



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOMÉDICAS**

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**VARIACIONES EN LA CAPACIDAD DE
SINCRONIZACIÓN NO PARAMÉTRICA
PRODUCIDAS POR LA OBESIDAD, EN EL
RÍTMO DE ACTIVIDAD LOCOMOTRIZ
EN EL RATÓN DE LOS VOLCANES**

Neotomodon alstoni

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A

BIOL. VANIA PATRICIA CARMONA ALCOCER

DIRECTOR DE TESIS:

DR. MANUEL MIRANDA ANAYA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR: DRA. LI MEI ZHANG

DR. MAURICIO DÍAZ MUÑOZ

MÉXICO, D.F.

JUNIO, 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A mis padres, Patricia Alcocer Villanueva y Carlos Carmona Rosales por su apoyo incondicional, confianza, amistad y amor.

A mis amigos por andar este camino junto a mí, por escucharme, por las risas y complicidades, pero sobre todo por ofrecerme un puerto para respirar profundo, levantarme y continuar.

En la vida conoces personas que hacen camino contigo, de otras te llevas grandes lecciones de vida pero existen otras que se vuelven símbolo, con ellas aprendes cosas sobre ti mismo. A el pintor Oscar Rodríguez Enríquez, por todos los barcos de papel y los hipopótamos de colores.

AGRADECIMIENTOS

A el Dr, Manuel Miranda Anaya, por ser un tutor y un amigo. Por mostrarme el mundo de la cronobiología y por sus valiosos consejos a lo largo de mi trayectoria académica.

Al posgrado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por contribuir en mi formación académica y profesional.

Al Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme el apoyo económico y facilidades para realizar mis estudios de Posgrado (Clave de Becario: 194977).

Al M. en C. Agustín Carmona por su trabajo en el establecimiento de la colonia F1 de el ratón de los volcanes *N. Alstoni*.

A el Laboratorio de Microscopia Electrónica de la Facultad de Ciencias, UNAM; en especial a la Dra. Rosario Ortíz Hernández, por las facilidades otorgadas para la obtención de las muestras histológicas.

A el Laboratorio de Microcine de la Facultad de Ciencias, UNAM; en especial a la M. en C. Ana Isabel Bieler Antolín, por su ayuda en la obtención de las microfotografías.

A todos los investigadores que han contribuido en mi formación y en el desarrollo de estas tesis, en particular a los miembros de mi comité tutorial: Dra. Limei Zhang y Dr. Mauricio Díaz Muñoz, por su orientación durante el desarrollo y conclusión de este trabajo.

A los miembros de jurado: Dra. Marcia Hiriart Urdinavia, Dr. Manuel Miranda Anaya, Dr. Rudolf Marinus Buijs, Dra. Ivette Caldelas Sánchez y Dr. Iván Villanueva Becerril por las observaciones que contribuyeron a fortalecer este trabajo.

ÍNDICE

	PÁGINAS
I. ESTRUCTURA DE LA TESIS.....	1
II. RESUMEN.....	3
III. ABRSTRACT.....	5
IV. GLOSARIO DE ABREVIATURAS.....	6
CAPITULO 1: LA OBESIDAD Y SU RELACIÓN CON EL SISTEMA CIRCADIANO.....	10
OBESIDAD.....	10
Control de la ingesta de alimento.....	11
Adipogénesis.....	13
Termogénesis.....	14
LOS RITMOS CIRCADIANOS.....	15
Sistema circadiano.....	16
<u>El marcapasos</u>	17
<u>Vías de entrada</u>	18
<u>Vías de salida</u>	19
Mecanismos moleculares de la oscilación circadiana.....	20
RITMOS CIRCADIANOS EN EL METABOLIMO.....	21
EFFECTOS DEL METABOLISMO SOBRE EL SISTEMA CIRCADIANO.....	23
NEOTOMODON ALSTONI COMO MODELOS DE OBESIDAD...	25

CAPITULO2: EFECTOS DE LA OBESIDAD SOBRE EL RTIMO CIRCADIANO DE ACTIVIDAD LOCOMOTRIZ.....	28
OSCILACION ESPONTÁNEA O LIBRE CURSO.....	28
SINCRONIZACIÓN.....	29
Relación de fase.....	30
VARIACIONES INTERINDIVIDUALES.....	29
<u>Edad</u>	29
<u>Obesidad</u>	31
HIPÓTESIS.....	32
OBEJTIVO.....	32
Objetivos particulares.....	32
MATERIAL Y MÉTODO.....	33
Obtención y mantenimiento de los animales.....	33
<u>Ratones <i>N. alstoni</i> silvestres</u>	33
<u>Ratones <i>N. alstoni</i> F1</u>	34
Sistema para el registro de actividad locomotriz.....	34
Protocolo experimental.....	35
Análisis de Resultados.....	36
<u>Sincronización</u>	36
<u>Oscilación espontánea</u>	37
RESULTADOS.....	38
Peso y consumo de alimento.....	38
Sincronización a ciclos LO 12:12.....	39
Oscilación espontánea.....	44

DISCUSIÓN.....	48
CAPITULO 3: EFECTOS DE LA OBESIDAD SOBRE LA CAPACIDAD DE SINCRONIZACIÓN NO PARAMÉTRICA.....	53
MODELOS DE SINCRONIZACIÓN.....	53
Sincronización Paramétrica.....	53
Sincronización no Paramétrica.....	53
LA CURVA DE RESPUESTA DE FASE (CRF).....	54
Construcción de la CRF.....	55
Características de la CRF.....	56
MECANISMOS DE SINCRONIZACIÓN A LA LUZ.....	57
Señalización intracelular en la sincronización a la luz.....	58
Inducción de genes en el NSQ por pulso de luz.....	60
EFFECTOS DE LAS SEÑALES METABOLICAS SOBRE EL NSQ Y LA CRF.....	61
HIPÓTESIS.....	61
OBJETIVO GENERAL.....	62
Objetivos particulares.....	62
MATERIAL Y MÉTODO.....	62
Protocolo experimental.....	62
<u>Curva de Respuesta de Fase (CRF)</u>	62
<u>Inmunohistoquímica</u>	63
Análisis de resultados.....	65
<u>Efectos de un pulso de luz sobre el ritmo circadiano de actividad locomotriz</u>	65

	<u>Efectos de un pulso de luz sobre la expresión de c-Fos en el NSQ</u>	66
	RESULTADOS	67
	Tejido adiposo visceral.....	67
	Efectos de un pulso de luz sobre el ritmo circadiano de actividad locomotriz.....	67
	Efectos de un pulso de luz sobre la expresión de c-Fos en el NSQ.....	71
	DISCUSIÓN	74
CAPITULO 4:	CONCLUSIONES	78
V	BIBLIOGRAFÍA	80
	ANEXO 1: ARTÍCULO PUBLICADO	101
<p>Carmona-Alcocer, V., Fuentes-Granados, C., Carmona-Castro, A., Aguilar-González, I., Cárdenas-Vázquez, R., & Miranda-Anaya, M. (2012). Obesity alters circadian behavior and metabolism in sex dependent manner in the volcano mouse <i>Neotomodon alstoni</i>. <i>Physiology & Behavior</i>, 105(3), 727-33.</p>		
VI.	ANEXO 2: MICROFOTOGRAFÍAS DE VIP	110
VII.	ANEXO 3: MICROFOTOGRAFÍAS DE VIPR2	111

I. ESTRUCTURA DE LA TESIS

Esta tesis doctoral se encuentra organizada en 4 capítulos.

En el **capítulo 1: Obesidad y su relación con el sistema circadiano** se realiza una descripción de las principales causas que generan obesidad. Por otra parte, se explican las propiedades de las oscilaciones circadianas, así como del sistema fisiológico encargado de generar los ritmos en mamíferos (sistema circadiano). Posteriormente, se plantea la relación bilateral entre los procesos metabólicos y el sistema circadiano y como alteraciones en cualquiera de estos, pueden llevar al desarrollo de un fenotipo obeso. Finalmente se habla sobre las características que han llevado a proponer al *Neotomodon alstoni* como un modelo de obesidad.

Los Capítulos 2 y 3 están enfocados al desarrollo experimental de este trabajo. En cada uno de ellos se puntualiza la información teórica que respalda los experimentos; así como, la hipótesis, objetivos, métodos utilizados. Finalmente, se da una descripción y discusión de los resultados obtenidos.

De manera particular el **capítulo 2: Efectos de la obesidad sobre el ritmo circadiano de actividad locomotriz** trata temas como el carácter endógeno de los ritmos biológicos y la capacidad de ajustarse a señales ambientales cíclicas (sincronización). Así como, las alteraciones de estas dos características en diversos modelos de obesidad. Este capítulo, contiene la parte experimental que corresponde a las alteraciones que animales obesos de la especie *Neotomodon alstoni* presentan en el ritmo circadiano de actividad locomotriz y en la capacidad de ajustarse a los ciclos de luz-oscuridad.

Por su parte, el **capítulo 3: Efectos de la obesidad sobre la capacidad de sincronización no paramétrica a la luz**, habla sobre los modelos de sincronización. En particular se abordan las características de la curva de respuesta de fase (CRF), la forma en la que los mamíferos perciben la luz y las cascadas de señalización intracelular que llevan a un cambio en la expresión de los genes involucrados en generar la ritmicidad circadiana. Así, el capítulo 3 contiene la parte experimental que corresponde a los efectos de la obesidad en *N. alstoni*, sobre la capacidad de los ritmos de actividad locomotriz para responder a un pulso de

luz y los efectos sobre la fotoinducción en la expresión de la proteína c-Fos en el núcleo supraquiasmático (NSQ).

Finalmente el **capítulo 4: Conclusiones generales**, presenta las conclusiones a las que se llegó durante este proyecto de investigación, así como un panorama general de los temas que quedan por abordar.

II. RESUMEN

La obesidad es uno de los principales problemas de salud que enfrenta la humanidad y un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, síndrome metabólico (SM) y diabetes mellitus tipo 2. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2008 existían aproximadamente 1500 millones de adultos con sobrepeso. En la actualidad, el problema de obesidad se ha incrementado como resultado de una alta disponibilidad de alimentos ricos en carbohidratos y grasas, así como una disminución en la actividad física.

Recientemente se ha demostrado que la obesidad puede afectar el funcionamiento del sistema circadiano. En este sentido el ratón de los volcanes, *Neotomodon alstoni*, es una especie interesante ya que presenta ritmos circadianos de actividad locomotriz claros, sin necesidad del uso de rueda de actividad. Además, bajo condiciones de cautiverio (en confinamiento y dieta estándar), el 60% de los individuos silvestres desarrolla obesidad y síntomas relacionados con el SM como hiperleptinemia e hiperinsulinemia. Por lo anterior, *N. alstoni* puede ser un buen modelo para estudiar la relación entre la obesidad y sus efectos en el sistema circadiano.

Así, el objetivo de este trabajo fue conocer los efectos de la obesidad sobre los ritmos de actividad locomotriz y sobre la capacidad del sistema circadiano para responder a señales ambientales como la luz, en la especie *N. alstoni*.

Los resultados muestran que el ritmo de actividad locomotriz en animales obesos presenta menor actividad durante la fase de oscuridad y un alargamiento del periodo endógeno en condiciones de oscuridad constante. Además, la obesidad conlleva una reducción en la magnitud de los retrasos y un aumento en los avances de fase del ritmo de actividad, ante un estímulo luminoso. Sin embargo, las alteraciones en la sensibilidad a la luz en animales obesos no se relacionaron con cambios en la fotoinducción de la proteína c-Fos en el núcleo supraquiasmático (NSQ), lo que nos lleva a suponer que la vía de entrada a luz se encuentra funcionando correctamente y que son otros mecanismos los que en el estado de obesidad cambian la respuesta del sistema circadiano a la luz. Estudios preliminares muestran una reducción en la expresión del receptor VPAC2 (receptor tipo 2 de VIP -péptido intestinal vasoactivo- y PACAP -péptido activador de la adenilato ciclasa-) en el NSQ, el cual participa en el acoplamiento entre las neuronas del NSQ y puede modular los cambios de fase inducidos

por luz; por lo que la obesidad en *N. alstoni* podría estar afectando un mecanismo de modulación neuronal en esta estructura.

Podemos concluir que la condición de obesidad en *N. alstoni*, afecta los ritmos circadianos de actividad locomotriz y su capacidad de responder a la luz, que es una de las señales ambientales cíclicas más importantes, además evidencias como una mayor frecuencia de periodos largos, el cambio de la respuesta a pulsos de luz en direcciones diferentes dependiendo del tiempo de aplicación del estímulo, así como los datos preliminares que indican una disminución en la expresión del receptor VPAC2, nos llevan a proponer que la obesidad puede alterar los mecanismos de acoplamiento entre las células del NSQ.

III. ABSTRACT

Obesity has become one of the major health risks for the human population. Multiple metabolic abnormalities that contribute to cardiovascular disease, metabolic syndrome (MS) and diabetes mellitus are induced by obesity. In 2008 the World Health Organization (WHO) reported that 1.5 billion adults were overweight due to a high availability of high energy food supplies and a reduction of physical activity.

Recent studies have linked changes in circadian regulation with the generation of obesity. The volcano mice *Neotomodon alstoni* has been used as model of circadian rhythms due to their clear locomotor activity in a non-wheel running environment. When kept in captivity, 60% of the volcano mice show an increase in bodyweight and signs of metabolic syndrome, such as hyperleptinemia and hyperinsulinemia, even when fed regular rodent chow. These features make the volcano mice a good model for studying the relationship between circadian clocks and metabolic disorders.

The aim of the present work was to explore the changes in the free running circadian rhythm of locomotor activity and the phase response of the circadian system to light pulses, in overweight *N. alstoni* mice.

Our results indicate that the obese mice have a reduction in their nocturnal activity and an enlargement of the free-running period. Obese mice also showed alterations in photic resetting, as shorter delays and larger advances in the phase-response curve of circadian locomotor activity. These changes did not correlate with changes in the photic induction of the c-Fos protein in the suprachiasmatic nucleus (SCN). These results indicate that the light input to the SCN is not affected in obese mice and suggest that the effects observed in the locomotor activity could be due to alterations in the modulation of the light response. In this context, preliminary studies have shown that the obese mice have reduced SCN expression of the VPAC2, a receptor that mediates coupling between neurons in the SCN.

The results of the present work provide evidence that obesity in *N. alstoni* affects the circadian system by inducing changes in the integration of the light input and the modulation of the response within the SCN.

IV. GLOSARIO DE ABREVIATURAS

2-DG	2 –desoxi-D-glucosa
3V	Tercer ventrículo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AgRP	Proteína relacionada con el agutí
ARC	Núcleo arqueado
BFC	Bioterio de la Facultad de Ciencias
Bmal1	Gen que codifica para la proteína ANRT del musculo y cerebro
CaMKs	Calmodulinas dependientes de calcio
CART	Transcripto regulado por la cocaína y anfetamina
CCK	Colecistocinina
CKIδ	Caseína cinasa I delta
CKIϵ	Caseína cinasa I épsilon
Clock	Gen cuya falta elimina el ritmo circadiano de actividad locomotriz
CREB	Elemento de unión en respuesta a AMPc
CRF	Curva de respuesta de fase
Cry	Gen que codifica para los criptocromos
DMH	Hipotálamo dorsomedial
ERK	Cinasas reguladas por señales extracelulares
F1	Animales nacidos en bioterio hijos de padres silvestres
F-D	Animales F1 delgados
F-O	Animales F1 obesos
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GLP1	Péptido similar al glucagon
GLUT2	Transportador de glucosa tipo 2
GMP	

<i>IGL</i>	Hojuela intergeniculada
<i>IL</i>	Corteza infralímbica
<i>LGN</i>	Cuerpo geniculado lateral del tálamo
<i>LHA</i>	Área hipotalámica lateral
<i>LS</i>	Septum lateral
<i>LO</i>	Ciclos de luz-oscuridad
<i>MC4R</i>	Receptores estimulados por AgRP e inhibidos por MSH
<i>MRN</i>	Núcleo medio del rafé
<i>NAD+</i>	Nicotinamida adenina dinucleótido forma oxidada
<i>NADH</i>	Nicotinamida adenina dinucleótido forma reducida
<i>NADP</i>	Nicotinamida adenina dinucleótido-fosfato forma oxidada
<i>NADPH</i>	Nicotinamida adenina dinucleótido-fosfato forma reducida
<i>NMDA</i>	N-metil D-aspartato
<i>NO</i>	Óxido nítrico
<i>NOS</i>	Óxido nítrico sintetasa
<i>NPY</i>	Neuropéptido-Y
<i>NSQ</i>	Núcleo supraquiasmático
<i>OMS</i>	Organización Mundial de la Salud
<i>OO</i>	Oscuridad constante
<i>PACAP</i>	Péptido hipofisiario activador de la adenilato ciclasa
<i>Per</i>	Gen de periodo
<i>PFA</i>	Área perifornical
<i>PK2</i>	Procineticina-2
<i>PKG</i>	Proteína cinasa G
<i>POMC</i>	Pro-opio-melanocortina
<i>PYY</i>	Péptido YY
<i>PT</i>	Núcleo pretectal
<i>PVN</i>	Núcleo paraventricular del hipotálamo

<i>PVT</i>	Núcleo paraventricular del tálamo
<i>r</i>	Índice de la actividad en el día entre la actividad en la noche (α/ϱ)
<i>Rev-erbα</i>	Gen que codifica para el factor α de transcripción reversa del virus de eritoblastosis
<i>RRE</i>	Elemento de respuesta a ROR
<i>RyR</i>	Canales de rianodina
<i>S-D</i>	Animales silvestres delgados
<i>SM</i>	Síndrome metabólico
<i>S-O</i>	Animales silvestres obesos
<i>SPVZ</i>	Zona subparaventricular del hipotálamo
<i>Tau</i> (τ)	Periodo de un ritmo en condiciones constantes
<i>TC</i>	Tiempo Circadiano
<i>TGFα</i>	Factor transformador de crecimiento alfa
<i>TRH</i>	Tracto retinohipotalámico
<i>UCPs</i>	Proteínas desacoplantes
<i>VIP</i>	Péptido intestinal vasoactivo
<i>VMH</i>	Hipotálamo ventromedial
<i>VP</i>	Vasopresina
<i>VPAC2</i>	Receptor tipo 2 de VIP y PACAP
α	Actividad en el día
αMSH	Hormona estimulante de los melanocitos
$\Delta\Phi$	Cambio de fase
ϱ	Actividad en reposo
<i>T</i>	Periodo del ciclo ambiental
φ	Fase del ritmo endógeno
Φ	Fase del sincronizador
ΦE	Inicio de actividad locomotriz
ΦM	Final de la actividad locomotriz

ΦT Apagado de la luz

Ψ Relación de fase

CAPITULO 1: LA OBESIDAD Y SU RELACIÓN CON EL SISTEMA CIRCADIANO

OBESIDAD

La generalidad de los animales posee la capacidad de almacenar energía en forma de depósitos intracorporales de combustibles metabólicos. El comer una cantidad de alimentos que provean mayor energía a la necesaria para cubrir los gastos energéticos diarios, es una estrategia adaptativa para enfrentar los periodos de inanición. Sin embargo esta capacidad para almacenar energía en forma de grasa se ha convertido en uno de los principales problemas de salud para los humanos, debido a una alta disponibilidad de alimento, a una mayor concentración de energía en los alimentos disponibles y a una disminución en la actividad física (Berthoud & Morrison, 2008; Hill, 2006).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el 2008 existían aproximadamente 1600 millones de adultos con sobrepeso, cifra que podría alcanzar los 2300 millones de personas para el año 2015 y más de 700 millones con obesidad (OMS, 2011). Así, la obesidad representa uno de los principales problemas de salud en el mundo (Hill, 2006); mientras que en nuestro país, las enfermedades relacionadas con este padecimiento se encuentran entre las principales causas de mortalidad (Villa et al., 2004).

