre en otros ratones (Ahrén, 2000).

Los altos niveles de leptina en los individuos obesos del ratón de los volcanes indican que probablemente no exista un déficit cuantitativo de esta hormona, sino que se presente un estado de resistencia a la misma (como se ha reportado en algunos humanos y en otros roedores obesos). Es posible que esto ocurra a distintos niveles, como por alteraciones en los receptores hipotalámicos, en sus mecanismos de señalización, o en su transporte hacia el SNC, por defectos en la barrera hematoencefálica y/o como consecuencia de los altos niveles de triglicéridos en los ratones obesos, pues se ha observado que alteran el transporte de leptina a través de la barrera hematoencefálica, tal vez mediante la unión de los triglicéridos con esta hormona o bien por un proceso de regulación que ejercen sobre el transportador de leptina (Banks, et al., 2004; Jéquier, 2002). De esta manera, es posible que en los ratones obesos las concentraciones de leptina en el sistema nervioso central (SNC) sean menores que en el plasma, especialmente en las hembras que presentan los niveles más altos de triglicéridos (las HOB II).

En ningún grupo se encontraron diferencias entre las concentraciones máximas y mínimas de leptina mediante las pruebas de ANOVA, por lo cual no existe un perfil rítmico en los MOB aunque se haya ajustado al modelo de Cosinor, esto quizá debido a que las muestras de sangre fueron obtenidas en condiciones de ayuno y de acuerdo con otros estudios realizados en roedores es probable que la secreción nocturna de leptina se correlacione con la secreción de insulina en respuesta a la alimentación (Ahrén, 2000), de tal manera que la leptina actúa como un factor de saciedad.

Es posible que el pico de leptina en el ratón de los volcanes se correlacione con las altas concentraciones de insulina, ya que en la mayoría de los grupos el pico de ambas hormonas coinciden en fase (Tabla No. 1), y de acuerdo con estudios realizados en ratas, la insulina es un estímulo importante que promueve la expresión del gen *ob* que codifica para la leptina (Jéquier, 2002).

### **8.1.2 Insulina.**

La insulina es una hormona que desempeña un papel importante en la regulación del balance energético, pues interviene en la utilización de glucosa y triglicéridos en el organismo, actúa a nivel hipotalámico disminuyendo la ingesta de alimento e incrementando el gasto de energía, y es capaz de modificar la secreción de otras hormonas de importancia metabólica como la leptina (Milagro y Marques-Lopes 2002).

Las concentraciones plasmáticas de insulina fueron mayores en los ratones obesos, lo cual es consistente con antecedentes que indican que la secreción de esta hormona es directamente proporcional a la cantidad de grasa corporal (Clegg, *et al.*, 2006). Es probable que los altos niveles de insulina en los animales obesos sean consecuencia de un estado de resistencia a esta hormona (como sucede en los humanos), pues bajo esta condición los individuos tienen concentraciones normales de glucemia pero con hiperinsulinemia (Dominiczak, 2006).

Los niveles de insulina fueron superiores en las hembras obesas, especialmente en las HOB II, en las cuales la concentración máxima de insulina fue 74% mayor que en los MOB, lo cual podría atribuirse al peso corporal y al papel que desempeñan los estrógenos en la secreción de esta hormona, pues de acuerdo con diversos estudios realizados con ratas, la administración de estrógenos incrementa la proporción de insulina en el páncreas y se encuentra asociada con la hipertrofia y la regeneración de los islotes pancreáticos en animales parcialmente pancreatectomizados. Asimismo, al llevar a cabo las pruebas de tolerancia a la glucosa con ratas hembra, a las cuales se les administra de manera subcutánea estradiol, se observa un

incremento en la secreción de insulina, mientras que la ovariectomía se relaciona con una secreción reducida de esta hormona (Morimoto, *et al.*, 2010).

Únicamente en los MD se encontraron diferencias entre las concentraciones más altas y más bajas de insulina mediante las pruebas de ANOVA, por lo cual sólo en este grupo existe un ritmo diario aunque los perfiles de la mayoría de los grupos se hayan ajustado al modelo de Cosinor. De tal manera que en este roedor el ritmo de insulina podría estar determinado por los patrones de alimentación, como se ha propuesto en los ratones (Ahrén, 2000) y en las ratas Wistar, observándose en estas últimas la ausencia de un patrón rítmico de insulina en condiciones de ayuno (La Fleur, *et al.*, 1999).

Es probable que en el ratón de los volcanes todos los grupos hayan presentado su pico de insulina en la fase de luz debido a la condición de ayuno bajo la cual se encontraban los animales, pues se ha reportado que en las ratas Wistar el ayuno es capaz de invertir la fase del ritmo diario de insulina, cuyo pico se esperaría en la escotofase (La Fleur, *et al.*, 1999). Asimismo, es posible que el pico de insulina en la mayoría de los grupos no sea una consecuencia directa del pico de glucosa, ya que sólo en las HD y en las HOB II ambos parámetros coinciden en fase (Tabla 1).

### **8.1.3 Triglicéridos.**

Los triglicéridos desempeñan un papel importante en la regulación de la homeostasis energética, tanto en períodos de disponibilidad de alimento como en condiciones de ayuno, fungiendo como reservas de energía al almacenarse en el tejido adiposo blanco (Coleman y Lee, 2004).

En este trabajo, los niveles de triglicéridos fueron superiores en los ratones obesos de ambos géneros, lo cual es consistente con datos que reportan una relación proporcional entre su concentración y la cantidad de grasa corporal (Dominiczak, 2006). Las concentraciones máximas en las hembras tendieron a ser mayores en comparación con las de los machos, especialmente en las HOB II quienes tuvieron el 40% más de triglicéridos; de esta manera, se corroboran los resultados de otros estudios que indican que la hipertrigliceridemia se presenta principalmente en las hembras obesas del ratón de los volcanes, quienes además exhiben el desarrollo de EH microvacuolar periportal (Diego Magaña, 1999); sin embargo, serían necesarios estudios histológicos del hígado para determinar si estos trastornos también se desarrollaron en los individuos empleados durante este trabajo.

En los ratones delgados de ambos géneros y en las HOB I se encontraron diferencias entre las concentraciones máximas y mínimas de los perfiles diarios de triglicéridos, mediante las

pruebas de ANOVA (Tabla 1), así como un ajuste significativo de acuerdo con el modelo de Cosinor, por lo cual únicamente en estos grupos se presentan variaciones rítmicas en los perfiles diarios. En las HOB II y en los MOB I no se encontraron diferencias entre las concentraciones mencionadas anteriormente, aunque el perfil de triglicéridos en los MOB se ajustó por medio de Cosinor.