Actualmente se desconocen las causas definitivas que ocasionan la obesidad, sin embargo esta es considerada una condición que está ligada a factores conductuales, ambientales, nutricionales y genéticos, los cuales favorecen un balance energético positivo derivado de un incremento en la ingesta de alimento, un decremento en el gasto energético o una combinación de ambos (Grundy, 1998; Hofbauer, 2002; Speakman, 2004). Este desequilibrio entre el gasto y consumo de energía lleva a un aumento en la acumulación de grasas por un crecimiento en el tamaño de los adipocitos (hipertrofia) o en el número de los mismos (hiperplasia) (Garruti et al., 2008). Sin embargo, en algunos casos este tejido es incapaz de contener el exceso de energía, exponiendo al resto de los tejidos a un exceso de nutrientes, lo cual es un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, síndrome metabólico (SM) y diabetes tipo 2 (Grundy, 1998; 2005; Speakman, 2004).

Generalizando, se puede decir que los principales factores responsables de la regulación del peso corporal son: la ingesta de alimento, la adipogénesis y el gasto energético (Hofbauer, 2002; Woods et al, 1998). Así, alteraciones en el sistema que regula la ingesta de alimento (Berthoud & Morrison, 2008; Wynne et al., 2005), un incremento en la adipogénesis (Bays et al., 2008; Morrison & Farmer, 1999) o una deficiencia en la termogénesis (Dulloo Jacquet, 2001; Schoeller, 2001) pueden llevar al desarrollo de un fenotipo obeso.

Control de la ingesta de alimento

Un factor fundamental para el desarrollo de la obesidad es la alta disponibilidad de alimento, por lo cual es importante entender la forma en la que se regula la ingesta del mismo. Diversas regiones del cerebro están involucradas en el control de la alimentación. De ellas, la que origina las señales que luego son enviadas e integradas en otras regiones es el núcleo arqueado del hipotálamo (ARC; Fig. 1.1).

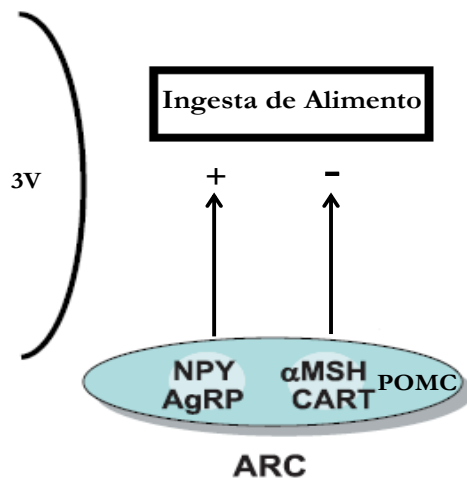


Figura 1.1. Poblaciones neuronales que regulan la ingesta de alimento en el núcleo arqueado (ARC). Tercer ventrículo (3V). Neuropéptido-Y (NPY). Proteína relacionada con el agutí (AgRP). Transcripto regulado por la cocaína y anfetamina (CART). Pro-opio-melanocortina (POMC). Hormona estimulante de los melanocitos (α -MSH).

Existen dos poblaciones neuronales en el ARC que reciben y hacen la primera integración de las señales sobre el estado nutricional del organismo (Berthoud & Morrison, 2008; Wynne et al., 2005). Uno de estos circuitos inhibe la ingesta de alimento a través de la expresión de neuropéptidos como la pro-opio-melanocortina (POMC) y el transcrito regulado por la cocaína y anfetamina (CART) (Elias et al., 1998; Kristensen et al., 1998). El otro circuito estimula la ingesta de alimento a través de la expresión del neuropéptido-Y (NPY) y la proteína relacionada con el agutí (AgRP) (Broberger et al., 1998; Hahn et al., 1998). Se ha demostrado que lesiones en las neuronas de NPY y AgRP llevan a hipofagia y pérdida de peso corporal (Gropp et al., 2005; Luquet et al., 2005), mientras que la sobreexpresión de AgRP o la administración de agonistas inducen un fenotipo obeso que presenta hiperfagia (Hagan et al., 2000; Ollmann et al., 1997). Por otra parte, mutaciones en POMC están asociadas al desarrollo de un fenotipo obeso (Challis et al., 2004; Yaswen et al., 1999).

Por su parte el ARC envía información a través de sus proyecciones neuronales hacia el núcleo paraventricular (PVN), el hipotálamo dorsomedial (DMH), el área hipotalámica lateral (LHA) y el área periforniacal (PFA), los cuales procesan información sobre la homeostasis energética. Estudios con lesiones han demostrado, que la destrucción del PVN y el hipotálamo ventromedial (VMH) causa obesidad, mientras que la ablación del LHA causa anorexia (Berthoud & Morrison, 2008; Wynne et al., 2005). Por su parte, cuando se administra antagonistas de melanocortina en el PVN o agonistas en el DMH, se presenta hiperfagia (Chen et al., 2004; Giraud et al., 1998). Además, estas estructuras tienen receptores para AgRP y hormona estimulante de los melanocitos (α -MSH). La deficiencia en los receptores de α -MSH (MC4R), ocasionan obesidad, hiperfagia e hiperglicemia (Fan et al., 1997; Huang et al., 2003; Huszar et al., 1997). Otros péptidos que pueden inhibir la ingesta de alimento son el péptido activador de la adenilato ciclasa (PACAP) y péptido intestinal vasoactivo (VIP) (Chance et al., 1995; Mizuno et al., 1998).

Ciertas señales de origen periférico, particularmente las hormonas leptina, insulina, péptido YY (PYY), péptido similar al glucagon tipo 1 (GLP1) y colecistocinina (CCK) pueden inhibir el consumo de alimento, mientras que la ghrelina lo incrementa. Estas señales periféricas proveen información al sistema nervioso para el control de la ingesta de alimento. Por ejemplo, la leptina e insulina reducen el consumo de alimento, al actuar sobre el ARC reduciendo la expresión de NPY y AgRP en sus neuronas orexigénicas y estimulando al mismo

tiempo las neuronas anorexigénicas que expresan POMC y CART; éstas promueven la secreción de α -MSH, lo cual lleva a una inhibición del apetito. Por su parte, la ghrelina estimula el apetito por el mecanismo opuesto (Berthoud & Morrison, 2008; Wynne et al., 2005).

En animales mutantes del receptor de la leptina (*db/db*) (Chen et al., 1996) y en organismos sin leptina (*ob/ob*), se presenta hiperfagia y obesidad, que en el caso de animales *ob/ob* es contrarrestada por la administración de esta hormona (Campfield et al., 1995; Halaas et al., 1995; Pellemounter et al., 1995). Por su parte, la depleción o reducción en la expresión del receptor de insulina en el sistema nervioso lleva consigo el desarrollo de obesidad e hiperfagia (Brüning et al., 2000; Obici et al., 2002), mientras que la inyección de insulina intraventricular o en el PVN reduce el consumo de alimento y el peso corporal (Air et al., 2002; Menendez & Atrens, 1991). Por último, la hiperfagia también se ha reportado en animales con depleción hipotalámica del canal para glucosa (GLUT2) (Bady et al., 2006).

Adipogénesis

El tejido adiposo se divide en dos tipos el tejido adiposo blanco y el pardo. En el caso del tejido adiposo blanco además de ser considerado como un depósito de grasas participa en la homeostasis energética y posee una actividad endocrina importante (Kim and Moustaid-Moussa, 2000; Ronti et al., 2006). La obesidad se caracteriza por un incremento en el tejido adiposo blanco causado por hipertrofia o hiperplasia de los adipocitos, condiciones en las cuales se da una acumulación excesiva de grasa en estas células (Henry et al., 2012). Este padecimiento suele relacionarse con otras alteraciones como diabetes tipo 2, hipertensión, y dislipidemia. Además, se ha reportado que la hipertrofia de los adipocitos y la acumulación de tejido adiposo visceral se relaciona con daño en órganos como hígado, páncreas (específicamente en las células β) y músculo (Bays et al., 2008).

El tejido adiposo blanco secreta varios mensajeros, entre ellos la resistina, adiponectina, apelina, visfatina y leptina (Vázquez-Vela et al., 2008). En el caso de la leptina, su concentración en la sangre es proporcional a la cantidad de tejido graso (Morris & Rui, 2009). Por lo que, la obesidad suele estar asociada a niveles altos de esta hormona, que es un factor

que tiene la capacidad de inhibir la ingesta de alimento. Sin embargo los animales obesos con hiperleptinemia, suelen presentar un consumo alto de alimento, lo que sugiere que en animales obesos puede presentarse un estado de resistencia a la leptina (Banks et al., 1999; Bays et al., 2008; Henry et al., 2012).

Por otra parte, el tejido adiposo visceral es la fuente principal de ácidos grasos circulantes, los cuales son almacenados como triglicéridos. En condiciones normales, cuando se 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 (Coleman & Lee, 2004; Kim and Moustaid-Moussa, 2000; Ronti et al., 2006). Muchas de las enzimas involucradas en la lipogénesis incrementan su actividad por efecto de la insulina (Wang & Sul, 1998). Mientras que, un incremento en el tamaño de los adipocitos y en los ácidos grasos en sangre puede contribuir a la resistencia a la insulina y problemas de hipertensión (Sniderman & Faraj, 2007). Finalmente, se ha propuesto que la hipertrigliceridemia pueden dañar la barrera hematoencefálica, disminuyendo el transporte de leptina a las áreas cerebrales (Banks et al., 2004; Bays et al., 2008).

Termogénesis

Los seres vivos adquieren de los alimentos la energía necesaria para realizar todas sus funciones. Así, un estado energético balanceado se da cuando la ingesta calórica de un tiempo determinado es igual al número de calorías consumidas para el mantenimiento y reparación de tejidos, así como para el trabajo realizado (Eckert & Randall, 1997). En el caso de organismos homeotermos el mantener la temperatura corporal constante implica la presencia de un mecanismo especializada para la producción de calor conocido como termogénesis (Silva, 2006).

Las reacciones químicas que llevan a cabo las células para su funcionamiento traen consigo la pérdida de energía en forma de calor, así el calor generado por las reacciones para mantener las funciones vitales (alimentación, movimiento, reproducción etc.) son conocidas como termogénesis obligatoria, proceso que depende de la tasa metabólica basal y permite

mantener la temperatura en la zona de termoneutralidad. Sin embargo cuando la temperatura ambiental baja, los organismos homeotermos pueden activar mecanismos de generación de calor como son: la vasoconstricción, la piloerección y el titiriteo, a estos mecanismos se le conoce como termogénesis facultativa (Silva, 2006). Dentro de la termogénesis facultativa, uno de los mecanismos mas importantes es el que utiliza la actividad de las proteínas desacoplantes (UCPs) o termogeninas, las cuales aumentan la respiración mitocondrial aumentando al tasa metabólica y generando como subproducto calor (Lowell & Spiegelman, 2000). Así, se ha propuesto que defectos en el proceso de termogénesis podrían llevar al desarrollo de un fenotipo obeso. Por ejemplo, las dietas altas en grasa llevan a un decremento en la expresión de UCP1, lo que podría favorecer el desarrollo de un fenotipo obeso, al disminuir el gasto energético para generar calor (From & Klingenspor, 2011), mientras que la UCP2 regula negativamente la secreción de insulina (Zhang et al., 2001), Sin embargo, animales mutantes de UCP3 y UCP1 no desarrollan un fenotipo obeso (Gong et al., 2000; Vidal-Puig et al., 2000) por lo cual el papel de las termogeninas en el desarrollo de un fenotipo obeso ha sido difícil de establecer.

LOS RITMOS CIRCADIANOS

Los organismos presentan fluctuaciones diarias en variables fisiológicas y conductuales como por ejemplo: la actividad locomotriz, la alternancia entre el sueño y la vigilia, el metabolismo de los lípidos y los carbohidratos, la secreción hormonal, la presión sanguínea y el patrón de alimentación (Froy, 2010; Pittendrigh & Daan, 1976; Ramsey et al., 2007). Estas fluctuaciones, que persisten en ausencia de señales ambientales cíclicas, reciben el nombre de ritmos circadianos, del latín *circa*, cerca, y *diano*, día (Aschoff, 2001; Pittendrigh, 1993).

Las características que permiten describir a un ritmo son (Fig. 1.2): el periodo, que es el intervalo de tiempo en el que se completa una oscilación. La amplitud, que se refiere a la magnitud en la variación del fenómeno, la cual podemos estimar desde la cresta (punto máximo) hasta el valle (punto mínimo) en un ciclo del ritmo. El mesor, que es el promedio de todos los valores que se presentan a lo largo de un ciclo y, por último, la fase, que se refiere al momento en que ocurre un hecho característico dentro del ciclo; por ejemplo la acrofase es el momento del ciclo en que la variable alcanza su máximo valor (Ramírez et al., 2009).

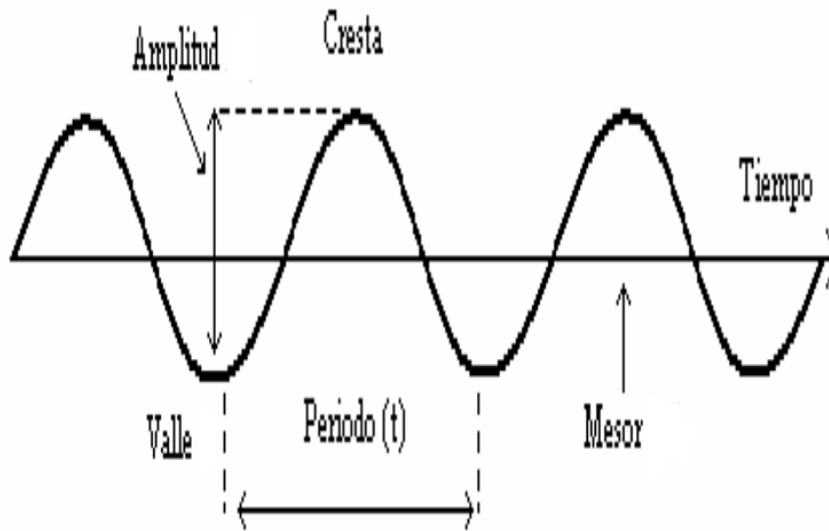


Figura 1.2.- Características de los ritmos biológicos.

Los ritmos circadianos se caracterizan por ser endógenos, es decir, persisten con un periodo cercano a 24 h en condiciones constantes, por lo que se asume que el organismo posee un mecanismo capaz de generar las oscilaciones. Tal mecanismo es conocido como reloj biológico o sistema circadiano. Quizá una de las características más importantes de las oscilaciones circadianas es su capacidad de ajustarse (sincronizarse) a las señales ambientales (Daan & Aschoff, 2001; Pittendrigh, 1993). Lo anterior confiere la ventaja de que los seres vivos son capaces de predecir y anticiparse a los cambios ambientales cíclicos incrementando así la posibilidad de aprovechar los recursos de manera más eficiente (Horton, 2001). Por último, los ritmos circadianos presentan compensación de la temperatura, es decir, mantienen el valor del periodo endógeno independientemente de la temperatura ambiental incluso en animales poiquiloterms sometidos a variaciones ambientales importantes (Pittendrigh, 1954).

Sistema circadiano

El sistema circadiano consta de tres elementos básicos (Fig. 1.3). Un oscilador maestro o marcapasos, el cual es una estructura capaz de generar oscilaciones autosostenidas y acoplar¹ a otros osciladores. Las vías de entrada, que son las encargadas de llevar la información ambiental hasta el marcapasos para así sincronizarlo a los ciclos ambientales. Por último, las vías de salida que envían la información del marcapasos a los órganos efectores y osciladores periféricos, para la expresión de los ritmos (Aguilar-Roblero et al., 2008b).

El marcapasos: En mamíferos el oscilador maestro es el núcleo supraquiasmático (NSQ), una estructura bilateral que se localiza en el hipotálamo anterior, dorsal al quiasma óptico y ventrolateral al tercer ventrículo. Cada núcleo está compuesto de una población de neuronas densamente empaquetadas. Anatómicamente se ha dividido al NSQ en una región dorsomedial (médula) que secreta vasopresina (VP) y una ventrolateral (corteza) que secreta péptido intestinal vasoactivo (VIP) como neurotransmisores (Abrahamson & Moore, 2001; Moore et al., 2002).

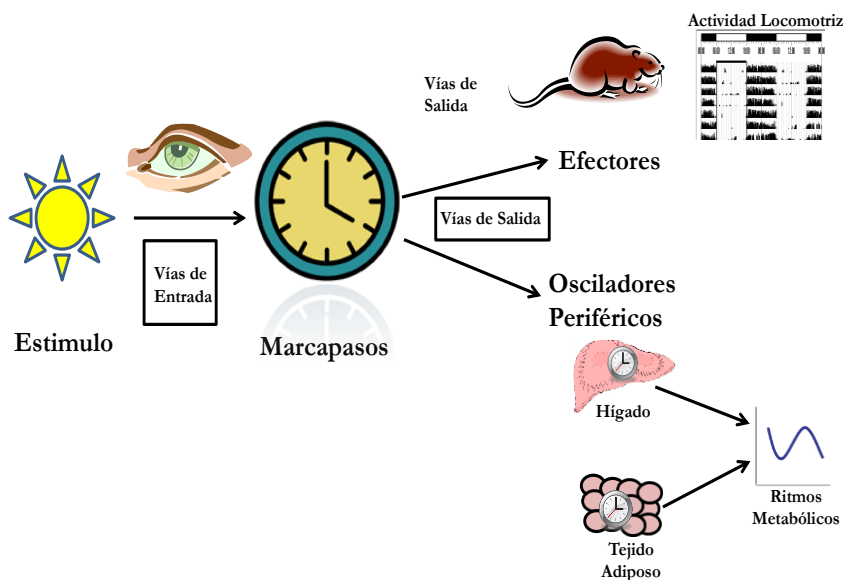


Figura 1.3. Esquema que muestra los componentes del sistema circadiano.

¹ **Acoplamiento** hace referencia al ajuste de periodo y fase entre los osciladores del organismo.

Entre las evidencias de que el núcleo supraquiasmático es la estructura responsable de conducir los ritmos, encontramos que es capaz de generar oscilaciones espontáneamente *in vivo* e *in vitro* (Green & Gillette, 1982; Inouye & Kawamura, 1979; Shibata et al., 1982; Shinohara et al., 1995). Por otra parte, una lesión bilateral de esta estructura produce una desorganización de patrones circadianos en la actividad locomotriz, las concentraciones basales de glucosa, entre otros. Mientras que el trasplante de NSQ fetal, en animales con lesión, restablece algunos de los ritmos perdidos (Aguilar-Roblero et al., 1986; Fleur et al., 1999; Ralph et al., 1990).

Con el tiempo se ha demostrado que tejidos periféricos como el riñón, el hígado, el páncreas y el tejido adiposo presentan oscilaciones autosostenidas en ciertos indicadores de actividad. La ritmicidad de estos tejidos, no se expresa independientemente, pues el NSQ impone periodo y fase a su oscilación, por lo que estos órganos son considerados osciladores periféricos. (Ando et al., 2005; Lanza-Jacoby et al., 1986; Mühlbauer et al., 2004; Tahara et al., 2012; Yoo et al., 2004; Zvonic et al., 2006).

Vías de entrada: Entre las aferentes al NSQ (Fig. 1.4) encontramos aquellas que llevan información sobre los ciclos ambientales de luz-oscuridad. El tracto retinohipotalámico (TRH) es la principal vía de transducción de los estímulos luminosos, este proyecta a la región ventrolateral del NSQ (Abrahamson & Moore, 2001; Johnson et al., 1988), liberando glutamato y péptido hipofisiario activador de la adenilato ciclasa, también conocido como PACAP (Hannibal et al., 2001; Hannibal, 2002; Liou et al., 1986)

Otras vías indirectas de ingreso de información luminosa son el cuerpo geniculado lateral del tálamo (LGN) y la hojuela intergeniculada (IGL), los cuales secretan ácido gamma-aminobutírico (GABA) y neuropéptido-Y (NPY) como neurotransmisores (Harrington, 1997; Park et al., 1993). Por otra parte, el NSQ también recibe información acerca del estado metabólico del organismo (Buijs et al., 2006; Froy, 2010) mediante aferencias desde los núcleos paraventricular (PVN) y arqueado (ARC) del hipotálamo (Kalsbeek et al., 2004; Yi et al., 2005), o bien por la recepción directa de hormonas y nutrientes que atraviesan la barrera hematoencefálica (Inyushkin et al., 2009).

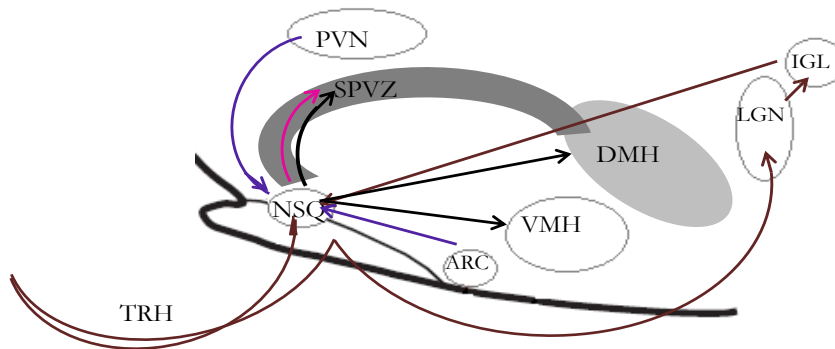


Figura 1.4. Esquema de las aferencias y eferencias al núcleo supraquiasmático (NSQ). Aferencias para señales luminosas (flechas cafés) y señales metabólicas (flechas moradas). Eferencias para el control de la actividad locomotriz (flecha rosa) y eferencias para el control de alimentación y balance energético (flechas negras). Tracto retinohipotalámico (TRH), núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN), zona subparaventricular del hipotálamo (SPVZ), núcleo arqueado (ARC), hipotálamo ventromedial (VMH), hipotálamo dorsomedial (DMH), hipotálamo, cuerpo geniculado lateral del tálamo (LGN) y hojuela intergeniculada (IGL).

Vías de salida: Uno de los mecanismos menos estudiados es cómo el marcapasos comunica las señales rítmicas al resto del organismo. Se sabe que el NSQ presenta eferencias hacia la corteza infralímbica (IL), el septum lateral (LS), la sustancia innominata, el subiculum ventral del hipocampo, el órgano subfornical, el hipotálamo ventromedial (VMH), el hipotálamo posterior, el núcleo pretectal (PT), el núcleo medio del rafé (MRN), la zona subparaventricular del hipotálamo (SPVZ), el ARC y la IGL, las dos últimas también presentan aferencias hacia el NSQ (Abrahamson & Moore, 2006; Moga & Moore, 1997).

En el caso de la regulación de la actividad locomotriz (Fig. 1.4) se ha propuesto que el NSQ ejerce su control a través de las eferencias hacia el SPVZ (Abrahamson & Moore, 2006) o por señales humorales como la procinetina-2 (PK2), el factor transformador de crecimiento- α (TGF α) y la citocina de cardiotropina (Cheng et al., 2002; Kramer et al., 2001; Kraves & Weitz, 2006; Li et al., 2006). Por su parte, la ingesta de alimento y la homeostasis energética se regulan por las proyecciones del NSQ hacia el SPVZ y los núcleos hipotalámicos dorsomedial (DMH) y ventromedial (VMH), así como con las eferencias hacia el ARC (Froy, 2010; Ramsey et al., 2007).

Mecanismos moleculares de la oscilación circadiana

En cultivos celulares se observó que las neuronas del NSQ presentan ritmos individuales, lo que es una prueba de la naturaleza celular de los ritmos circadianos (Honma et al., 2004; Welsh et al., 1995). Así, la maquinaria básica de la oscilación circadiana es intracelular y está dada por un mecanismo de retroalimentación basado en la transcripción de los denominados genes reloj² y la síntesis de las proteínas correspondientes (Fig. 1.5) .

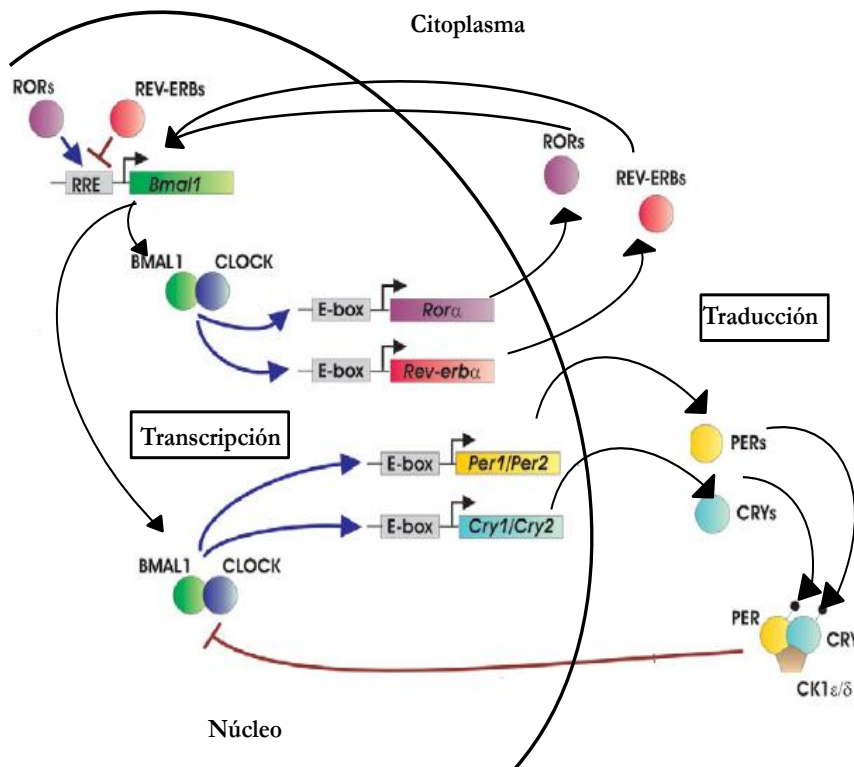


Figura 1.5. Esquema de las asas de transcripción-traducción de los genes reloj en mamíferos.

Los cuadros representan los genes reloj involucrados en la generación de las oscilaciones circadianas. Los círculos representan las proteínas que al ser translocadas al núcleo pueden actuar como factores de transcripción o como represores de la misma (Modificado de Ko & Takahashi, 2006).

² **Genes Reloj** son genes que están involucrados en la generación de las oscilaciones circadianas a nivel celular.

En mamíferos los productos dimerizados de los genes *Clock*³ y *Bmal1*⁴ (CLOCK-BMAL1) actúan como factores de transcripción que interactúan con las “cajas E” (Debruyne et al., 2006; Gekakis, 1998) de la región promotora de diversos genes, entre ellos los denominados periodo (*Per1*, *Per2*), criptocromos (*Cry1*, *Cry2*) y *Rev-erb-α*⁵, activando su transcripción (Bae et al., 2001; Kume et al., 1999; Triqueneaux et al., 2004). A su vez, los dímeros formados por las proteínas PER y CRY son fosforilados por las caseín cinasas I épsilon y delta (CKIε/δ), lo que permite que el dímero sea translocado al núcleo (Akashi et al., 2002; Eide et al., 2002). Ya en el núcleo, el dímero PER-CRY inhibe la actividad de CLOCK-BMAL1 y por tanto la transcripción de los genes *Per*, *Cry* y *Rev-erba* (Preitner et al., 2002; Sato et al., 2006; Yu et al., 2002).

Por otra parte la proteína REV-ERBα inhibe la expresión de *Bmal1*, mediante su acción a través de los elementos de respuesta a ROR (RRE) en la región promotora del gen *Bmal1*. Así, cuando el complejo PER-CRY reprime a CLOCK-BMAL1 disminuye la expresión de *Rev-erba*, lo que conduce a la estimulación de la transcripción de *Bmal1* asegurando que el ciclo se repita y regulando la salida rítmica del reloj (Sato et al., 2006).

RITMOS CIRCADIANOS EN EL METABOLISMO

Una de las funciones del sistema circadiano es regular y preparar la maquinaria metabólica para las variaciones temporales en la disponibilidad y abundancia de los nutrientes. Por lo que, no es de sorprender que numerosas variables fisiológicas relacionadas con el balance energético del organismo presenten fluctuaciones circadianas. Así, se han descrito oscilaciones de este tipo en variables asociadas a la disponibilidad de glucosa, como las concentraciones circulantes de insulina, glucagon, glucocorticoides y de la glucosa misma (Cailotto et al., 2005; Fleur et al., 1999; Ruitter et al., 2003). Además, se han reportado fluctuaciones circadianas en los niveles de hormonas que participan en la regulación de la ingesta de alimento, como la leptina y la ghrelina (Bodosi, et al., 2004; Kalsbeek, et al., 2001) y

³ *Clock* gen cuya falta elimina el ritmo circadiano de actividad locomotriz.

⁴ *Bmal1* gen que codifica para la proteína tipo ANRT de músculo y cerebro.

⁵ *Rev-erb-α* gen que codifica para el factor α de transcripción reversa del virus de eritroblastosis.

en la concentración de ácidos grasos y triglicéridos (Escobar et al., 1998; Lanza-Jacoby et al., 1986).

Estudios recientes han demostrado que muchos genes que participan en el metabolismo se expresan de manera rítmica (Duffield et al. 2002; Panda et al. 2002; Storch et al. 2002). Así, el hígado presentan oscilaciones en el 10 al 20% de sus proteínas; entre las que se encuentran enzimas involucradas en el metabolismo de los carbohidratos, el ciclo de la urea, la detoxificación hepática, el metabolismo de especies reactivas de oxígeno y la apoptosis (Reddy et al., 2006); lo mismo ocurre con la glándula adrenal que presenta oscilaciones circadianas en genes que participan en la biosíntesis de corticoesteroides (Oster et al., 2006).

Con el tiempo se demostró que fragmentos de tejidos periféricos, mantenidos *in vitro*, expresan de manera oscilatoria los genes de periodo: *Per1* y *Per2* (Yoo et al., 2004) y que órganos como el páncreas, el hígado y el tejido adiposo *in vivo*, presentan fluctuaciones diarias en muchos de los genes involucrados en la generación las oscilaciones circadianas (Ando et al., 2005; Lanza-Jacoby et al., 1986; Mühlbauer et al., 2004; Zvonic et al., 2006). Lo anterior ha llevado a proponer que diferentes tejidos poseen la maquinaria molecular básica para comportarse como osciladores y que por lo tanto tienen la capacidad intrínseca de mantener su propia oscilación. En este contexto, la ritmicidad circadiana que muestra una variable fisiológica se entiende como el resultado de la interacción entre el marcapasos central y los osciladores periféricos (Tahara et al., 2012).

Así, en osciladores periféricos como el hígado, páncreas y tejido adiposo se ha demostrado que proteínas reloj juegan un papel importante en la regulación de las oscilaciones de genes y proteínas que participan en el metabolismo (Kornmann et al., 2007). En el hígado REV-ERB α participa en la modulación circádica de genes involucrados en el metabolismo del colesterol y los lípidos (Martelot et al., 2009, Raspe et al., 2002) y se ha propuesto que esta implicado en la oscilación del 90% de las proteínas que muestran un patrón de expresión circadiano (Kohmman et al., 2007). Mientras que en el tejido adiposo, CLOCK y BMAL1 son importantes en la adipogénesis (Wang & Lazar, 2008; Shimba et al, 2005). BMAL1 también es importante para la expresión de genes que participan en la detoxificación xenobiotica y en la conversión de especies reactivas de oxígeno, los cuales se han asociado a procesos de envejecimiento (Kondratov et al., 2006). Por ultimo, mutaciones en los genes de

reloj *Per2* y *Clock* alteran la expresión rítmica de proteínas como la aldolasa, arginasa y catalasa (Reddy et al., 2006).

La relación que existe entre la maquinaria molecular de la oscilación circadiana y la expresión de genes controlados por reloj en osciladores periféricos, explica el hecho de que alteraciones en los patrones circadianos puedan traer consigo cambios a nivel metabólico. Así, se ha encontrado que los ratones mutantes C57BL/6J para el gen *Clock* (*Clock*⁻¹¹⁹), presentan cambios en los patrones de alimentación, desarrollan sobrepeso, hiperfagia y síntomas del SM⁶ (Turek et al., 2005), al mismo tiempo estos ratones absorben más lípidos y carbohidratos que péptidos a través del intestino probablemente por la falta de proteínas transportadoras de nutrientes (Pan & Hussain, 2009). Otros mutantes de *Clock* (*Cl:ICR*), desarrollan alteraciones en el metabolismo de los lípidos reduciendo la ganancia de peso ante dietas altas en grasas (Kudo et al., 2007; Oishi et al., 2006), mientras que los ratones mutantes *mPer2*^{-/-} y *mPer1/2/3*^{tm1D^{rw}} muestran una mayor tendencia a ganar peso y presentan cambios en los patrones diarios de consumo de alimento bajo estas dietas (Dallmann & Weaver, 2010; Yang et al., 2009). Por su parte, los mutantes *de Bmal1*^{-/-} presentan una disminución en la gluconeogénesis, y un aumento en la sensibilidad de la insulina (Rudic et al., 2004), mientras que animales que presentan deficiencia de esta proteína en el hígado, desarrollan alteraciones en la expresión de genes asociados a la movilización de glucosa (Lamia et al., 2008). Por último, los ratones mutantes de *Rev-erba*^{-/-} presentan una elevación de los triglicéridos circulantes (Raspe et al., 2002). Los estudios anteriores confirman la importancia del sistema circadiano en el desarrollo de desórdenes metabólicos.