En los trabajos realizados con ratas Zucker delgadas y obesas alimentadas *ad libitum* y bajo un ciclo de LO 12:12, se ha reportado que el pico máximo en la concentración de triglicéridos se presenta en la escotofase (Lanza-Jacoby, 1986). Por otra parte, en las ratas macho Wistar (también bajo un ciclo de LO 12:12), se ha encontrado que en los animales alimentados *ad libitum* el pico de triglicéridos se presenta 2 h antes del inicio de la fase luminosa, mientras que en las ratas con 12 h de ayuno este pico se observa en la fotofase (Escobar, *et al.*, 1998). Es probable que, aún con tan sólo 4 h de ayuno, en el ratón de los volcanes suceda algo similar que en las ratas Wistar; asimismo, cabría la posibilidad de que el pico de triglicéridos se presente al mediodía, como se observa en la Tabla 1 para la mayoría de los grupos, como una adaptación de los individuos para obtener la energía necesaria cuando su actividad es menor y se esperarían se alimentaran en menor proporción, pues *N. alstoni* es un animal nocturno.

#### **8.1.4 Cortisol.**

Las hormonas glucocorticoides intervienen en diversas funciones fisiológicas, incluyendo procesos metabólicos como la lipogénesis y la gluconeogénesis, así como en la regulación de neuropéptidos hipotalámicos involucrados en el control del apetito, como el factor liberador de corticotropinas (CRH) y el NPY; las alteraciones en el eje hipófisis-hipotálamo-adrenales (HHA) generan cambios en el metabolismo energético (Jessop, *et al.*, 2001).

En los roedores el glucocorticoide más abundante es la corticosterona (Dallmann, *et al.*, 2006), y aunque en este trabajo se empleó el kit de ELISA para Cortisol (Calbiotech Inc.), el anticuerpo empleado en esta prueba tiene el 45% de reactividad cruzada con la corticosterona, de tal manera que los resultados de este trabajo podrían más bien reflejar los niveles de corticosterona en el ratón de los volcanes y no los de cortisol.

En este trabajo, los ratones obesos de ambos géneros presentaron los niveles más bajos de cortisol, lo cual podría ser consecuencia de las altas concentraciones de leptina que poseen estos animales, ya que esta hormona inhibe al eje HHA reduciendo la secreción del CRH y la esteroidogénesis adrenal, al unirse directamente al receptor *ob* de las glándulas adrenales (Leal-Cerro, *et al.*, 2001). Además, en la mayoría de los grupos estudiados, las concentraciones

máximas de leptina se relacionan con los niveles mínimos de cortisol (Tabla 1), lo cual es consistente con lo que se ha reportado en los humanos (Van Cauter y Knutson, 2008).

La concentración máxima de cortisol en todos los grupos se encontró durante el inicio de la fase oscura, de tal manera que estos datos podrían corroborar la hipótesis de que en los animales nocturnos, como lo es el ratón de los volcanes, la concentración de glucocorticoides incrementa hacia el inicio del período de actividad (Dickmeis, 2009). Además, debido a que la obtención de las muestras de plasma se llevó a cabo en animales en condiciones de ayuno, es posible que el ritmo diario de cortisol se encuentre regulado por el sistema circadiano independientemente del patrón de alimentación (La Fleur, *et al.*, 1999; Sietse, *et al.*, 2005), pues en todos los grupos se encontraron diferencias entre las concentraciones más altas y más bajas de cortisol, mediante las pruebas de ANOVA, y además sus perfiles diarios se ajustaron al modelo de Cosinor.

### **8.1.5 Glucosa.**

Los mamíferos han desarrollado distintos mecanismos que les permiten regular la glucemia en intervalos estrechos, ya que su alteración puede generar enfermedades como la diabetes tipo II, y la obesidad es un factor de riesgo importante para el desarrollo de este trastorno.

En este trabajo, las concentraciones plasmáticas de glucosa no fueron distintas entre los ratones delgados y obesos de ambos géneros (Figura 13), lo cual podría deberse a la condición de ayuno en la cual se encontraban los animales cuando se obtuvieron las muestras de plasma, como se ha reportado en otro trabajo realizado con el ratón de los volcanes (Carmona Castro, 2006).

En los roedores nocturnos se ha observado que la glucemia incrementa hacia el final de la fase de luz, justo antes de que inicien su principal período de actividad (La Fleur, *et al.*, 2001); sin embargo, en este trabajo el pico de glucosa se encontró cerca del mediodía para la mayoría de los grupos, como se ha reportado en las ratas Wistar con 2 h de ayuno previo a la toma de muestras (Mori, *et al.*, 1985). Es posible que en el ratón de los volcanes, bajo condiciones de ayuno, el pico de glucosa se encuentre en la fase de luz como una adaptación de los individuos para obtener la energía necesaria cuando su actividad es menor y se esperaría se alimentaran en menor proporción, pues *N. alstoni* es un animal nocturno.

Únicamente los ratones delgados de ambos géneros presentaron variaciones rítmicas en los perfiles de glucosa, pues se encontraron diferencias entre las concentraciones máximas y mínimas de ésta mediante las pruebas de ANOVA (Tabla 1), aunque sólo el perfil de las HD se ajustó al modelo de Cosinor. Es posible que en el ratón de los volcanes el patrón rítmico en la

glucemia se encuentre regulado por el NSQ, de tal manera que el pico de glucosa no es una consecuencia directa de los patrones de alimentación (ya que las muestras de plasma se obtuvieron en animales con 4 h de ayuno) y probablemente tampoco de la acción de los glucocorticoides (puesto que sólo en los MD el pico de glucosa y de cortisol coinciden en fase), al igual que en otros roedores y en los humanos (La Fleur, *et al.*, 1999; Dominiczak, 2006). Por otro lado, es probable que el glucagón promueva la gluconeogénesis y la movilización de glucógeno del hígado en condiciones de ayuno determinando el ritmo diario de glucosa, como sucede en las ratas Wistar; pues se sabe que existe una interconexión nerviosa entre el NSQ y el páncreas (La Fleur, *et al.*, 1999; Ruitter, *et al.*, 2003).

## **8.2 Pruebas de tolerancia a la glucosa (PTG).**

Las PTG corroboran algunos de los resultados obtenidos anteriormente en el ratón de los volcanes por Carmona Castro en 2006 y López Urbán en 2007, ya que, como se muestran en las Figuras 14 y 15, las concentraciones basales de glucosa al mediodía y a la medianoche fueron similares entre los animales obesos y delgados; sin embargo, una vez que se les inyectó la solución de glucosa, los animales obesos tendieron a presentar niveles de glucemia superiores, lo cual sugiere que estos ratones (especialmente las HOB II) tienen hiperglucemia postprandial y son intolerantes a la glucosa, posiblemente debido a un estado de resistencia a la insulina causada por las altas concentraciones de ácidos grasos libres (Shulman, 2000; Ginsberg, *et al.*, 2005); sin embargo, para corroborar esta hipótesis se necesitarían cuantificar los ácidos grasos libres en el ratón de los volcanes.