EFFECTOS DEL METABOLISMO SOBRE EL SISTEMA CIRCADIANO

Como se mencionó antes, el sistema circadiano es capaz de ajustarse a las señales ambientales cíclicas, quizá uno de los sincronizadores más importantes es la luz (*Ver Capítulo 3*), sin embargo la disponibilidad de alimento, también puede actuar como un sincronizador (Kovac et al., 2009). Así, cuando un organismo está sujeto a un protocolo de restricción de alimento (Mistlberger, 1994; Stephan, 2002) es capaz de modificar sus ritmos circadianos para

⁶ SM síndrome metabólico

anticiparse conductual y fisiológicamente a la disponibilidad de alimento (Boulos, 1980; Damiola et al., 2000; Díaz-Muñoz et al., 2000; Escobar et al., 1998); sin que existan cambios en las oscilaciones del NSQ (Ángeles-Castellanos et al., 2004; Miñana-Solis et al., 2009). Mas aun, organismos con lesiones en el NSQ mantienen la capacidad de sincronizarse a la llega del alimento, lo cual sugiere la existencia de un oscilador sincronizado por alimento (feeding-entrainable oscillator: FEO) (Marchant & Mistlberger, 1997; Stephan et al., 1979). Hasta la fecha se desconoce la ubicación exacta de este oscilador, sin embargo, parecen estar involucradas regiones del hipotálamo dorsomedial (DMH), el núcleo parabraquial, el núcleo accumbens y órganos periféricos encargados de procesar nutrientes (Froy, 2010; Ramsey et al; 2007).

A pesar de que los protocolos de restricción al alimento no parece modificar la actividad del NSQ, se ha demostrado que ciertas señales de importancia metabólica, como la leptina, la ghrelina y la glucosa tienen efectos sobre el NSQ (Inyushkin et al., 2009; Mendoza et al., 2011; Prosser & Bergeron, 2003; Yannielli et al., 2007), y pueden modificar la capacidad de respuesta del sistema circadiano a la luz (Challet et al., 1999a; Mendoza et al., 2011; Sage et al., 2004; Yi et al., 2008). Por otra parte estudios recientes demuestran que el estado energético a nivel celular puede modificar la expresión de los genes reloj. Así, las formas reducidas de NAD^{+7} , el NADH y NADPH pueden facilitar la unión del factor de transcripción CLOCK-BMAL1 al ADN⁸, mientras que sus formas oxidadas NAD^{+} y NADP tienen el efecto opuesto (Rutter et al., 2001). De esto resulta que el estado redox puede alterar la expresión de los ritmos a nivel celular.

Por lo anterior, no es extraño que en diversos modelos de obesidad genética e inducida se presenten alteraciones en el sistema circadiano. En el caso de modelos de obesidad genética, se ha encontrado una disminución en la amplitud de la oscilación de genes reloj en hígado y tejido adiposo (Ando et al., 2005, 2011; Motosugi et al., 2011), así como alteraciones en los perfiles diarios de sustancias producidas por el tejido adiposo (Ando et al., 2005), en el ritmo de la glucosa plasmática (Bailey et al., 1975), y en el de contenido de glucógeno y de enzimas lipogénicas en el hígado (Lanza-Jacoby et al., 1986). A nivel conductual, los organismos obesos muestran diferencias en la amplitud, la fase y el periodo en los ritmos de

⁷ NAD^{+} nicotinamida adenina dinucleótido, forma oxidada

⁸ ADN ácido desoxirribonucleico

alimentación y actividad locomotriz (Alingh-Prins et al., 1986; Fukagawa et al., 1992; Mistlberger et al., 1998; Murakami et al., 1995).

En el caso de animales alimentados con dietas hipercalóricas, además de un aumento de peso, hiperlipidemia e hiperglicemia se han observado alteraciones en la ritmicidad circadiana, como una disminución en la amplitud de la oscilación de genes reloj en tejido adiposo, hígado y páncreas (Hsieh et al., 2010; Kohsaka et al., 2007; Vieira et al., 2012). También se han encontrado cambios en los ritmos de glucosa, insulina, leptina, adiponectina y corticosteroides (Barnea et al., 2009; Cha et al., 2000; Kohsaka et al., 2007), mientras que a nivel conductual se han reportado alteraciones en la amplitud y el periodo del ritmo bajo condiciones constantes, así como un incremento en el consumo de alimento en el periodo de reposo (Kohsaka et al., 2007; Mendoza et al., 2008).

Por último, existe evidencia de que la obesidad afecta la capacidad de los organismos de sincronizar su ritmicidad endógena en respuesta a estímulos luminosos. En modelos de diabetes tipo 1 inducida por estreptozotocina (Challet et al., 1999b) y en animales deficientes en leptina (Sans-Fuentes et al., 2010), se ha reportado un aumento en la sensibilidad a señales lumínicas, mientras que animales alimentados con dietas hipercalóricas presentan una reducción en la respuesta a la luz (Mendoza et al., 2008).

NEOTOMODON ALSTONICOMO MODELO DE OBESIDAD

El ratón de los volcanes, *Neotomodon alstoni*, es un roedor endémico de México, que pertenece al orden Rodentia y a la familia Cricetidae (Ceballos y Oliva; 2005). Este roedor tiene una distribución restringida al Eje Neovolcánico Transversal de México, situado entre los 18° y 22° latitud Norte con un intervalo altitudinal que oscila entre los 2,600 y los 4,500 m sobre el nivel del mar. Este roedor es muy dócil y capaz de reproducirse en condiciones de cautiverio durante todo el año, al igual que en su hábitat natural, siendo su tasa de natalidad más elevada de abril a septiembre. Las hembras presentan varios ciclos estrales al año, con una duración promedio de 4 a 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., 2004, 2009).

Desde hace algunos años, el ratón de los volcanes ha sido propuesto como modelo para el estudio de la obesidad. Así, se ha reportado que después de 4 meses en cautiverio, el 60% de los animales adultos desarrollan lipomas (Fig. 1.6-A), que son neoplasias benignas de tejido adiposo blanco. Los organismos que presentan lipomas exhiben un fenotipo obeso (Fig. 1.6-B) (Carmona-Castro, 1994; Diego-Magaña, 1999).

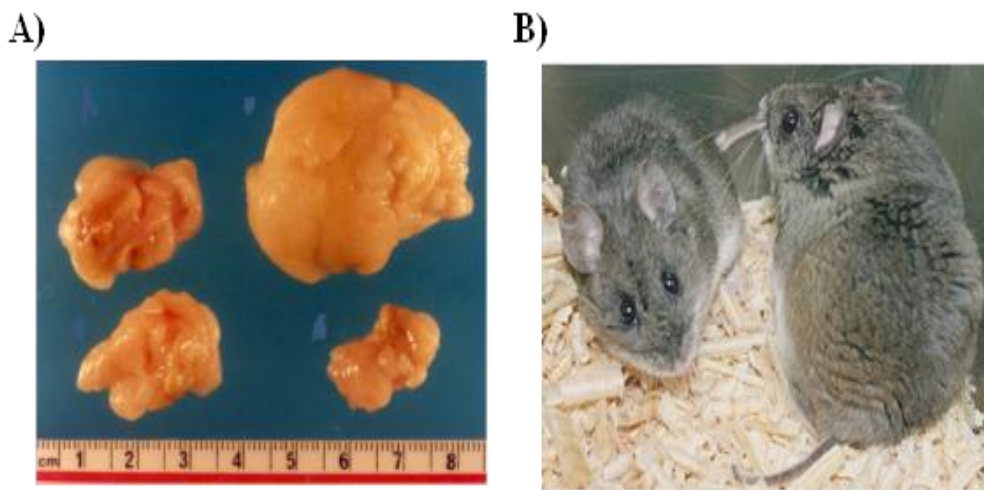


Figura 1.6. A) Lipomas presentes en animales obesos de *N. alstoni*, tomada de (Carmona-Castro, 2006). B) Machos delgado (izquierda) y obeso (derecha) del ratón de los volcanes.

En el caso de los individuos que bajo condiciones de cautiverio desarrolla un fenotipo obeso se ha encontrado que esta característica puede ir acompañada de alteraciones metabólicas como la hipertrigliceridemia o el desarrollo de esteatosis hepática (Carmona-Castro, 2006). Un punto interesante es que los animales obesos de ambos sexos no presentan hiperglucemia en condiciones de ayuno, sin embargo desarrollan intolerancia a la glucosa e hiperglucemia postprandial (Carmona-Castro, 2006, Fuentes-Granados, 2011), por otra parte se han reportado altos niveles de insulina en hembra obesas (Fuentes-Granados, 2011), lo que sugiere un estado de resistencia a la insulina. En el caso de los niveles de leptina se ha

reportado que en animales obesos de *N. alstoni* se presenta un estado de hiperleptinemia (Carmona-Alcocer et al., 2012; *Anexo 1*), así como a un aumento en la concentración del receptor a la leptina en hipotálamo (Datos no publicados), lo que sugiere que animales obesos de esta especie pueden estar desarrollando un estado de resistencia a la leptina. Por último, se ha encontrado que en animales obesos de *N. alstoni* los perfiles diarios de glucosa, insulina y leptina pierden el patrón rítmicos observado en animales delgados, sugiriendo que el SM lleva a la alteraciones del sistema circadiano (Carmona-Alcocer et al., 2012; *Anexo 1*)

Así, la condición de obesidad espontánea en *N. alstoni* va acompañada alteraciones metabólicas, y de expresión en los perfiles metabólicos diarios, lo que lo vuelve una especie interesante para el estudio de la obesidad y su relación con alteraciones en la organización circadiana. La información generada recientemente apunta a que la obesidad altera la organización del sistema circadiano y su capacidad de responder a las señales ambientales, pero plantea la interrogante de la naturaleza de esta alteración y el mecanismo de ritmicidad circadiana que es afectado en estas condiciones. Con base en esto, el objetivo de este trabajo es conocer los efectos de la obesidad sobre los ritmos de actividad locomotriz y la capacidad de los organismos obesos para responder a los pulsos luminosos, empleando un modelo de obesidad espontánea como es el caso de *N. alstoni*, en condiciones de cautiverio.

CAPITULO 2: EFECTOS DE LA OBESIDAD SOBRE EL RÍTMO CIRCADIANO DE ACTIVIDAD LOCOMOTRIZ

OSCILACIÓN ESPONTÁNEA O LIBRE CURSO

Una de las características más importantes de los ritmos circadianos es que son de carácter endógeno. Así, cuando se coloca a los individuos bajo condiciones ambientales constantes, los ritmos biológicos siguen presentándose con una periodicidad cercana pero no igual a 24 horas (Fig. 2.1), se dice entonces que el ritmo está en oscilación espontánea o libre curso (Pittendrigh, 1993).

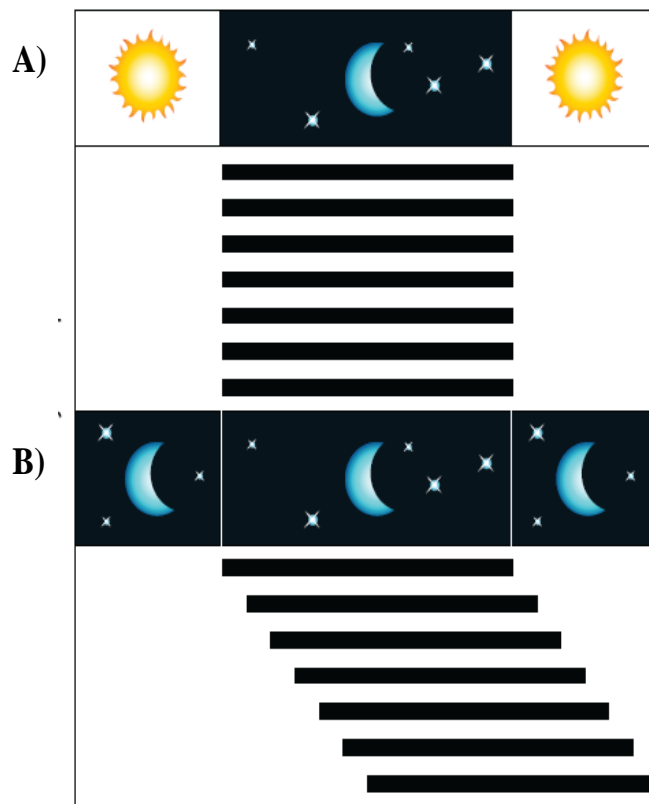


Figura 2.1.-Esquema de las propiedades de los ritmos circadianos. A) Sincronización B) Oscilación espontánea. Tomado de Golombek & Rosenstein, 2010. Las rayas representan la actividad del organismo y los espacios en blanco el reposo.

El periodo⁹ de la oscilación espontánea es conocido como tau (τ) y está determinado genéticamente, por lo que su valor es especie-específico (Pittendrigh & Daan, 1976). En estudios en los que se realizaron trasplantes de NSQ¹⁰ a organismos con lesiones en esta estructura, se observó que si los donadores tenían un periodo τ , diferente al organismo receptor, los patrones rítmicos en condiciones de oscuridad constante se restablecían con el periodo del donador (Ralph et al., 1990; Vogelbaum & Menaker, 1992). Más tarde se demostró que mutaciones en los genes reloj llevan a cambios en los patrones rítmicos observados en oscilación espontánea (Antoch et al., 1997; Bae et al., 2001; Debruyne et al., 2006; Zheng et al., 2001), por lo cual se dice que los ritmos circadianos en condiciones de oscuridad constante (OO) son un reflejo del marcapaso circadiano.

SINCRONIZACIÓN

La sincronización es el ajuste del periodo y la fase del ritmo circadiano al periodo de una señal ambiental cíclica (Fig. 2.1), en donde el periodo endógeno τ del sistema circadiano iguala el periodo externo (T) del ciclo ambiental, es decir $T = \tau$ (Daan & Aschoff, 2001; Pittendrigh, 1993). Esta característica es de suma importancia, ya que si el ritmo endógeno no fuera igual a 24 h, éste gradualmente divergiría de los ciclos ambientales, lo que llevaría a presentar las fases de los ritmos en horas inadecuadas para la sobrevivencia, por lo que la sincronización permite coordinar al organismo con los cambios ambientales, creando de esta manera un nicho temporal (Horton, 2001).

Las señales ambientales capaces de ajustar los ritmos circadianos son conocidas como sincronizadores o “zeitgebers”, palabra en alemán que significa “dador de tiempo”. Dentro de los zeitgebers más poderosos para generar sincronización encontramos señales como la luz (Golombek & Rosenstein, 2010; Morin & Allen, 2006), la presencia de alimento (Stephan, 2002) y señales sociales (Mistlberger & Skene, 2004), entre otros.

Entre las características que debe cumplir una señal ambiental para ser considerada como un sincronizador se encuentran, que la señal ambiental se presente de manera periódica,

⁹ **Periodo** intervalo de tiempo en el que se completa una oscilación

¹⁰ **NSQ** núcleo supraquiasmático, parte del sistema nervioso central que es considerada el marcapasos circadiano en mamíferos

que sea capaz de cambiar el periodo del ritmo τ igualando el periodo del ciclo ambiental, y que el ritmo biológico y la señal ambiental establezcan una relación de fase estable (Daan & Aschoff, 2001; Pittendrigh, 1993).

Relación de fase

Una consecuencia de la sincronización es que al igualar el periodo endógeno con el ambiental se establece una relación de fase estable con el zeitgeber. Llamamos relación de fase (Ψ) a la diferencia que se da entre la fase del ritmo endógeno (φ) y la fase del ciclo ambiental (Φ). Es decir, $\Psi = \Phi - \varphi$; la cual describe la diferencia en tiempo entre las fases del ritmo y del sincronizador. Cuando Ψ es positivo significa que φ precede a Φ y si es negativo entonces Φ precede a φ . La diferencia en Ψ depende de las propiedades del sincronizador como la intensidad, y la relación entre τ y T . Así, cuando el periodo endógeno es menor al periodo ambiental suele establecerse una relación de fase positiva, mientras que en periodos endógenos mayores al ciclo ambiental se establecen relaciones de fase negativas (Daan & Aschoff, 2001; Pittendrigh, 1993)

VARIACIONES INTERINDIVIDUALES

A pesar de que el periodo endógeno es especie-específico existe un intervalo de variación interindividual que depende de la historia de vida del organismo, por ejemplo, de la edad y el estado fisiológico, y de la historia previa, es decir, de la condición lumínica a la cual fue expuesto cada individuo en el periodo precedente (Pittendrigh & Daan, 1976).

Edad: Uno de los factores de variación interindividual más estudiados es la edad. En el caso de organismos viejos se ha observado que presentan un alargamiento en el valor del periodo τ y una disminución en la amplitud de los ritmos tanto en condiciones de oscilación espontánea, como en la sincronización a ciclos de luz – oscuridad 12:12 (LO 12:12), además los organismos viejos presentan cambios en la relación de fase que se establece con el sincronizador, con respecto a los observado en organismos más jóvenes (Kolker et al., 2004; Possidente et al., 1995; Scarbrough et al., 1997). El alargamiento del periodo por

envejecimiento se ha interpretado como una pérdida en el acoplamiento entre las células del NSQ, por una deficiencia en la señal de melatonina (Benloucif et al., 1997; Reeth et al., 2001).

Obesidad: Otro de los factores que pueden alterar el patrón del ritmo en oscilación espontánea son los desórdenes metabólicos. Así, se ha reportado que dietas hipercalóricas o mutaciones que generan un fenotipo obeso llevan a un alargamiento del periodo en oscuridad constante (Kohsaka et al., 2007; Mendoza et al., 2008; Murakami et al., 1995; Sans-Fuentes et al., 2010; Turek et al., 2005), por otra parte la obesidad puede alterar los ritmos en OO disminuyendo la amplitud de los mismos (Murakami et al., 1995; Sans-Fuentes et al., 2010).