En 2006, Carmona Castro sugirió que la normoglucemia basal de los animales obesos en condiciones de ayuno podría estar relacionada con su capacidad de secretar una mayor concentración de insulina, lo cual se confirma en este trabajo ya que los ratones obesos tienden a presentar hiperinsulinemia a diferencia de los delgados (Figura 10).

Las PTG muestran que, tras la inyección de glucosa, la glucemia en las HD incrementó de manera significativa en la fase de oscuridad respecto a la fase de luz, y al finalizar el tiempo de las pruebas, en ambas fases los animales lograron alcanzar concentraciones de glucosa muy cercanas a los niveles basales (Figura 14). En la Figura 16, se muestra que el promedio del área bajo la curva en las HD fue menor al mediodía en comparación con la medianoche, lo cual podría indicar que la internalización de la glucosa desde la sangre hacia los tejidos es más eficiente durante la fotofase.

Las HOB I tendieron a presentar niveles de glucosa en sangre mayores a la medianoche que al mediodía, y al finalizar las pruebas en ambas fases la glucemia no regresó a sus niveles

basales, por lo cual este grupo presenta intolerancia a la glucosa. Aunque no hubo diferencias entre los valores promedio del área bajo la curva en ambas fases, estos valores tendieron a ser mayores en la fase oscura, similar a lo ocurrido en las HD.

En las HOB II la glucemia fue mayor al mediodía respecto a la medianoche, tanto en los niveles basales como después de la inyección de glucosa, y al finalizar las PTG los individuos no lograron alcanzar su glucemia basal en ninguna de las fases, de tal manera que estos animales no sólo son intolerantes a la glucosa sino que además tienen concentraciones basales distintas en la fotofase y en la escotofase, lo cual probablemente no sea consistente con los perfiles diarios de glucosa en las HOB II debido a que los individuos estudiados no fueron los mismos. Los valores promedio del área bajo la curva tendieron a ser mayores al mediodía en comparación con la medianoche (Figura 16), aunque no se encontraron diferencias entre ambos horarios, lo cual podría indicar que la internalización de glucosa de la sangre a los tejidos fue menos eficiente en la fotofase, probablemente en relación con la naturaleza nocturna del ratón de los volcanes, pues se esperaría que en la fase oscura los individuos se encuentren mejor adaptados para metabolizar los alimentos que consumen, internalizando de manera más eficaz la glucosa desde el torrente sanguíneo hacia todos los tejidos debido a una mayor sensibilidad a la insulina (Ramsey, *et al.*, 2007; Garaulet-Aza, *et al.*, 2009).

Las PTG realizadas en los MD no mostraron diferencias entre la fotofase y la escotofase, pues al finalizar las pruebas se encontraron valores de glucemia cercanos en ambos horarios, a pesar de que los niveles de glucosa en la sangre tendieron a aumentar más durante la fase oscura a los 30 min. La Figura 16 muestra que los valores promedio del área bajo la curva fueron menores en la fase oscura respecto a la fase de luz, aunque no se encontraron diferencias entre estas, lo cual es consistente con la naturaleza nocturna del ratón de los volcanes.

En los MOB la glucemia fue mayor en las pruebas realizadas al mediodía, aunque sólo se encontraron diferencias 60 min después de la administración de glucosa, al finalizar la prueba los ratones no lograron alcanzar su glucemia basal en ninguna de las fases, por lo cual presentan intolerancia a la glucosa. Los valores promedio del área bajo la curva fueron mayores al mediodía (Figura 16), aunque no se encontraron diferencias entre fases, consistente con la naturaleza nocturna de *N. alstoni*.

En resumen, los valores promedio de las áreas bajo la curva confirman que los ratones delgados y obesos de la mayoría de los grupos muestran intolerancia a la glucosa al mediodía, posiblemente en relación con la naturaleza nocturna del ratón de los volcanes. La intolerancia a



la glucosa que también se presenta en los ratones obesos durante la fase oscura podría ser consecuencia de un estado de resistencia a la insulina, como sugiere el trabajo de Carmona Castro (2006), en el cual los ratones obesos con EH presentan hiperinsulinemia cuando las concentraciones de glucosa en las PTG son más elevadas.

Los resultados de este trabajo, muestran la importancia de considerar la hora del día en la cual se lleva a cabo el diagnóstico de desórdenes metabólicos como la diabetes tipo II, ya que la tolerancia a la glucosa se modifica en función del tiempo.

### **8.3 Registros de sueño.**

Este trabajo de investigación confirma los resultados del grupo de Ayala-Guerrero (1998), quienes describieron al ratón de los volcanes como un animal polifásico cuyos estados de vigilancia presentan los patrones electrofisiológicos típicos hallados en otros mamíferos. Sin embargo, los porcentajes de los estados de sueño en este trabajo fueron distintos a los encontrados por ese grupo, pues ellos reportan que en un período de 24 h los machos del ratón de los volcanes pasan en promedio el  $64.5 \pm 9\%$  ( $\pm$  desviación estándar) del tiempo en SOL y el  $7.6 \pm 1.3\%$  en SMOR, mientras que en este trabajo los resultados indican que los MD pasan en promedio el  $25 \pm 4.6\%$  en SOL y el  $3 \pm 1.1\%$  en SMOR, y los MOB el  $45 \pm 6.1\%$  del tiempo en SOL y el  $2 \pm 0.5\%$  en SMOR.

Es probable que los resultados de ambos trabajos sean distintos debido a las diferencias en el peso corporal de los animales empleados, o a las condiciones ambientales mantenidas durante los registros de sueño. El grupo de Ayala-Guerrero utilizó ratones machos con un peso de 75 a 85 g, superior al de los machos considerados obesos en este trabajo ( $72 \pm 2$  g), reportando un porcentaje de SOL mayor al de los MOB de este estudio, por lo cual es posible que la obesidad provoque una reducción en el tiempo de vigilia y un incremento en el SOL, al igual que en los ratones C57B6/L con obesidad inducida por una dieta rica en grasas (Jenkins, *et al.*, 2005); sin embargo, se requieren llevar a cabo registros de sueño en un mayor número de animales (delgados y obesos) para corroborar esta hipótesis. Asimismo, es probable que las condiciones fotoperiodicas en las cuales se mantuvieron los animales durante el registro pudieran modificar la conducta de los animales, incluyendo al ciclo sueño-vigilia, pues el grupo de Ayala-Guerrero llevó a cabo los registros en condiciones de luz constante, mientras que en esta investigación se realizaron en un fotoperiodo de luz-oscuridad 12:12 (luz: 06:00-18:00 h).

En este trabajo, los MD tuvieron un porcentaje de vigilia superior al de los MOB, lo cual indica que los animales delgados son más activos que los obesos.

El porcentaje de SOL fue superior en los ratones obesos respecto al de los animales delgados, esto en conjunto con la disminución en el porcentaje de vigilia, indica que el SOL incrementa a expensas de la vigilia en los MOB. Esta relación podría ser consecuencia de un estado de resistencia a la leptina en el ratón de los volcanes, pues aunque esta hormona se encuentra en altas concentraciones en el plasma es posible que su efecto en el SNC se encuentre alterado, comparable a lo que ocurre en los ratones *ob/ob* que carecen de leptina y que presentan un porcentaje elevado de sueño NoMOR (Laposky, *et al.*, 2006).

Al comparar los porcentajes de los tres estados de vigilancia, entre los ratones obesos y delgados durante el registro de 24 h, se encontraron diferencias entre los porcentajes totales de vigilia y de SOL, pero no en el de SMOR (Figura 18). Esto indicaría que la obesidad podría alterar los mecanismos de regulación homeostática del sueño, debido al incremento en el SOL, más que en aquellos procesos de regulación circadiana, puesto que no hubo diferencias en la proporción del SMOR, ya que ambos componentes regulan el sueño de manera independiente (Franken y Dijk, 2009).

El análisis de los porcentajes de los tres estados de vigilancia en función de las fases de luz y oscuridad (Figura 19), no mostró diferencias entre los ratones delgados y obesos, lo cual podría estar relacionado con el número de animales analizados por grupo, de tal manera que se recomienda aumentar el número de muestra, ya que se observan tendencias que sugieren posibles diferencias. Asimismo, es probable que los ratones de los volcanes obesos presenten un comportamiento similar al observado en los ratones mutantes *ob/ob* (con deficiencia de leptina y de fenotipo obeso), en los cuales no sólo se incrementa la cantidad de SOL, sino que además aumentan los cambios de fase y los brotes de sueño son más frecuentes (aunque de menor duración) (Laposky, *et al.*, 2006).

Como se muestra en el Figura 20, a pesar de que no se encontraron diferencias en la distribución temporal de los tres estados de vigilancia entre los ratones delgados y obesos, algunos de los valores más altos de vigilia se observaron en la fotofase para los MD y en la escotofase para los MOB, mientras que en el SOL ocurre de manera inversa, lo cual apoya la hipótesis sugerida anteriormente acerca de los mecanismos que controlan el sueño.

#### **8.4 Consideraciones importantes sobre el uso del ratón de los volcanes como modelo de obesidad.**

Existen distintos factores que podrían ser la causa de la obesidad desarrollada por el ratón de los volcanes, como la dieta que reciben en cautiverio y que difiere del alimento que consumen los animales silvestres, el cual está constituido por hojas, tallos, brotes tiernos de plantas

herbáceas, frutos como fresa y zarzamora (en la temporada de lluvias) y capulincillo (a finales del año), granos de polen de diversas especies de plantas, artrópodos del orden Coleóptera, hormigas y larvas de lepidópteros (Álvarez y Mayo-Aceves, 1993). Otro factor que podría influir en el desarrollo de la obesidad es la reducción del espacio en las jaulas de Bioterio así como la abundante disponibilidad de alimento, haciendo que los animales disminuyan su actividad física y consuman una proporción constante de calorías sin variaciones anuales en la dieta como lo podrían experimentar en el campo. Esta hipótesis se encuentra sustentada por Carmona Castro (2006), quien señaló que las alteraciones metabólico-nutricionales podrían ser inducidas por el sedentarismo cuando el ratón de los volcanes se mantiene en cautiverio. A pesar de esto, lo interesante en *N. alstoni*, es que no todos los ratones silvestres mantenidos en cautiverio, ni todas sus crías F1 nacidas en laboratorio, desarrollan el fenotipo obeso, aún encontrándose bajo las mismas condiciones ambientales, lo cual sugiere que probablemente algunos factores genéticos también podrían estar involucrados en la susceptibilidad al desarrollo del SM exhibido por este roedor.

Este estudio es la primera aproximación que se desarrolla en *N. alstoni* acerca de los parámetros fisiológicos vinculados con el metabolismo de los lípidos y la glucosa, en un ciclo diario. Los resultados de este trabajo, indican que esta especie podría ser un buen modelo biológico para el estudio de los ritmos diarios y los trastornos metabólicos relacionados con la obesidad; sin embargo, aún hacen falta controlar algunos aspectos en torno a los animales empleados en futuras investigaciones.

Es importante redefinir los parámetros que permitan reconocer a un animal como obeso (incluyendo evaluaciones metabólicas, peso corporal y porcentaje de grasa en diferentes regiones corporales), además de contar con animales de la misma edad con el fin de disminuir la variabilidad entre individuos, pues trabajos anteriores realizados en esta especie reportan que los ratones silvestres en cautiverio desarrollan lipomas con una incidencia del 9.9%, la cual es más elevada en los machos, aunque las hembras presentan lipomas de mayor tamaño, siendo la edad un factor que incrementa la predisposición a este tipo de neoplasias (Carmona Castro, 1994).

Asimismo, resultaría útil llevar a cabo más estudios de seguimiento en el desarrollo de los trastornos metabólicos, tanto en ratones nacidos en cautiverio como silvestres, a la par que los animales incrementan de peso, esto permitiría establecer adecuadamente el origen de cada una de las alteraciones observadas en el SM, así como determinar si en el ratón de los volcanes la obesidad es la causa o consecuencia de estos trastornos metabólicos.

Por otro lado, es importante cuantificar el consumo diario de alimento *ad libitum* en las distintas fases del ciclo luz-oscuridad, así como evaluar las diferencias en las tasas metabólicas basales y específicas entre animales obesos y delgados.

La distribución de la grasa corporal es un factor importante que considerar en los ratones, pues el tejido adiposo visceral presenta mayor sensibilidad a los estímulos lipolíticos, en comparación con la grasa subcutánea, esto determina la secreción tónica de ácidos grasos libres hacia la circulación portal, estableciendo el primer paso en una serie de eventos que culminan en el desarrollo de resistencia a la insulina (Godínez Gutiérrez, et al., 2002).

El análisis de otros parámetros en el ratón de los volcanes, sería de gran utilidad para el conocimiento de los trastornos metabólicos en los individuos obesos, como los ácidos grasos libres (de importancia en la resistencia a la insulina), el glucagón (hormona que participa en la regulación de la glucemia y factor determinante del ritmo diario de ésta en condiciones de ayuno), así como la grelina (hormona vinculada con el incremento del apetito), sólo por mencionar algunos.