Estudios con diferentes modelos de obesidad han mostrado que los ritmos circadianos de actividad locomotriz conservan la capacidad de sincronizarse a ciclos de LO 12:12. Sin embargo se presentan alteraciones en los patrones de ritmo como son; una disminución en la amplitud (Mendoza et al., 2008; Mistlberger et al., 1998; Murakami et al., 1995; Turek et al., 2005), una mayor índice de actividad durante el periodo de reposo (Kohsaka et al., 2007; Mistlberger et al., 1998; Sans-Fuentes et al., 2010; Turek et al., 2005), así como cambios en la relación de fase que se establece con el sincronizador (Fukagawa et al., 1992; Mistlberger et al., 1998).

Lo anterior ha llevado a ver las alteraciones metabólicas desde una perspectiva diferente, abriendo líneas de investigación interesadas en conocer los efectos que enfermedades de regulación metabólica tienen sobre el sistema circadiano (Delezir & Challet, 2011; Froy, 2010; Green et al., 2008). Sin embargo, existen pocos estudios sobre los efectos de la obesidad en la capacidad de sincronización a la luz (Mendoza et al., 2008; Sans-Fuentes et al., 2010). La mayoría de los trabajos realizados hasta el momento se han hecho en animales con mutaciones genéticas o con dietas hipercalóricas; en este sentido, el uso de modelos no tradicionales para el estudio de la obesidad confiere la ventaja de una amplia variabilidad alélica como lo observado en poblaciones naturales (Smale et al., 2005). Así, el uso de un modelo de obesidad espontánea bajo dietas regulares, como es el caso de *Neotomodon alstoni*, plantea la posibilidad de estudiar si los efectos en el sistema circadiano por la condición de obesidad se presentan en poblaciones con alta variabilidad alélica.

HIPÓTESIS

Se ha descrito que la condición de obesidad puede afectar los patrones de oscilación circadiana por lo cual se espera que los machos obesos de la especie *Neotomodon alstoni* presenten una disminución en la amplitud del ritmo de actividad locomotriz en condiciones de luz-oscuridad 12:12 y así como un alargamiento del periodo en oscuridad constante, con respecto a los patrones de machos delgados de la misma especie.

OBJETIVO

Determinar si existen alteraciones en el patrón del ritmo circadiano de actividad locomotriz en condiciones de sincronización y de oscilación espontánea en machos obesos de la especie *Neotomodon alstoni*.

Objetivos particulares:

- Evaluar la capacidad de sincronización del ritmo circadiano de actividad locomotriz a un ciclo LO 12:12 en machos obesos de *N. alstoni*.
- Determinar si existen diferencias entre ratones delgados y obesos de esta especie, en las proporciones de actividad en la fotofase¹¹ y en la escotofase¹², así como cambios en la relación de fase (Ψ) que se establece con el sincronizador lumínico.
- Determinar si organismos obesos del ratón de los volcanes presentan un alargamiento del periodo (τ) en condiciones de oscuridad constante.
- Determinar si existen diferencias en los patrones de actividad locomotriz en oscilación espontánea entre ratones delgados y obesos de la especie *Neotomodon alstoni*.

¹¹ **Fotofase** es el periodo de tiempo durante el cual el organismo recibe luz.

¹² **Escotofase** es el periodo de tiempo durante el cual un organismo está en condiciones de oscuridad.

MATERIAL Y MÉTODO

Obtención y mantenimiento de los animales

Ratones *N. alstoni* silvestres

Los machos adultos de la especie *Neotomodon alstoni*, fueron colectados en la sierra del volcán Ajusco, en un punto ubicado en la carretera federal México-Cuernavaca entre los kilómetros 48 y 51, con un intervalo de altitud de 2440 a 2500 m.s.n.m. Los animales se capturaron mediante trampas Sherman para roedores, usando como cebo hojuelas de avena. Los ratones fueron transportados al Bioterio de la Facultad de Ciencias (BFC), UNAM para su desparasitación y aclimatación por un mes. Los organismos caracterizados como adultos jóvenes fueron seleccionados usando como criterio un peso corporal menor a los 40 g, una longitud entre 100 y 130 mm y la presencia de pelaje gris en la parte superior y blanquecino en el vientre (Ceballos & Oliva, 2005; Nowak, 1999).

Durante el periodo de aclimatación, los organismos se mantuvieron en condiciones artificiales de LO 12:12 (luz de 250 a 300 lux) a una temperatura de $23 \pm 2^\circ \text{C}$, en cajas de cianocrilato de 27 x 18 x 15cm; con alimento (nutricubos, Rodent Laboratory Chow 5001) y agua *ad libitum*. Después de 6 meses en estas condiciones, los animales fueron separados en dos grupos con base en su peso corporal. El 60 % de la población presentó un peso superior a los 60 g y fueron considerados obesos de acuerdo a estudios preliminares (Carmona-Castro, 2006; Carmona-Alcocer et al., 2012), basados en el índice de Lee (Ernsberger et al., 1999; Rogers & Webb, 1980), el cual se establece mediante la siguiente fórmula:

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

En donde el peso corporal está dado en gramos y la longitud naso anal en milímetros. El grupo de ratones silvestres delgados (S-D) presentó un peso de $50 \pm 2 \text{ g}$ y el grupo de silvestres obesos (S-O) un peso de $75.5 \pm 4 \text{ g}$ (Fig. 2.2).



Figura 2.2.-Fotografía de *Neotomodon alstoni* delgado (derecha) y obeso (izquierda), de edad similar.

Ratones *N. alstoni* F1.

Con el fin de descartar variaciones interindividuales en el ritmo circadiano de actividad locomotriz debidas a la edad, se utilizaron animales F1¹³, los cuales permanecieron bajo las mismas condiciones de aclimatación que los animales silvestres. En este caso la condición de obesidad se desarrolla entre los 6 y los 8 meses de edad, el grupo de animales delgados F1 (F-D) presentó un peso de 48 ± 2 g y el grupo de obesos F1 (F-O) un peso de 68 ± 3 g.

Sistema para el registro de actividad locomotriz

Los ratones fueron mantenidos de manera individual en una caja de vidrio de 30 x 18 x 20cm con una base y tapa de acrílico desmontables. Para obtener el registro de actividad locomotriz a nivel vertical, las cajas se colocaron sobre una placa con un sistema de sensores infrarrojos que consiste en un par de barras paralelas a lo largo de la caja de registro, de manera

¹³ **F1** animales nacidos en bioterio descendientes de padres silvestres

que cada vez que el animal interrumpe el haz de luz generado por los sensores infrarrojos se contabiliza un evento. El número de eventos (bin) fue almacenado con una frecuencia de muestreo de 10 minutos a lo largo de todo el experimento y la información generada se capturó de manera automatizada en una computadora mediante el programa ACTIBIO (Facultad de Psicología, URIDES\Facultad de Ciencias; UNAM). Las cajas de registro se mantuvieron en gabinetes de madera de 140 x 85 x 40cm divididos en 4 secciones, dentro de cada compartimento se colocaron 2 cajas de vidrio, para un macho delgado y uno obeso. Cada sección mantenía condiciones de aireación y temperatura constantes ($23\pm 2^\circ$ C). Para la iluminación en ciclos de LO 12:12 se utilizaron lámparas de luz blanca (250 lux) controladas mediante un reloj electrónico programable, mientras que el registro en condiciones constantes se llevo a cabo sin ningún tipo de iluminación.

Durante los protocolos experimentales los ratones fueron alimentados con nutricubos y agua *ad libitum*. El cambio de la cama de aserrín se realizó una vez a la semana. Además de esto se llevó un registro semanal del peso. Todas las manipulaciones se llevaron a cabo a mitad del día, cuando los organismos se encontraban en LO 12:12 y a mitad de su zona de reposo (no actividad), cuando los organismos se encontraban en condiciones de OO, en este ultimo caso se utilizo una lámpara de intensidad atenuada de LED de luz roja (5 lux), la cual no tiene efectos sobre el ritmo circadiano de actividad locomotriz en esta especie. Las manipulaciones para el mantenimiento no tuvieron efectos sobre el ritmo de actividad locomotriz en ninguna de las condiciones ambientales usadas.

Protocolo experimental

Con el fin de evaluar las diferencias en los patrones del ritmo circadiano de actividad locomotriz de animales macho obesos del ratón de los volcanes se utilizaron 36 ratones silvestres delgados (S-D) y 36 ratones silvestres obesos (S-O). Aunado a esto, se trabajó con un grupo de 21 ratones F1 delgados (F-D) y 18 ratones F1 obesos (F-O), con una edad de 7 a 9 meses. Inicialmente se sincronizó el ritmo a ciclos de LO 12:12 (fotofase de 06:00 a 18:00 h) durante al menos 10 días y después se cambió a una condición de OO por 10 días más.

Análisis de resultados

Los datos capturados durante el registro de actividad locomotriz fueron analizados con los programas ACTIVIEW (Mini mitter Co., Inc, USA) y DISPAC (Instituto de Fisiología Celular, UNAM). Todos los análisis se hicieron con los últimos 5 días de cada condición con el fin de evitar el efecto de posibles ciclos transitorios, que son ciclos durante los cuales la fase del ritmo no es estable, debido a que el sistema circadiano se ajusta a las nuevas condiciones (Pittendrigh & Daan, 1976). Los análisis estadísticos se hicieron con el paquete de cómputo Stat Graphics Centurion 16.1.05. Para comparar los grupos S-D vs S-O, F-D vs F-O se utilizó una prueba t de Student para muestras no pareadas. Las comparaciones entre ratones silvestres y F1 se realizaron con una prueba de ANOVA de una vía, aplicando un prueba post-hoc de Tukey. Por último, con el fin de conocer si los vectores promedio de la fase de inicio de actividad y acrofase¹⁴ son diferentes entre organismos delgados y obesos, se realizaron análisis de estadística circular de vector promedio y fueron comparados entre grupos con la prueba de Mardia Watson, con el paquete de cómputo ORIANA (3 Setup). En todos los casos se empleó un valor de probabilidad $p < 0.05$.

Sincronización

Con el fin de conocer si la arquitectura del ritmo de actividad locomotriz en *N. alstoni* bajo un ciclo de LO 12:12 es diferente entre animales delgados y obesos se determinaron los siguientes parámetros:

- a) El periodo del ritmo en presencia del ciclo ambiental, a través del periodograma¹⁵ de X^2 (Vega, 1993) que arroja el programa DISPAC. Se consideró que un organismo estaba sincronizado cuando mostraba un periodo de 24 h, además de un ángulo de fase estable.
- b) Los valores del promedio de actividad total, actividad en fotofase y en escotofase, así como el índice $r = \alpha / \rho$ (actividad en el día/actividad en la noche) y las acrofases. Todos los datos fueron obtenidos con los perfiles de actividad promedio graficados en ACTIVIEW.

¹⁴ **Acrofase** es el valor máximo del ritmo, es decir la cresta.

¹⁵ **Periodograma** herramienta estadística que permite evaluar el periodo a el cual se ajustan los datos por encima del nivel de significancia

- c) La relación de fase que se establece con el sincronizador (apagado de la luz) se calculó con la siguiente fórmula (Daan & Aschoff, 2001):

$$\Psi\Phi = \Phi T - \Phi E$$

En donde $\Psi\Phi$ representa la relación de fase entre el ritmo y el zeitgeber, ΦT es el apagado de la luz (18:00hrs) y ΦE corresponde al inicio de la actividad locomotriz.

Para determinar ΦE día a día, se analizó la matriz de datos de cada registro con un algoritmo diseñado en Excel que funcionó en el 92% de los casos. El algoritmo marcaba como ΦE el punto en el que por más de 60 minutos la actividad era mayor al promedio de actividad en la fotofase, permitiendo que hubiese un periodo de 10 minutos sin actividad. Todos los datos fueron corroborados posteriormente por ajuste visual (por tres observadores) sobre los actogramas de doble grafica¹⁶ obtenidos en ACTIVIEW.

Oscilación espontánea

En condiciones de oscuridad constante se determinó:

- a) El periodo endógeno (τ) a través del periodograma de X^2 (mediante DISPAC).
- b) Las proporciones promedio de actividad (α) y reposo (ρ). α fue considerado como la diferencia entre el final y el inicio de actividad, por su parte ρ se calculó como la diferencia entre el final de la actividad y el inicio de ésta en el ciclo siguiente.

Los valores de inicio de actividad (ΦE) se obtuvieron con el algoritmo descrito anteriormente; por su parte, el final de actividad (ΦM) se determinó con un algoritmo diseñado en Excel, el cual consistía en marcar como final de fase el punto en el que por más de 60 minutos la actividad era mayor al promedio de actividad durante el periodo de reposo, seguido de 60 minutos continuos con actividad menor al promedio de actividad en reposo, permitiendo que hubiese un periodo de 10 minutos sin actividad. En este caso el algoritmo funcionó en el 85% de los casos.

- c) Por último, los valores promedio de actividad durante α y ρ se obtuvieron ajustando la matriz de datos de cada animal a un día con una duración igual al valor

¹⁶ **Actograma** graficas de la actividad locomotriz por horas del día (eje x) contra días de registro (y). En el caso de las dobles graficas en el lado izquierdo se grafica el día anterior de manera que se tienen 48 horas de registro sobre el eje de las "x".

de τ obtenido. La nueva matriz fue graficada en ACTIVIEW. Para separar los periodos de actividad y reposo, se determinó el promedio de ΦE y ΦM con los algoritmos antes descritos. Después de lo cual se graficaron los perfiles de actividad promedio de los cuales se obtuvo los valores de α y ρ .

RESULTADOS

Peso y consumo de alimento

Al comparar el peso promedio de los individuos de *N. alstoni* (Fig. 2.3-A), se observa que existen diferencias significativas entre los fenotipos delgado y obeso de ambos grupos; S-D (50 ± 2 g) vs S-O (75.5 ± 4 g) y F-D (48 ± 2 g) vs F-O (68 ± 3 g). Por otra parte, se encontró que el grupo silvestre obeso presentó un peso mayor al observado en el grupo F1 obeso. La diferencia de pesos entre grupos fue confirmada por el índice de Lee (Fig. 2.4-B) en donde los organismos obesos presentaron valores mas altos en el índice de Lee (S-O = 348 ± 28 UA; F-O = 370 ± 7 UA), con respecto a lo organismos delgados (S-D = 272 ± 18 UA; F-D = 300 ± 5 UA); en este caso, también se encontraron diferencias entre el grupo silvestre y F1 de el fenotipo delgado.

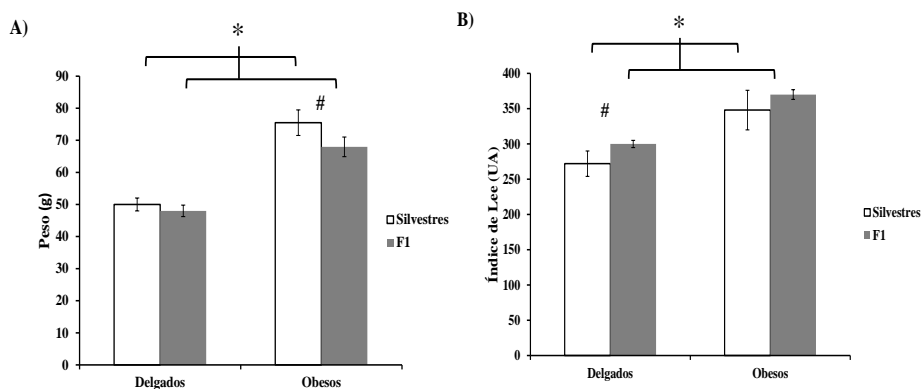


Figura 2.3. A) Media del peso corporal ± 2 e. e., y B) media del índice de Lee ± 2 e. e. Las barras claras representan el grupo de silvestres (S-D, n=36 y S-O, n=34) y las barras grises el grupo de F1, (F-D, n=21 y F-O, n=18). *: diferencia significativa ($p < 0.05$) entre delgados vs obesos. #: diferencias significativas entre F1 vs silvestres del mismo fenotipo ($p < 0.05$).

Paralelo a estos experimentos, se realizó un monitoreo de consumo de alimento en machos silvestres de *N. alstoni*. En este caso se midió el consumo durante la fase de luz y oscuridad por 2 semanas, con el fin de determinar si existían variaciones en la ingesta de alimento entre organismos delgados y obesos. Sin embargo no se encontraron diferencias significativas en el consumo de alimento en el día y la noche, entre los fenotipos (Fig. 2.5).

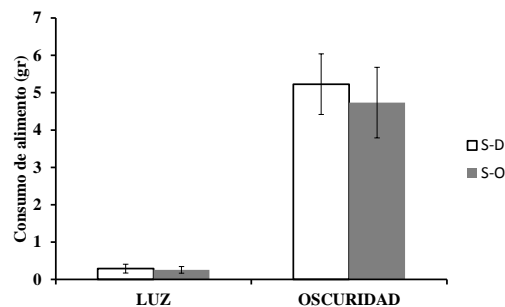


Figura 2.4. Media del consumo de alimento en gramos ± 2 e. e. en machos silvestres delgados (S-D, n = 10) y obesos (S-O, n=10).

Sincronización a ciclos LO 12:12

El ritmo circadiano de actividad locomotriz de ratones macho de la especie *N. alstoni* se sincronizó a ciclos LO 12:12, sin presentar diferencias significativas entre el periodo de animales delgados (S-D, $T=24\pm 0.02$ h; F-D, $T=24\pm 0.04$ h,) y obesos (S-O, $T=24\pm 0.04$ h; F-O, $T=24\pm 0.05$ h). De los animales silvestres obesos, dos organismos de 36, no se sincronizaron presentando periodos de 22 h y 25.5 h, por lo cual no se utilizaron para los análisis siguientes.

Al comparar los parámetros del perfil de actividad locomotriz (Fig. 2.5), no se encontraron diferencias significativas en los valores promedio de actividad total, actividad en fotofase (luz) o en escotofase (oscuridad) entre los grupos S-D y S-O. Sin embargo, el grupo F-D presentó mayor actividad promedio total y en la escotofase, con respecto a los grupos S-D y F-O (Fig. 2.6).

Por su parte no se encontraron diferencias significativas en el índice r (actividad en la fotofase / actividad en la escotofase) (Fig. 2.5), lo que nos indica que animales delgados y obesos de ambos grupos se comportan como típicamente nocturnos.

	S-D	S-O	F-D	F-O	p<0.05
Actividad Promedio	24±13	18±4	67±22	34±16	*#
Actividad en la fotofase	4±2	5±2	14±8	10.5±7	*
Actividad en la escotofase	46±25	31.5±8	120±40	57±25	*#
Índice r	0.13±0.03	0.17±0.04	0.13±0.05	0.15±0.05	

Tabla 2.5.- Muestra la comparación de los valores de las medias \pm 2 e. e. de los parámetros de actividad en condiciones de LO 12:12 del ritmo circadiano de actividad locomotriz en la especie *N. alstoni*, entre silvestres delgados (S-D, n=36), silvestres obesos (S-O, n=34), F1 delgados (F-D, n=21) y F1 obesos (F-O, n=18). Los valores de actividad están dados en movimientos promedio por unidad de muestreo (10 min). *:diferencia significativa entre animales delgados y obesos; #: diferencia entre animales silvestres y F1.

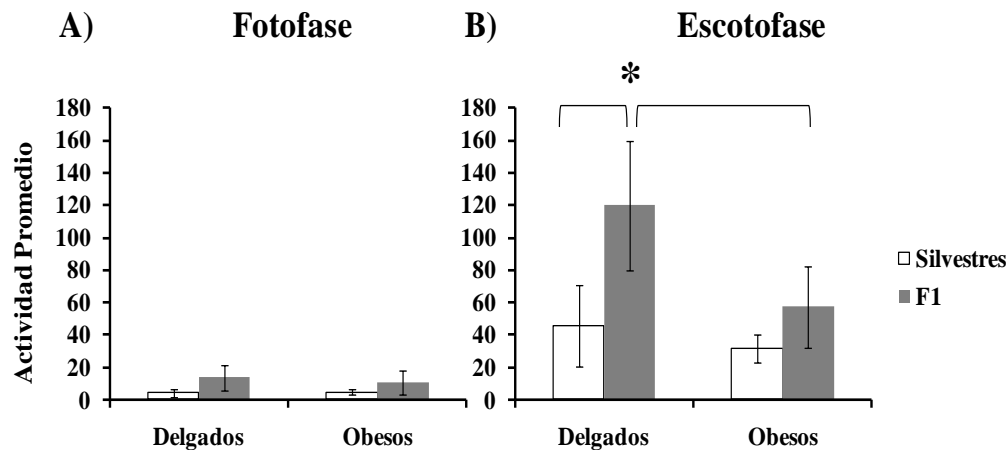


Figura 2.6.- Actividad promedio \pm 2 e. e. en fotofase (A) y escotofase (B) del ritmo de actividad locomotriz de ratones *N. alstoni* machos sincronizados a un ciclo LO 12:12. Las barras claras representan el grupo de silvestres (S-D, n=36 y S-O, n=34) y las barras grises el grupo de F1, (F-D, n=21 y F-O, n=18). Los valores de actividad están dados en movimientos promedio por unidad de muestreo (10 min). *: diferencia significativa (p < 0.05) entre los grupos indicados.

En la Figura 2.7 se muestran actogramas y curvas de actividad promedio de machos sincronizados a un ciclo LO 12:12; silvestres delgados (Fig. 2.7--A), silvestres obesos (Fig. 2.7-C), F1 delgados (Fig. 2.7-B) y F1 obesos (Fig. 2.7-D). Se puede observar que el grupo F-D presenta mayor actividad durante la escotofase con respecto al resto de los grupos.

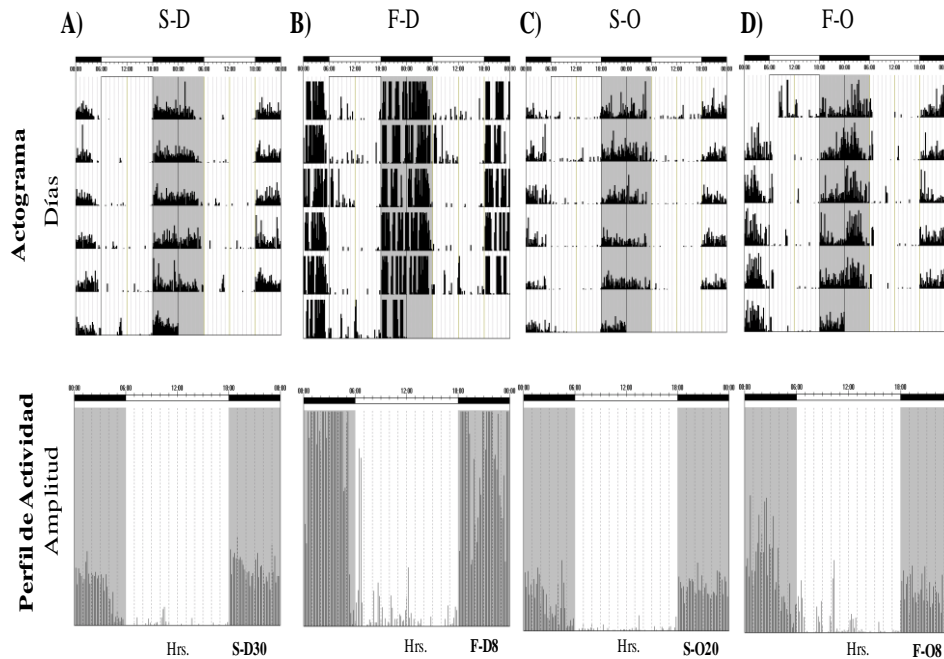


Figura 2.7- Actogramas representativos del ritmo circadiano de actividad locomotriz de machos de *N. alstoni*. Panel superior: actogramas de gráfica doble; en el eje x se representan 48 h de registro continuo y en el eje y días de registro. Panel Inferior: Perfiles de actividad promedio en LO 12:12. A) silvestre delgado, B) F1 delgado, C) silvestre obeso, D) F1 obeso. La barra superior en ambos paneles indica los periodos de luz (clara) y oscuridad (negra). La etiqueta al final de cada columna corresponde al individuo registrado. Los actogramas y perfiles de actividad fueron graficados tomando como máximo de actividad 120 conteos/10 minutos.

Con respecto a la relación que se establece entre el sincronizador y el ritmo endógeno (Fig. 2.8), no se encontraron diferencias entre animales delgados y obesos. Sin embargo se observa que Ψ en ratones silvestres tiene valor negativo (S-D: $\Psi = -16 \pm 2$ min; S-O: $\Psi = -20 \pm 7$ min), es decir, el inicio de la actividad se da después del apagado de la luz, mientras que en animales F1 es positivo (F-D: $\Psi = 0.3 \pm 7$ min; F-O: $\Psi = 5 \pm 7$ min).

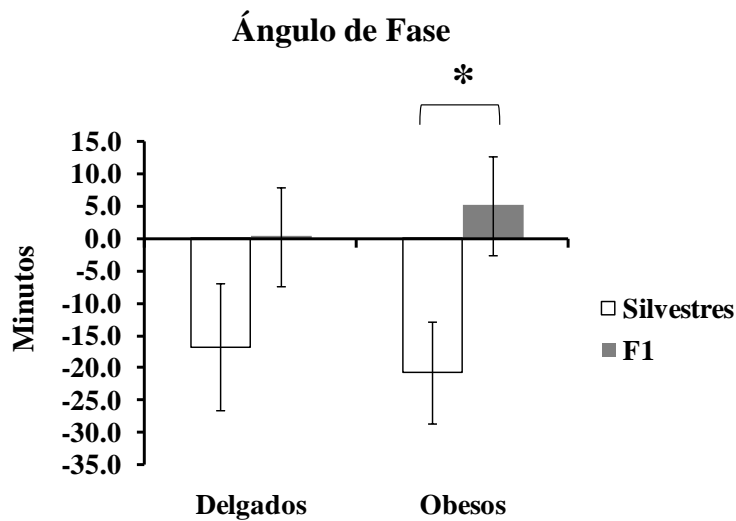


Figura 2.8. Promedio del ángulo de fase en minutos ± 2 e. e. del ritmo de actividad locomotriz bajo un ciclo LO 12:12. Las barras claras representan el grupo de animales silvestres (S-D, n=36 y S-O, n=34) y las barras grises el grupo de animales F1 (F-D, n=21 y F-O, n=18). El * indica diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos indicados. Si la relación de fase es positiva el inicio de actividad precede al apagado de la luz, si en negativa se da después del apagado de la luz.

El análisis de estadística circular (Fig. 2.9-A) mostró diferencias ($p < 0.05$, prueba de Mardia Watson) entre inicios de actividad de los grupos S-D ($18:15 \pm 00:10$) *vs* F-D ($17:57 \pm 00:08$) y S-O ($18:20 \pm 00:06$) *vs* F-O ($17:54 \pm 00:08$). Los organismos silvestres (S-D y S-O) inician su actividad después del apagado de la luz mientras que en los animales F1 (F-D y F-O) el apagado de la luz coincide con el inicio de la actividad.

Por último, al analizar los datos de acrofase (Fig. 2.9-B) se observa que los vectores promedio se encuentran alrededor de las 23:30 (S-O: $23:23 \pm 00:24$; F-D: $23:25 \pm 00:28$; F-O: $23:24 \pm 00:36$). El único grupo que presentó diferencias significativas fue S-D ($22:43 \pm 00:14$). Un punto importante es que, en los organismos silvestres, la acrofase presenta una dispersión mayor de los datos con respecto a los grupos de animales F1.

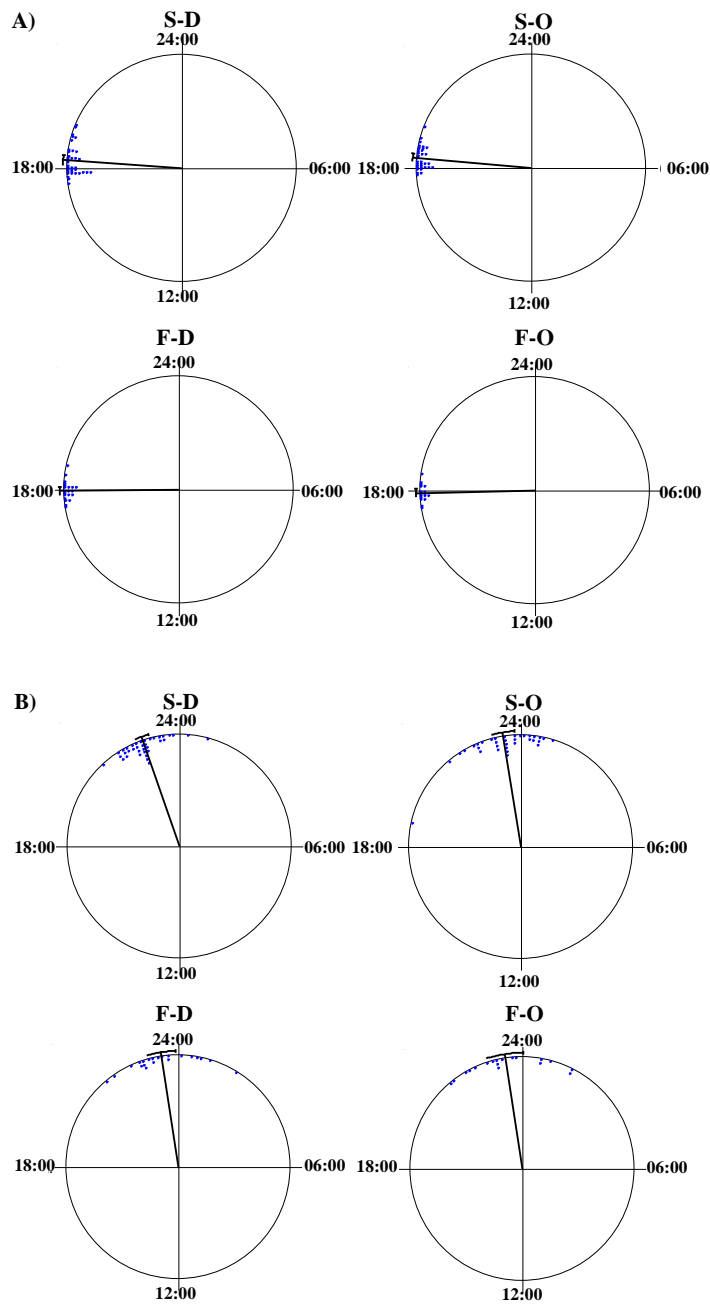


Figura 2.9.- Fases del ritmo circadiano de actividad locomotriz del ratón de los volcanes sincronizados a un ciclo LO 12:12. A) Gráficas circulares del inicio de actividad. B) Gráficas circulares de la acrofase. A) S-D (n=36). S-O (n=34). F-D (n=21) F-O (n=18). Los puntos azules representan la fase de un individuo y las líneas negras el vector promedio.

En la figura 2.10 se muestran actogramas del ritmo circadiano de actividad locomotriz del ratón de los volcanes sincronizados a ciclos LO 12:12. Los animales silvestres inician su actividad 15 minutos después del apagado de la luz (Fig. 2. -A, B) mientras que en los animales F1 el inicio de actividad coincide con el apagado de la luz (Fig. 2.10-C, D). Por otra parte se puede ver que la acrofase de actividad ocurre cercana de las 24:00 h (Fig. 2.10-B, C, D), excepto en el actograma del animal S-D, en donde se presenta 1 h antes (Fig. 2.10-A).

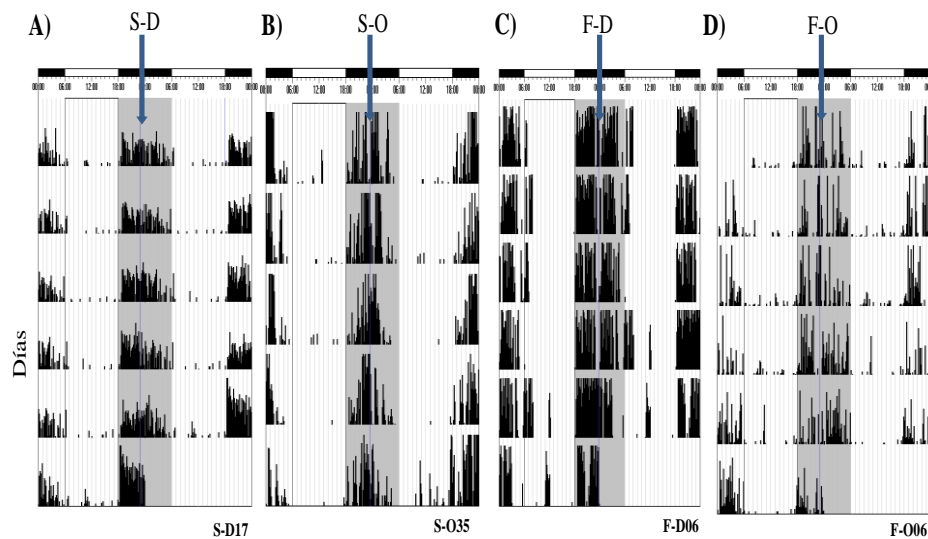


Figura 2.10.- Actogramas de gráfica doble del ritmo circadiano de actividad locomotriz de machos obesos de *N.alstoni*. En el eje x se representan 48 h de registro continuo y en el eje y los días de registro. La barra superior indica las fases de luz (clara) y oscuridad (negra). A) Silvestre delgado B) Silvestre obeso C) F1 delgado. D) F1 obeso. La flecha azul indica la línea de la hora promedio de acrofase. La etiqueta al final de cada columna corresponde al individuo registrado.

Oscilación espontánea

Bajo condiciones de oscuridad constante el periodo endógeno del ritmo de actividad no presentó diferencias significativas entre animales delgados S-D ($\tau=23.7\pm 0.1$ h; Fig. 2.11-A), F-D ($\tau=23.7\pm 0.08$ h; Fig. 2.11-B) y obesos S-O ($\tau=24.1\pm 0.3$ h; Fig. 2.11-C), F-O ($\tau=24.1\pm 0.5$ h; Fig. 2.11-D). Sin embargo, los grupos S-O (Fig. 2.12-A) y F-O (Fig. 2.12-B) presentan una frecuencia más alta de individuos con periodos mayores a las 24hrs con respecto a los ratones delgados (S-D Fig. 2.12-A, F-D Fig. 2.12-B).