Estudiar al ratón de los volcanes en condiciones distintas a las de este trabajo, enriquecería el conocimiento sobre esta especie, por lo cual se podrían determinar los perfiles de los distintos parámetros en oscuridad constante, con el fin de establecer si existe algún trastorno de naturaleza circadiana en los individuos obesos que no pudieran observarse bajo ciclos de luz-oscuridad, pues de acuerdo con trabajos no publicados en esta especie, los individuos obesos en luz-oscuridad no presentan diferencias significativas en su ritmo de actividad locomotriz respecto a los ratones delgados. Asimismo, sería importante obtener los perfiles diarios en animales alimentados *ad libitum*, pues la alimentación es un factor que podría ser distinto entre los ratones delgados y obesos, lo cual a su vez modificaría la mayoría de los parámetros estudiados en este trabajo, especialmente si tomamos en cuenta la resistencia a la insulina que se presenta en los individuos obesos.

El uso de modelos animales de laboratorio no tradicionales, como el ratón de los volcanes, podría permitir un mejor conocimiento de las enfermedades humanas relacionadas con el síndrome metabólico, como ya ha sido propuesto por otros grupos de trabajo como el de Krugner-Higby en el año 2000, quienes emplearon al ratón de California (*Peromyscus californicus*) para el estudio de la diabetes tipo II. El estudio de modelos animales en los cuales se observa la expresión espontánea de padecimientos determinados, puede ayudar a comprender las bases biológicas y aquéllas presiones ambientales o ecológicas que predisponen o provocan ciertas enfermedades. Sin embargo, en las poblaciones naturales existen numerosas variables que no pueden ser controladas a diferencia de los modelos

tradicionales, por lo cual también resulta más compleja la interpretación de los resultados obtenidos y ésta debe llevarse a cabo de manera más minuciosa.

## 9. CONCLUSIONES

- ❖ El ratón de los volcanes obeso presenta hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia e hiperleptinemia, siendo más evidente en las hembras.
- ❖ Los niveles basales de glucosa en el plasma son similares en los individuos delgados y obesos del ratón de los volcanes, sin embargo estos últimos presentan intolerancia postprandial a la glucosa.
- ❖ En un período de 24 h, los machos obesos del ratón de los volcanes tienden a incrementar su porcentaje de SOL y disminuir el de vigilia, en comparación con los machos delgados, mientras que el porcentaje de SMOR no es distinto entre los dos grupos.
- ❖ El ratón de los volcanes podría ser un buen modelo para el estudio de los ritmos circadianos y los trastornos metabólicos relacionados con la obesidad, sin embargo es importante redefinir los parámetros que permitan reconocer a un animal como obeso así como tratar de controlar algunos aspectos que permitan reducir la variabilidad en la población.

## 10. REFERENCIAS

- 📖 Adamantidis, A. and Lecea, L. 2009. The hypocretins as sensors for metabolism and arousal. *J. Physiol.* 587: 33-40.
- 📖 Aguilar-Salinas, C. A., Rojas, R., Gómez-Pérez, F. J., Mehta, R., Franco, A., Olaiz, G., and Rull, J. A. 2005. The Metabolic Syndrome: A Concept Hard to Define. *Arch. Med. Res.* 36: 223-231.
- 📖 Ahrén, B. 2000. Diurnal variation in circulating leptin is dependent on gender, food intake and circulating insulin in mice. *Acta Physiol. Scand.* 169: 325-221
- 📖 Álvarez, T. y Mayo-Aceves, E. 1993. Contribución al conocimiento de los hábitos alimenticios del ratón de los volcanes, *Neotomodon alstoni alstoni* (Merriam, 1898). *Acta Zool. Mex.* 59: 1-51.

- 📖 Ayala-Guerrero, F., Vargas-Reyna, L., Ramos, J. I., Mexicano, G. 1998. Sleep patterns of the volcano mouse (*Neotomodon alstoni alstoni*). *Physiol. Behav.* 64(4):577-580.
- 📖 Banks, W. A., Coon, A. B., Robinson, S. M., Moinuddin, A., Shultz, J. M., Nakaoke, R. and Morley, R. E. 2004. Triglycerides Induce Leptin Resistance at the Blood-Brain Barrier. *Diabetes* (53): 1253-1260.
- 📖 Björntorp, P. and Rosmond, R. 2000. Ingestive behavior and obesity. Obesity and Cortisol. *Nutrition.* 16: 924-926.
- 📖 Boden G., Chen X., Mozzoli, M. and Ryan, I. 1996. Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81: 3419-3423.
- 📖 Bodosi, B., Gardi, J., Hajdu, I., Szentirmai, E., Obal, F. Jr. and Krueger, J. M. 2004. Rhythms of ghrelin, leptin, and sleep in rats: effects of the normal diurnal cycle, restricted feeding, and sleep deprivation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 287: R1071–R1079.
- 📖 Bray, M. S. y Young M. E. 2006. Circadian rhythms in development of obesity: potential role for the circadian clock within the adipocyte. *Obes. Rev.* 8: 169-181.
- 📖 Buijs, R. M., Scheer, F.A., Kreier, F., Chunxia, Y., Bos, N., Goncharuk, V. D., Kalsbeek, A. 2006. Organization of circadian functions: Interaction with the body. *Prog. Brain. Res.* 153: 341-400.
- 📖 Cailotto, C., La Fleur, S. E., Van Heijningen, C., Wortel, J., Kalsbeek, A., Feenstra, M., Pévet, P. and Buijs, R. M. 2005. The suprachiasmatic nucleus controls the daily variation of plasma glucose via the autonomic output to the liver: are the clock genes involved?. *Eur. J. Neurosc.* 22: 2531-2540.
- 📖 Carmona Castro, A. 1994. Morfología macroscópica e histológica de los lipomas espontáneos en el ratón de los volcanes (*Neotomodon a. alstoni*), silvestre y nacido en el laboratorio. Tesis profesional. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.
- 📖 Carmona Castro, A. 2006. Obesidad esteatosis hepática y parámetros sanguíneos en el ratón de los volcanes (*Neotomodon alstoni alstoni*) mantenido en cautiverio. Tesis de Maestría en Biología Experimental. Facultad de Ciencias, UNAM. 95 pp.
- 📖 Chávez, C. B. 2005. Ratón de los volcanes. En: Ceballos, G. y Oliva, G. (coords.). Los mamíferos silvestres de México. FCE, CONABIO. México, D.F. 1986 pp.
- 📖 Chelikani P. K., Ambrose J. D., Keisler D. H. and Kennelly J. J. 2004. Effect of short-term fasting on plasma concentrations of leptin and other hormones and metabolites in dairy cattle. *Domestic Animal Endocrinology.* 26: 33-48.

- 📖 Chun-Xia, Y., Jan, V., Jiapei, D., Guanfu, Y., Liqiang, R., Buijs, R. M. 2006. Ventromedial arcuate nucleus communicates peripheral metabolic information to the suprachiasmatic nucleus. *Endocrinol.* 147 (1): 283-294.
- 📖 Clegg, J. D., Brown, L. M., Woods, S. C. and Benoit, S. C. 2006. Gonadal Hormones Determine Sensitivity to Central Leptin and Insulin. *Diabetes.* 55: 978-987.
- 📖 Coleman, R. A. and Lee, D. P. 2004. Review. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog. Lipid. Res.* 43: 134-176.
- 📖 Dallmann, R., Touma, C., Palme, R., Albrecht, U., Steinlechner, S. 2006. Impaired daily glucocorticoid rhythm in *Per1Brd* mice. *J. Comp. Physiol. A.* 192: 769-775.
- 📖 Datta, S. and MacLean, R. R. 2007. Neurobiological Mechanisms for the Regulation of Mammalian Sleep-Wake Behavior: Reinterpretation of Historical Evidence and Inclusion of Contemporary Cellular and Molecular Evidence. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 31(5): 775-824.
- 📖 Davis W. B. and Follansbee, L. A. 1945. The Mexican volcano mouse, *Neotomodon*. *J. Mammal.* 26: 401-441.
- 📖 Dickmeis, T. 2009. Review Glucocorticoids and the circadian clock. *J. Endocrinol.* 200: 3-22.
- 📖 Diego Magaña, J. 1999. Características histopatológicas del hígado y cuantificación sérica de triglicéridos en el ratón de los volcanes (*Neotomodon a. alstoni*) con lipomas. Tesis Profesional. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, UNAM. 40 pp.
- 📖 Dominiczak, M. H. *Homeostasis de a glucosa, metabolismo energético e insulina*. En: Baynes, J. W. and Dominiczak, M. H. 2006. Bioquímica médica. 2ª edición. Elsevier, España, S.A. pp. 277-302.
- 📖 Duez, H. and Staels, B. 2008. The nuclear receptors Rev-erbs and RORs integrate circadian rhythms and metabolism. *Diabetes Vasc. Dis. Res.* 5: 82-88.
- 📖 Durán-Hernández, P., Miranda-Anaya, M. y Cintra-McGlone, L. *Ontogenia, filogenia y función del sueño MOR*. En: Guevara-Pérez, M.A., Hernández-González, M., Arteaga-Silva, M. y Olvera-Cortés, M. E. (coords). 2007. Aproximaciones al estudio de la funcionalidad cerebral y el comportamiento. Universidad de Guadalajara, México. pp. 351-384.
- 📖 Eckel-Mahan, K. and Sassone-Corsi, P. 2009. Metabolism control by the circadian clock and vice versa. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16: 462-467.

- Escobar, C., Díaz-Muñoz, M., Encinas, F. and Aguilar-Roblero, R. 1998. Persistence of metabolic rhythmicity during fasting and its entrainment by restricted feeding schedules in rats. *Am. J. Physiol.* 274 (43): R1309 - R1316.
- Fang J, Fishbein W. 1996. Sex differences in paradoxical sleep: influences of estrus cycle and ovariectomy. *Brain Res.* 734(1-2): 275-285.
- Fausto-Guerra, J., Valdéz-López, R. M., Aldrete-Rodríguez, M. G., López-Zermeño, M. C. 2006. Artículo de revisión. Antecedentes históricos sociales de la obesidad en México. *Investigación en salud.* 8 (2): 91-94.
- Fort, P., Bassetti, C. L. and Luppi, P. H. 2009. Alternating vigilance states: new insights regarding neuronal networks and mechanisms. *Eur. J. Neurosc.* 29: 1741-1753.
- Franken, P., Dilk, D. J. 2009. Circadian clock genes and sleep homeostasis. *Eur. J. Neurosc.* 29: 1820-1829.
- Froy, O. 2010. Metabolism and Circadian Rhythms-Implications for Obesity. *Endocr. Rev.* 31: 1-24.
- Fuentes Granados, C. 2008. Efecto del fotoperiodo de días cortos y días largos en el tamaño y morfología testicular del ratón de los volcanes (*Neotomodon alstoni alstoni*, Merriam, 1898). Tesis Profesional. Facultad de Ciencias, UNAM. 77 pp.
- Fuentes-Granados, C., Miranda-Anaya, M, Samario-Román, J., Moreno-Sáenz, E., Carmona-Castro, A. and Cárdenas-Vázquez, RJ. 2009. Circadian locomotor activity and response to different light conditions in the Volcano mouse *Neotomodon alstoni* (Merriam, 1898). *Biol. Rhythm Res.* 40: 1-10.
- Garaulet-Aza, M., Gómez-Abellán, P. y Madrid-Pérez, J. A. 2009. Cronobiology and metabolic syndrome. An interesting relationship. *Revista española de obesidad.* 7 (2): 73-86.
- Ginsberg, H. N., Zhang, Y. and Hernandez-Ono, A. 2005. Regulation of Plasma Triglycerides in Insulin Resistance and Diabetes. *Arch. Med. Res.* 36: 232-240.
- Godínez Gutiérrez, S. A., Marmolejo Orozco, G. E., Márquez Rodríguez, E., Siordia Vázquez, J. J. y Baeza Camacho, R. 2002. Artículo de revisión. La grasa visceral y su importancia en obesidad. *Revista de Endocrinología y Nutrición.* 10 (3): 121-127.
- Granados, H. y Hoth, J. 1989. Estudios sobre la biología del ratón de los volcanes (*Neotomodon alstoni alstoni*). XVI. Comparación de la capacidad reproductora de hembras silvestres en el laboratorio, siguiendo tres sistemas de apareamiento. *Arch. Invest. Méd. (Méx)* 20: 95-105.