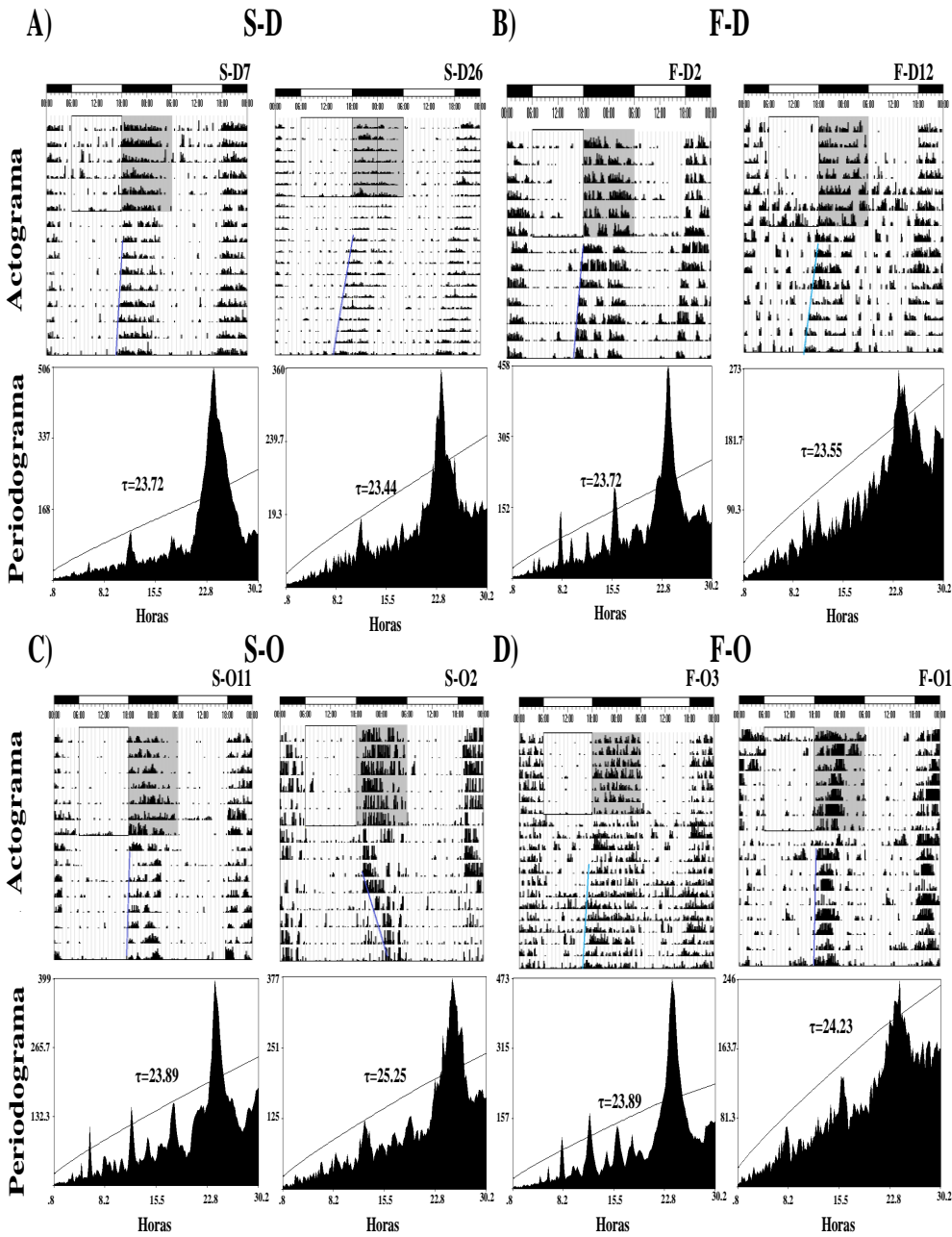


Figura 2,11.- Actogramas de gráfica doble (parte superior) representativos del ritmo circadiano de actividad locomotriz de machos del ratón de los volcanes. La barra superior indica las fases de luz (clara) y de oscuridad (negra). En la parte inferior se muestra el periodograma correspondiente a la condición de OO. A) Silvestre delgado B) Silvestre obeso C) F1 delgado. D) F1 obeso. La etiqueta en la parte superior del actograma corresponde al individuo registrado.

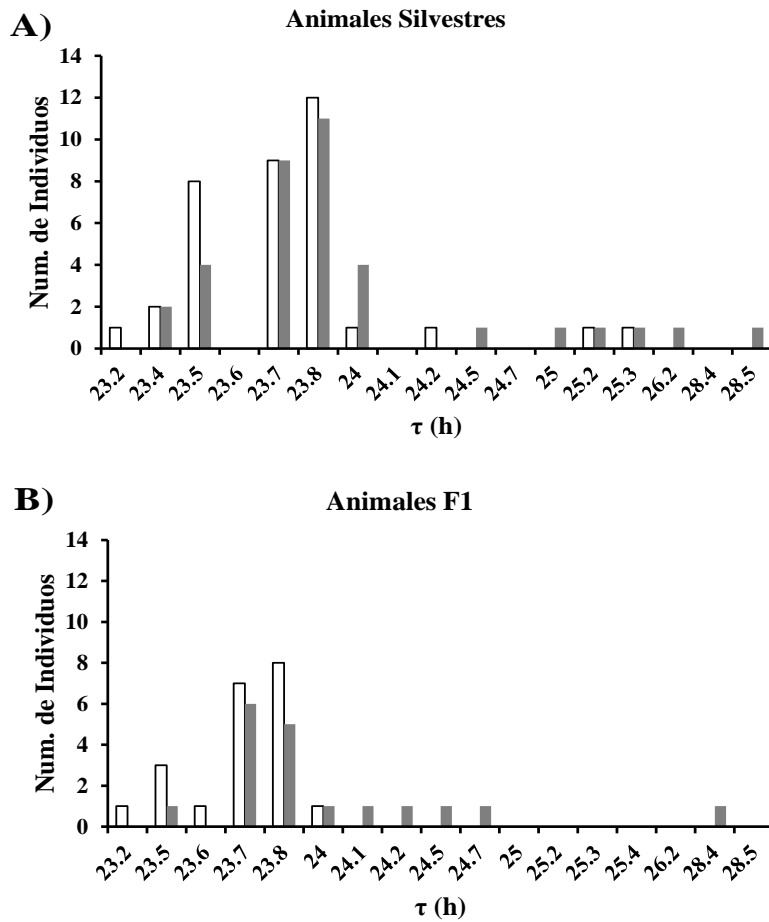


Figura 2.12.- Histogramas de frecuencia de periodos del ritmo espontáneo de actividad locomotriz encontrados en los animales silvestres (A) y F1 (B) de la especie *N. alstoni*. Las barras claras representan a los organismos delgados y las barras grises animales obesos. Los obesos presentan mayor cantidad de casos con periodos largos.

Al analizar las proporciones de actividad durante las fases de actividad (α) y de reposo (ϱ) del ciclo espontáneo (Fig. 2.13-A) se encontró que los animales silvestres presentan una duración proporcional de ϱ significativamente mayor (S-D 13:13±00:30 h, S-O 13:08±00:26 h) con respecto a la duración de α (S-D 10:27±00:30 h, S-O 10:36±00:27 h). En el caso de los organismos F1 la duración proporcional de α y ϱ fue parecida entre F-D (α =11:35±00:35 h, ϱ =12:06±00:35 h) y F-O (α =12:19±00:55 h, ϱ =11:27±00:57 h). Es decir, existe una tendencia al aumento en la duración de la fase de actividad en los organismos F1 con respecto a los silvestres. Lo anterior puede observarse en los actogramas de la figura 2.11 en donde los

organismos silvestres (S-D Fig. 2.11-A, S-O Fig. 2,11-B) tienen en general menos horas de actividad en comparación con los organismos F1 (F-D Fig. 2.11-C, F-O Fig. 2.11-D).

Por lo que respecta a la cantidad promedio de actividad (Fig. 2.13-B), no se encontraron diferencias significativas entre los grupos durante el periodo de reposo (S-D=9±7 bin, S-O=6±1 bin, F-D=17±5 bin, F-O= 9±4 bin), mientras que en el periodo de actividad el grupo F-D se caracterizó por ser significativamente más activo (S-D=52±29 bin, S-O=32±9 bin, F-D=111±37 bin, F-O=65±36 bin).

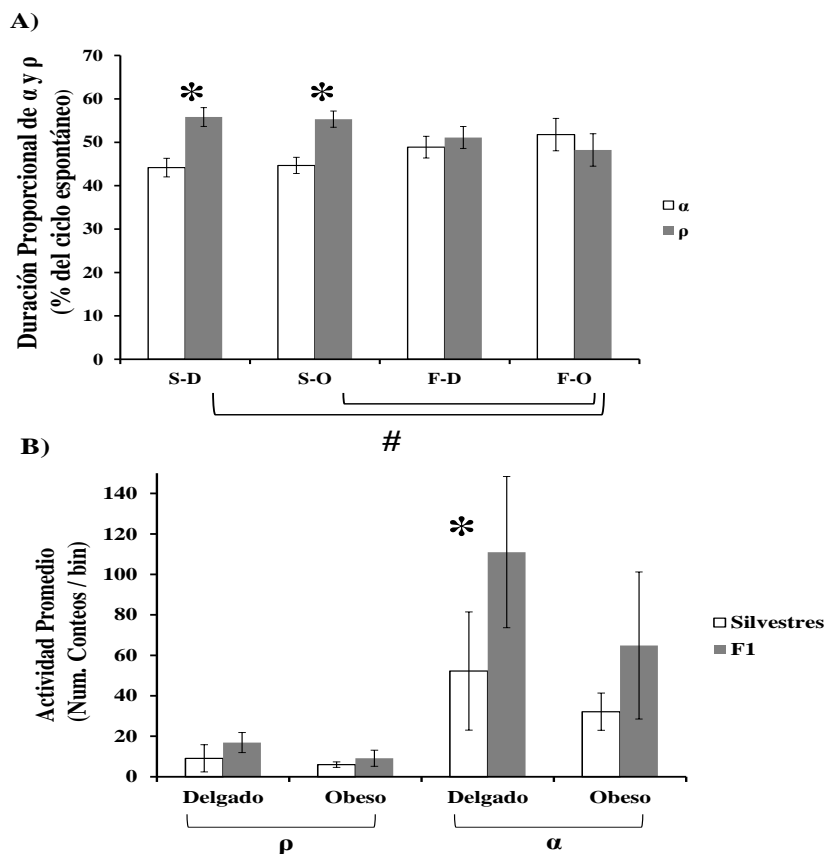


Figura 2.13.- A) Gráfica de duración proporcional de las fases de actividad (α ; barras claras) y de reposo (ρ ; barras oscuras) del ritmo de actividad locomotriz en OO. S-D (silvestres delgados n=36), S-O (silvestres obesos, n=34), F-D (F1 delgados, n=21) y F-O (F1 obesos, n=18). *: diferencia significativa ($p < 0.05$) entre α y ρ del mismo grupo; #: diferencia entre los grupos indicados. B) Gráfica de la actividad promedio ± 2 e. e. en α y ρ . Las barras claras representan al grupo de animales silvestres y las barras grises al grupo F1. Los valores de actividad están dados en eventos por unidad de muestreo. *: diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre las 2 barras contiguas.

DISCUSIÓN

Los seres vivos presentan variaciones diarias en muchos de sus procesos metabólicos, las cuales son conducidas por el sistema circadiano, que es el encargado de la organización temporal en los parámetros fisiológicos y conductuales de los organismos. Por otra parte, se ha demostrado que el metabolismo también puede afectar el funcionamiento de este sistema (Delezie & Challet, 2011; Froy, 2010; Green et al., 2008). Como se mencionó en el Capítulo 1, el ratón de los volcanes es un animal que bajo condiciones de cautiverio presenta una tendencia a desarrollar obesidad, la cual va acompañada de desórdenes metabólicos como hiperleptinemia, hiperinsulinemia e intolerancia post-prandial a la glucosa (Carmona-Alcocer et al., 2012, *Anexo 1*; Fuentes-Granados, 2011).

En este estudio se observó que animales silvestres y F1 mantenidos en cautiverio con una dieta regular para roedores desarrollan obesidad en un 50 a 60% de su población, como lo reportado en otros estudios (Carmona-Castro, 2006). Sin embargo cuando se compara el peso entre animales silvestres y F1 con fenotipo obeso (Fig. 2.3-A), se observa que los animales F1 tienen un peso significativamente menor, esta variación en el peso alcanzado en animales F1 con fenotipo obeso podría deberse a que en las poblaciones naturales la disponibilidad de alimento suele ser un factor limitante, por lo que cambios en el estado nutricional de las madres o en las primeras etapas del desarrollo de los individuos podrían favorecer el desarrollo de obesidad en la etapa adulta (Canani et al., Gluckman & Hanson, 2008).

Otra forma de determinar el fenotipo obeso en roedores es utilizar índice de Lee, el cual considera la longitud naso anal y el peso del individuo (Ernsberger et al., 1999; Rogers & Webb, 1980). En el caso de *N. alstoni* el índice de Lee confirmó la diferencia entre los grupos delgados y obesos (Fig. 2.3-B). En este caso, las diferencias encontradas entre obesos del grupo silvestre y F1 no se observaron al tomar en cuenta este índice. Por lo que esta diferencia puede ser debida a una mayor variabilidad en la talla de los organismos silvestres, lo que también explicaría la mayor variabilidad encontrada para el caso de organismos silvestres. Así, si bien el peso, es un indicador importante del fenotipo obeso, el uso del índice de Lee para determinar obesidad en roedores parece ser más preciso.

Un punto interesante es que no se encontraron diferencias significativas en el consumo de alimento en la fase de luz y oscuridad (Fig. 2.4), a diferencia de lo observado en otros modelos de obesidad, en donde se ha reportado una asociación entre la obesidad y un mayor consumo diurno de alimento (Fukagawa et al., 1992; Turek et al., 2005). Sin embargo, en humanos y en algunos modelos de obesidad la conducta de hiperfagia no siempre está presente en la condición de obesidad y en este caso el incremento en peso se ha asociado a una disminución en el gasto de energía (Devalaraja-Narashimha y Padanilam, 2010; Segal, 1990). Por lo que un menor gasto energético podría ser el responsable de la obesidad en *N. alstoni*.

A pesar de que se existen estudios sobre algunas de las alteraciones metabólicas presentes en animales obesos de la especie *N. alstoni* (Carmona-Castro, 2006; Diego-Magaña, 1999; Fuentes-Granados, 2011); este es el primer estudio que se realiza sobre la relación entre la obesidad y alteraciones en el sistema circadiano en esta especie.

Los resultados muestran que los animales obesos de la especie *N. alstoni* sincronizan sus ritmos circadianos de actividad locomotriz a los ciclos LO 12:12 (Fig. 2.7). En el caso del grupo F1 se presentando una disminución de la actividad en el periodo de oscuridad en el caso del fenotipo obeso (Fig. 2.6, 2.7), como lo observado en otros modelos de obesidad (Mendoza et al., 2008; Murakami et al., 1995; Turek et al., 2005). Sin embargo este efecto no se encontró en organismos silvestres.

El hecho de no encontrar diferencias de amplitud entre organismos silvestres, puede ser una consecuencia de la variabilidad en la historia previa de los organismos, que incluye factores como la edad; la cual se ha demostrado tiene efectos sobre la expresión de los ritmos circadianos (Kolker et al., 2004; Possidente et al., 1995; Scarbrough et al., 1997). Por otra parte, este cambio en la amplitud, también se ha encontrado entre hembras delgadas y obesas de *N. alstoni* (Carmona-Alcocer et al., 2012, *Anexo 1*), lo que confirma que la obesidad puede estar asociada a una disminución en la amplitud del ritmo de actividad locomotriz.

Las razones por las que la condición obesidad podría estar asociada a una disminución en la amplitud de la actividad locomotriz no son claras. En este sentido, se sabe que señales metabólicas como la leptina pueden actuar a nivel del NSQ a través de sus receptores (Elmqvist et al., 1998; Guan et al., 1997), provocando cambios en el potencial de membrana de las células (Inyushkin et al., 2009). Además, inyecciones intraventriculares de leptina en

animales sin alteraciones metabólicas pueden llevar a una disminución de la actividad locomotriz en el periodo de oscuridad (Mendoza et al., 2011), como lo observado en animales F1 obesos de *N. alstoni*. Sin embargo, la interpretación de los resultados debe ser cuidadosa; ya que si bien se ha encontrado un estado de hiperletínemia en animales silvestres obesos (Carmona-Alcocer et al., 2012, *Anexo 1*), estos no presentan cambios en la amplitud, por otra parte la condición de obesidad suele estar asociado a un estado de resistencia a la leptina (Banks et al., 1999; Bays et al., 2008; Henry et al., 2012). Por lo cual se vuelve importante dilucidar el efecto de señales metabólicas como la leptina en animales obesos. Por último, no podemos descartar que la disminución en la actividad sea un estado que precede al desarrollo de la obesidad en esta especie.

Al analizar la relación de fase que se establece entre el ritmo de actividad locomotriz y el sincronizador, se observa que el inicio de actividad precede al apagado de la luz en animales silvestres, mientras que en organismos F1 coincide con el apagado de la luz (Fig. 2.8). En el caso de machos de *N. alstoni* no se encontraron efectos de la obesidad sobre la relación de fase, contrario a lo observado en hembras silvestres de esta especie (Carmona-Alcocer et al., 2012, *Anexo 1*). Así, la relación de fase que *N. alstoni* establece con ciclos luz-oscuridad puede cambiar por factores como la obesidad, el sexo y las condiciones ambientales en las que se ha desarrollado el organismo, tal como se ha reportado para otras especies (Benloucif et al., 1997; Calisi & Bentley, 2009; Fukagawa et al., 1992; Mistlberger & Holmes, 2000), poniendo de manifiesto una gran plasticidad en el sistema circadiano. El hecho de presentar una amplia variabilidad en las relaciones de fase establecidas con los ciclos luz oscuridad, podría facilitar el adaptarse a diferentes condiciones ambientales (Pittendrigh & Daan, 1976b).

En condiciones de oscuridad constante, no se observaron diferencias significativas en τ entre animales delgados y obesos. Sin embargo, entre los animales obesos se presentaron más casos de periodos endógenos largos (Fig. 2.11, 2.12). El alargamiento en τ se ha reportado en otros modelos de obesidad y se ha interpretado como cambios en la fuerza de acoplamiento del sistema circadiano (Kohsaka et al., 2007; Mendoza et al., 2008; Murakami et al., 1995). Los cambios de periodo (τ) también se han reportado en casos como el envejecimiento (Kolker et al., 2004; Possidente et al., 1995; Scarbrough et al., 1997), en donde se han atribuido a una deficiencia en la señal de la melatonina (Benloucif et al., 1997; Reeth et al., 2001), hormona que es considerada uno de los mecanismos de acoplamiento entre las neuronas del NSQ y entre el

NSQ y los osciladores periféricos (Ibata et al., 1999). El hecho de que los animales con fenotipo obeso del grupo silvestre y F1 presenten un mayor número de individuos con periodos largos descarta la posibilidad de que el alargamiento de periodo observado sea una consecuencia de la edad.