- 📖 Granados, H., Luis, J., Carmona, A., Espinosa, G., and Arenas, T. 1996. Aggressive behavior of the male volcano mouse *Neotomodon alstoni* (Rodentia: Cricetidae). *Rev. Biol. Trop.* 44(2B): 861-865.
- 📖 Grundy, S. M. 2005. A constellation of complications: the metabolic syndrome. *Clin. Cornerstone.* 7(2-3): 36-45.
- 📖 Harsch, I. A., Konturek, P. C., Koebnick, C., Kuehnlein, P. P., Fuchs, F. S., Pour Schahin, S., Wiest, G. H., Hahn, E. G., Lohmann, T. and Ficker, J. H. 2003. Leptin and ghrelin levels in patients with obstructive sleep apnoea: Effect of CPAP treatment. *Eur. Resp. J.* 22: 251–257.
- 📖 Heideman, P. D. 2004. Top-down approaches to the study of natural variation in complex physiological pathways using the white-footed mouse (*Peromyscus leucopus*) as a model. *Ilar J.* 45(1): 4–13
- 📖 Jenkins, J. B., Omori, T., Guan, Z., Vgontzas, A. N., Bixler, E. O., Fang, J. 2005. Sleep is increased in mice with obesity induced by high-fat food. *Physiol. Behav.* 87: 255-262.
- 📖 Jéquier, E. 2002. Leptin Signaling, Adiposity, and Energy Balance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 967: 379-388.
- 📖 Jessop, D. S., Dallman, M. F., Fleming, D. and Lightman, S. L. 2001. Resistance to Glucocorticoid Feedback in Obesity. *J.Clin.Endocrinol. & Metab.* 86(9): 4109-4114.
- 📖 Kalsbeek, A., Fliers, E., Romijn, J. A., La Fleur, S. E., Wortel, J., Bakker, O., Endert, E. and Buijs, R. M. 2001. The Suprachiasmatic Nucleus Generates the Diurnal Changes in Plasma Leptin Levels. *Endocrinology.* 142 (6): 2677-2685.
- 📖 Krugner-Higby, L., Shadoan, M., Carlson, C., Gendron, A., Cofta, P., Merler, C. and Wagner, J. 2000. Type 2 Diabetes Mellitus, Hyperlipidemia, and Extremity Lesions in California Mice (*Peromyscus californicus*) Fed Commercial Mouse Diets. *Comparative Medicine. American Association for Laboratory Animal Science.* 50(4): 412-418.
- 📖 La Fleur, S. E, Kalsbeek, A., Wortel and Buijs R. M. 1999. A Suprachiasmatic Nucleus Generated Rhythm In Basal Glucose Concentrations. *J. Neuroendocrino.* 11: 643-652.
- 📖 La Fleur, S. E., Kalsbeek, A., Wortel J., van der Vilet, J. and Buijs R. M. 2001. Role for the Pineal and Melatonin in Glucose Homeostasis: Pinealectomy Increases Night-Time Glucose Concentrations. *J. Neuroendocrino.* 13: 1025-1032.
- 📖 Lanza-Jacoby, S., Stevenson, N. R., and Kaplan, M. L. 1986. Circadian Changes in Serum and Liver Metabolites and Liver Lipogenic Enzymes in Ad Libitum- and Meal-Fed, Lean and Obese Zucker Rats. *J. Nut.* 116: 1798-1809.

- 📖 Laposky, A. D., Shelton, J., Bass, J., Dugovic, Ch., Perrino, N., Turek, F. W. 2006. Altered sleep regulation in leptin deficient mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 290: R894-R903.
- 📖 Leal-Cerro, A., Soto, A., Martínez, M. A., Dieguez, C. and Casanueva, F. F. 2001. Influence of Cortisol Status on Leptin Secretion. *Pituitary.* 4:111-116.
- 📖 López-Alarcón, M. G y Rodríguez-Cruz, M. 2008. Epidemiología y genética del sobrepeso y la obesidad. Perspectiva de México en el contexto mundial. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* 65: 421-430.
- 📖 López Urbán, A. I. 2007. Variaciones diarias y circadianas del metabolismo de la glucosa en el ratón de los volcanes *Neotomodon alstoni alstoni*: Diferencias entre organismos normales y obesos. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias, UNAM. 64 p.
- 📖 Luis, J., Carmona, A., Delgado, J., Cervantes, F. A. and Cárdenas, R. 2000. Parental behavior of the Volcano mouse *Neotomodon alstoni* (Rodentia:Muridae), in captivity. *J. Mammal.* 81(2): 600-605.
- 📖 Luis, J., Cervantes, F. A., Martínez-Torres, M., Cárdenas, R., Delgado, J. and Carmona, A. 2004. Male influence on maternal behavior and offspring of captive Volcano mice (*Neotomodon alstoni*) from México. *J. Mammal.* 85(2): 268-272.
- 📖 Luis, J., Ramirez, L., Carmona, A., Ortiz, G., Delgado, J., Cárdenas, R. 2009. Paternal behavior and testosterone plasma levels in the Volcano Mouse *Neotomodon alstoni* (Rodentia: Muridae). *Rev. Biol. Trop.* 57 (1-2): 433-439.
- 📖 Luis-Díaz, J., Cárdenas-Vázquez, R., Villalpando-Fierro, I., Martínez-Torres, M., Merchant, H. 2008. Follicular development in the volcano mouse (*Neotomodon alstoni alstoni*, Rodentia: Muridae) from birth to maturity: A morphological approach. *Acta Zoologica.* 89 (3): 185–192.
- 📖 Macías, H., Pasapera, A. M., Pérez-Solis, M. A., Ulloa-Aguirre, A., Gutiérrez-Sagal, R. 2004. cDNA sequence, 5'-flanking region, and promoter activity of the *Neotomodon alstoni alstoni* Clara cell secretory protein gene. *Arch. Biochem. Biophys.* 427(2):170-179.
- 📖 Maquet, P. 2001. The Role of Sleep in Learning and Memory. *Science.* 294: 1048-1052.
- 📖 Martínez-Merlos, T., Cañedo-Merino, R., Díaz-Muñoz, M. 1997. Ryanodine receptor binding constants in skeletal muscle, heart, brain and liver of the Mexican volcano mouse (*Neotomodon alstoni alstoni*; Rodentia:Cricetidae). Comparison with five other rodent species. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 29(3): 529-539.

- 📖 Megirian, D., Dmochowski, J., Farkas, G. A. 1998. Mechanism controlling sleep organization of the obese Zucker rats. *Appl. Physiol.* 84: 253-256.
- 📖 Merl, V., Peters, A., Oltmanns, K. M., Kern, W., Hubold, C., Hallschmid, M., Born, J., Fehm, H.L. and Schultes, B. 2004. Preserved Circadian Rhythms of Serum Concentration at Low Plasma Glucose During Fasting in Lean and Overweight Humans. *Metabolism.* 53 (11): 1449-14453.
- 📖 Milagro, F., y Marques-Lopes, I. 2002. Sistema nervioso y obesidad. *ANALES Sis San Navarra.* 25 (Supl. 1): 41-52.
- 📖 Montes-Rodríguez, C. J., Rueda-Orozco, P. E., Urteaga-Urías, E., Aguilar-Roblero, R. y Prospero-García, O. 2006. De la restauración neuronal a la reorganización de los circuitos neuronales: una aproximación a las funciones del sueño. *Rev. Neurol.* 43(7): 409-415.
- 📖 Monteverde, M., Noronha, K., Palloni, A and Novak, B. 2010. Obesity and excess mortality among the elderly in the United States and Mexico. *Demography.* 47 (1): 79-96.
- 📖 Mori, T., Nagai, K., Hara, M. and Nakagawa. 1985. Time-dependent effect of insulin in suprachiasmatic nucleus on blood glucose. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol.* 249: 23-30.
- 📖 Pasquali, R., Vicennati, V., Cacciari, M. and Pagotto, U. 2006. The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Obesity and the Metabolic Syndrome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1083: 111-128.
- 📖 Pérez-Solis, M. A., Macías, H., Acosta-Montesdeoca, A., Pasapera, A. M., Fierro, R., Ulloa-Aguirre, A., Gutiérrez-Sagal, R. 2010. Molecular cloning and functional analysis of the FSH receptor gene promoter from the volcano mouse (*Neotomodon alstoni alstoni*). *Endocrine.* 37(1):98-105.
- 📖 Piccione, G., Bertolucci, C., Foa, A. and Caola, G. 2004. Influence of Fasting and Exercise on the Daily Rhythm of Serum Leptin in the Horse. *Chronobiol. Interl.* 21(3): 405-417.
- 📖 Prinz, P. 2004. Perspectives. Sleep, Appetite and Obesity-What Is the link?. *PLoS Med.* 1(3): e56-e61.
- 📖 *Chapter 27. Sleep and Wakefulness.* En: Purves, D., Augustine, G. L., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., LaMantia, A., McNamara, J. O., Williams, S. (eds). 2004. *Neuroscience.* 3<sup>th</sup> ed. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA U.S.A. pp. 659-685.
- 📖 Ramsey, K., Marcheva, B., Kohsaka, A., Bass, J. 2007. The Clockwork of Metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* E pub. Apr 12.

- 📖 Rivera, J. A., Barquera, S., González-Cossío, T., Olaiz, G. and Sepúlveda, J. 2004. Nutrition Transition in Mexico and in Other Latin American Countries. *Nut. Rev.* 62 (7): S149-S157.
- 📖 Rodríguez Romero, F., 1974. Estudios citogenéticos en *Neotomodon alstoni perotensis*, Merriam 1898. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias, UNAM. 39 pp.
- 📖 Ruitter, M., La Fleur, S. E., Heijningen, C., Vliet, J., Kalsbeek, A., Buijs, R. M. 2003. The Daily Rhythm in Plasma Glucagon Concentrations in the Rat Is Modulated by the Biological Clock and by Feeding Behavior. *Diabetes.* 52: 1709-1715.
- 📖 Sakurai, T. 2006. Roles of orexins and orexin receptors in central regulation of feeding behavior and energy homeostasis. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 5(3): 313-325.
- 📖 Schoeller, D. A., Cella, L. K., Sinha, M.K., Caro, J. F. 1997. Entrainment of the diurnal rhythm of plasma leptin to meal timing. *J. Clin. Invest.* 100: 1882–1887.
- 📖 Shulman, G. I. 2000. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 106 (2): 171-176.
- 📖 Sietse, J., Koopmansa, T., Jan, M., Ruud D., Henk C., Zdzislaw M. 2005. Diurnal rhythms in plasma cortisol, insulin, glucose, lactate and urea in pigs fed identical meals at 12-hourly intervals. *Physiol. Behav.* 84: 497-503.
- 📖 Spiegel, K., Knutson, K., Leproult, R., Tasali, E. and Van Cauter, E. 2005. Sleep loss: a novel risk factor for insulin resistance and Type 2 diabetes. *J. Appl. Physiol.* 99: 2008-2019.
- 📖 Taheri, S., Lin, L., Austin, D., Young, T. and Mignot, E. 2004. Short Sleep Duration Is Associated with Reduced Leptin, Elevated Ghrelin, and Increased Body Mass Index. *PLoS Med.* 1 (3): 210-217.
- 📖 Trenell, M. I., Marshall, N.S., Rogers, N. L. 2007. Sleep and metabolic control: waking to a problem?. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 34: 1-9.
- 📖 Turek, F. W., Joshu, C., Koshaka, A., Lin, E., Ivanova, G., McDearmon, E., Laposky, A., Losee-Olson, S., Easton, A., Jensen, D. R., Eckel, R. H., Takahasi, J. S., Bass, J. 2005. Obesity and metabolic syndrome in circadian clock mutant mice. *Science.* 308: 1043-1045.
- 📖 Van Cauter, E., Blackman, J. D., Roland, D., Spire, J., Refetoff, S. and Polonsky, K. S., 1991. Modulation of Glucose Regulation and Insulin Secretion by Circadian Rhythmicity and Sleep. *J. Clin. Invest.* 88: 934-942.

- 📖 Van Cauter, E. and Knutson, K.L. 2008. Sleep and the epidemic of obesity in children and adults. *European J. Endocrinol.* 159: S59-S66.
- 📖 Villa A. R., Escobedo M. H., Méndez-Sánchez, N. 2004. Estimates and trends of obesity prevalence though mortality rates associated of chronic diseases in Mexico. *Gac. Med. Mex.* 140: s 21-25.
- 📖 Villalpando, I., H. Villafan-Monroy, D. Aguayo, A. Zepeda-Rodriguez, H. Granados-Espitia. 2000. Ultrastructure and motility of the caudal epididymis spermatozoa from the volcano mouse (*Neotomodon alstoni alstoni*, Merriam, 1898). *J. Exp. Zool.* 287(4): 316-326.
- 📖 Villapando, I., Ramírez, M., Zepeda-Rodríguez, A., Castro, A.C., Cárdenas-Vázquez, R., Vilchis, F. 2005. The Harderian gland of the Mexican volcano mouse *Neotomodon alstoni alstoni* (Merriam 1898): a morphological and biochemical approach. *J. Exp. Zool. A Comp. Exp. Biol.* 303(1):13-25.
- 📖 World Health Organization (WHO). 2006. "Obesidad y sobrepeso". Disponible en línea en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/print.html>.
- 📖 Williams, D. L., Schwartz, M. W. 2005. Out of synch: Clock mutation causes obesity in mice. *Cell Metabolism.* 1: 355-357.
- 📖 Wolk, R. y Somers, V. K. 2007. Sleep and the metabolic syndrome. *Exp. Physiol.* 92(1): 67-78.
- 📖 Zambrano, E., Martínez-Samayoa, P. M., Rodríguez-González, G. L. and Nathanielsz, P. W. 2010. Dietary intervention prior to pregnancy reverses metabolic programming in male offspring of obese rats. *J. Physiol.* 588(10): 1791-1799.
- 📖 Zhang, E.E. and Kay, S.A. 2010. Circadian not winding down: unravelling circadian networks. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology.* 11: 764-776.
- 📖 Zvonik, S., Floyd, Z. E., Mynatt, R. L., Gimble, J. M. 2007. Circadian rhythms and the regulation of metabolic Tissue Function and Energy Homeostasis. *Obesity.* 15(3) 539-543.