Otra posibilidad sería que la mayor frecuencia de periodos largos observada en los fenotipos obesos se ha debida a un cambio en el acoplamiento entre los osciladores (Pittendrigh & Daan, 1976b). Las condiciones que pueden llevar a un desacoplamiento entre los osciladores encargados de generar los ritmos son diversas e incluyen: condiciones de iluminación constante (de la Iglesia et al., 2000; Ohta et al., 2005); así como, deficiencias en señales de acoplamiento en el NSQ, en este sentido se ha reportado que animales con deficiencias funcionales de VIP o de su receptor se presenta una mayor variabilidad en τ (Aton et al., 2005).

Un punto a resaltar son las diferencias encontradas entre animales silvestres y animales nacidos en bioterio. Así, en ciclos de luz-oscuridad, se encontró que los inicios de fase y las acrofases del ritmo de actividad locomotriz (Fig. 2.9, 2.10) son más precisos en animales silvestres comparados con animales de bioterio. Por lo que respecta a organismos registrados en condiciones de oscuridad constante, los animales silvestres tienen menor número de horas de actividad (α) (Fig 3.9-3.10). Las diferencias entre animales silvestres y de bioterio se han reportado en otros estudios (Calisi & Bentley, 2009) que muestran que los patrones rítmicos de actividad suelen ser más precisos en animales silvestres (Urrejola et al., 2005) y las proporciones de α y ϱ pueden cambiar (Rattenburg et.al., 2008). Esto es similar a lo observado en *N. alastoni* en donde los animales silvestres presentan una mayor proporción de ϱ , mientras que en organismos F1 se observa una proporción igual de α y ϱ . Lo anterior se ha interpretado como un fenómeno de plasticidad del sistema circadiano y pone de manifiesto la importancia de las presiones ambientales en la plasticidad de los patrones rítmicos observados (Calisi & Bentley, 2009).

Así, en este estudio encontramos que los patrones rítmicos de actividad locomotriz en condiciones de luz-oscuridad y en condiciones de oscilación espontánea pueden verse modificados por condiciones como la obesidad y las condiciones ambientales en las cuales se desarrollan los individuos. A pesar de las diferencias encontradas entre el grupo de silvestres y

F1, hubo cambios en los patrones rítmicos que fueron consistentes en todos los organismos con un fenotipo obeso como una mayor número de individuos con periodo largo en condiciones de oscuridad constante por lo que es probable que los animales obesos presenten cambio en la sensibilidad del sistema circadiano a pulsos de luz.

CAPITULO 3: EFECTOS DE LA OBESIDAD SOBRE LA CAPACIDAD DE SINCRONIZACIÓN NO PARAMÉTRICA A LA LUZ

MODELOS DE SINCRONIZACIÓN

Existen diversos estímulos capaces de ajustar los ritmos circadianos, entre los que encontramos la disponibilidad de alimento (Stephan, 2002), señales sociales (Mistlberger & Skene, 2004) y los ciclos de luz oscuridad (Golombek & Rosenstein, 2010; Morin & Allen, 2006). Sin embargo, la señal más poderosa es la alternancia entre la luz y la oscuridad. Con base en los estudios de la influencia de la luz sobre el sistema circadiano se han propuesto dos modelos para explicar el mecanismo por el cual los relojes circadianos se sincronizan a los ciclos ambientales (Aschoff, 1960; Daan & Pittendrigh, 1976; 1976b; Johnson et al., 2003).

Sincronización paramétrica

El modelo de sincronización paramétrica o continua se basa en observaciones experimentales en las que el periodo τ se modifica dependiendo de la intensidad de la luz aplicada. Este modelo se enfoca en los cambios graduales en la intensidad y duración de los estímulos que existen en el medio ambiente, y propone que el zeitgeber genera aceleraciones y desaceleraciones continuas en la velocidad angular del reloj biológico, en este sentido el ajuste al ciclo de luz –oscuridad es continuo, presentándose una aceleración de τ en el día y desaceleraciones en la noche (Aschoff, 1960)

Sincronización no paramétrica

Por su parte, el modelo no paramétrico, también llamado discreto, propone que son los efectos ambientales transitorios, semejantes al amanecer y anochecer, los responsables de la sincronización.

Este modelo asume que el efecto principal del zeitgeber para ajustar el ritmo circadiano se ejerce por pulsos de la señal sincronizadora, aplicados en diferentes momentos del ciclo circadiano; por lo que un breve pulso presentado de manera periódica es capaz de ajustar el ritmo. En este caso, el ajuste del ritmo se da por que los pulsos de luz provocan cambios en la fase del ritmo ya se adelantándolo o retrasándolo, por lo que la sincronización con el ciclo ambiental se alcanza cuando el cambio en la fase del ritmo iguala a la diferencia entre el

periodo ciclo ambiental y el periodo endógeno (Daan & Pittendrigh, 1976; Johnson et al., 2003; Pittendrigh, 1993). Así se demostró que los organismos eran capaces de sincronizar su ritmo de actividad locomotriz a un pulso de luz diario o a dos pulsos que simulaban el amanecer y el anochecer (Daan & Pittendrigh, 1976; Pittendrigh & Daan, 1976).

LA CURVA DE RESPUESTA DE FASE (CRF)

Los elementos esenciales para entender el modelo de sincronización no paramétrico son el periodo en libre curso y la Curva de Respuesta de Fase (CRF) (Daan & Pittendrigh, 1976). Cuando un organismo se encuentra en condiciones constantes los pulsos del sincronizador pueden provocar tres respuestas por parte del sistema circadiano (Fig. 3.1):

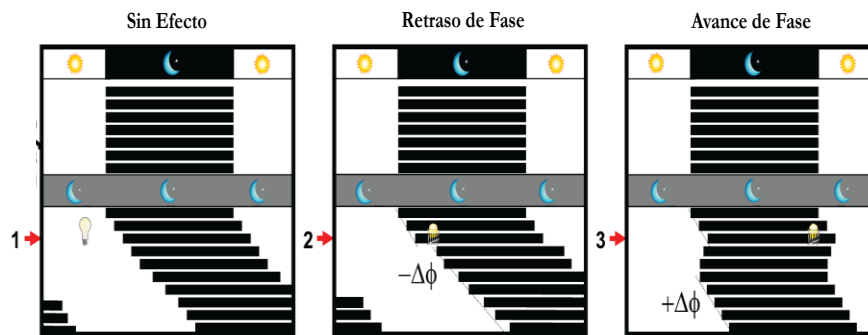


Figura 3.1.- Esquema de los posibles efectos de un pulso de luz en el ritmo circadiano de actividad locomotriz (Modificado de Golombek & Rosenstein, 2010). Las rayas representan la actividad. $\Delta\Phi$ es el cambio de fase.

- a) Que el ritmo en libre curso no se altere y, por lo tanto, que el marcador de fase ocurra a la hora prevista.
- b) Que ocurra un retraso de fase y que el marcador de fase se presente después de lo previsto.
- c) Que se presente un adelanto de fase y el marcador de fase se observe antes de lo previsto.

Las respuestas descritas arriba son las que permiten al sistema circadiano ajustar τ con el periodo del zeitgeber. La CRF es la forma gráfica de indicar la magnitud y la dirección de un cambio de fase inducido por un estímulo, en función de la hora circadiana en la cual se aplicó el mismo. Por convención, los avances de fase son expresados como valores positivos y los retrasos como valores negativos (Daan & Aschoff, 2001; Daan & Pittendrigh, 1976).

Construcción de la CRF

La construcción de la CRF se basa en dos aspectos: el primero, es que los pulsos de un sincronizador como la luz provocan cambios en el sistema circadiano y el segundo es que los cambios que se producen en el sistema dependen de la sensibilidad diferencial ante el mismo estímulo a lo largo del ciclo.

Existen diferentes métodos para obtener la CRF de un ritmo como la actividad locomotriz, los cuales fueron propuestos por Aschoff en 1965. La estrategia más utilizada consiste en colocar a los organismos bajo condiciones de oscuridad constante para, después de varios días en oscilación espontánea, dar un pulso del estímulo (luz) en una fase predeterminada del ritmo registrado. Posteriormente se deja a los organismos en condiciones de oscuridad constante por varios días más, con el fin de evaluar el cambio de fase. Algunos puntos importantes a considerar se muestran en la Fig. 3.2:

- Al aplicar un estímulo, la nueva fase se observa después de un número de ciclos transitorios que son los ciclos necesarios para que el cambio de fase se establezca plenamente.
- En condiciones de libre corrimiento no se tiene referencia temporal externa, por lo que se habla de un tiempo circadiano (TC). Se establece un “día subjetivo” que corresponde a la fase del ciclo que en condiciones naturales estaría expuesta al periodo de luz y por el contrario una “noche subjetiva” que corresponde a la fase del ritmo que estaría expuesta a la oscuridad. En un animal nocturno el inicio de la actividad locomotriz marca el comienzo de la noche subjetiva, esta fase se denomina TC 12.

- Por último es importante considerar que la magnitud del cambio de fase depende de la intensidad y duración del estímulo (Daan & Pittendrigh, 1976; Johnson, 1999; Johnson et al., 2003).

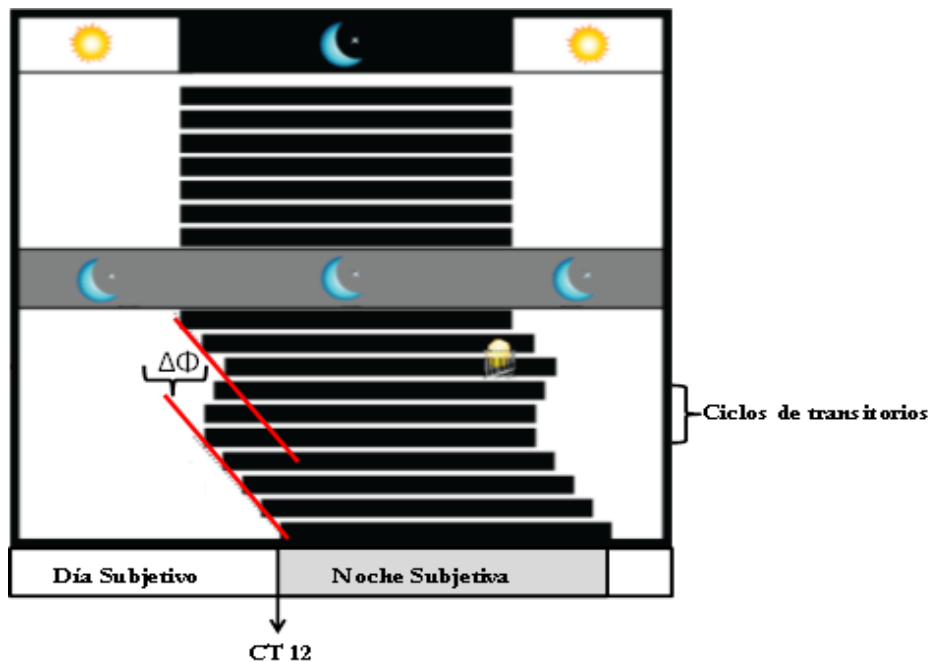


Figura 3.2.- Consideraciones para calcular un cambio de fase (Modificado de Golombek & Rosenstein, 2010)

Características de la CRF

En todas las especies estudiadas hasta el momento se ha confirmado que las características de la curva de respuesta de fase (CRF) a la luz son similares, independientemente de los hábitos diurnos o nocturnos de la misma (Johnson, 1990). Así la respuesta del sistema circadiano a un pulso de luz se caracteriza por presentar tres zonas (Fig. 3.3):

- a) Zona de atrasos de fase, que corresponde a la noche subjetiva temprana.
- b) Zona de avances de fase, que corresponde a la noche subjetiva tardía.

c) Zona muerta, en la cual el sistema circadiano es insensible a la luz y se presenta en el día subjetivo

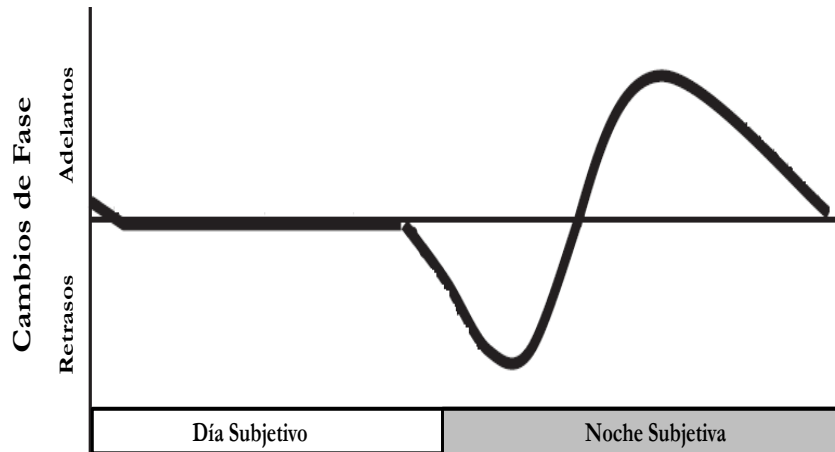


Figura 4.3.- Forma general de la CRF para pulsos de luz.

A pesar de que la forma de la CRF es parecida en todas las especies, existen diferencias intraespecíficas e interespecíficas en la magnitud de los cambios de fase. Se ha sugerido una relación entre el periodo del ritmo (τ) y la CRF, en donde animales con periodos cortos tienen una proporción retrasos/avances mayor con respecto a especies con periodos largo (Daan y Pittendrigh, 1976; Johnson, 1999; Johnson et al., 2003) .

MECANISMOS DE SINCRONIZACIÓN A LA LUZ

Para la sincronización es importante que la información llegue al NSQ; en el caso de mamíferos la luz ambiental es detectada en la retina a través de células fotorreceptoras. Estudios en roedores mutantes de conos y bastones demostraron que la capacidad de sincronización se mantiene a pesar de la ausencia de los fotorreceptores clásicos (Foster et al.,

1991; Freedman et al., 1999). Algunas líneas de evidencia apuntan a que la información luminosa que llega al NSQ es transducida por un grupo de células ganglionares fotosensibles (Berson et al., 2002; Hattar et al., 2002; Provencio et al., 2002). Entre los fotopigmentos responsables de percibir la información luminosa se ha propuesto a la melanopsina (Güler et al., 2008; Hattar et al., 2002; Mrosovsky & Hattar, 2003) y los criptocromos (Thresher et al., 1998). En el caso de la melanopsina se ha demostrado que se requiere para la sincronización de los ritmos a los ciclos luz-oscuridad (Hattar et al., 2003; Panda et al., 2003), sin embargo animales carentes de melanopsina conservan cierta capacidad de sincronización (Doyle et al., 2008; Peirson et al., 2004), por lo que deben existir otros fotopigmentos circadianos.

Los axones de las células ganglionares que poseen melanopsina forman el tracto retinohipotalámico (TRH), el cual proyecta principalmente a la región ventrolateral del NSQ (Johnson et al., 1988; Shibata & Moore, 1993), liberando los neurotransmisores glutamato, péptido activador de la adenilato ciclasa (PACAP) y sustancia P (Ebling, 1996; Hannibal, 2002). El NSQ también recibe una entrada indirecta de la luz a través de la hojuela intergeniculada (IGL) y el tracto geniculohipotalámico (LGN); los cuales utilizan como neurotransmisores el ácido gamma-aminobutírico (GABA) y el neuropéptido (NPY), respectivamente (Harrington, 1997; Park et al., 1993). Por su parte, el núcleo dorsal del rafe y el núcleo paraventricular del tálamo (PVT) tienen un papel importante como moduladores de la respuesta del NSQ a la luz (Golombek & Rosenstein, 2010; Salazar-Juárez, et al., 2002).

Señalización intracelular en la sincronización a la luz

Los procesos de señalización involucrados en la sincronización a la luz son complejos. Se ha propuesto que los pulsos de luz en la retina inducen la liberación de glutamato por parte del TRH, el cual interactúa con los receptores tipo NMDA¹⁷ de las células del NSQ (Ding et al., 1994; Vindlacheruvu et al., 1992). Por su parte la liberación de PACAP parece tener un efecto neuromodulador en la respuesta a pulsos de luz (Chen et al., 1999; Tischkau et al., 2000).

¹⁷ **NMDA** N-metil D-aspartato

Hasta la fecha se han propuesto dos vías de señalización por las cuales las células del NSQ pueden responder a pulsos de luz en la noche subjetiva (Fig. 3.4). Los pulsos de luz aplicados en la noche subjetiva temprana ocasionan la entrada de calcio por los receptores NMDA, el calcio entrante activa los canales de ryanodina (RyR) del retículo endoplásmico. La liberación de los depósitos intracelulares de calcio lleva a la activación de cinasas, como las calmodulinas dependientes de calcio (CaMKs) y cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK), y a la fosforilación del factor de transcripción CREB (P-CREB), provocando un retraso de fase del reloj (Ding et al., 1998; Obrietan et al., 1999).

Por su parte la entrada de calcio, por un pulso de luz dado durante la noche subjetiva tardía, lleva a la activación de calmodulinas como la CaMKII que fosforila a la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), lo que aumenta la formación de óxido nítrico e induce la formación de GMP cíclico, el cual activa la proteína cinasa G (PKG) que fosforila CREB¹⁸ (P-CREB), teniendo como resultado un avance en el reloj (Ding et al., 1998; Ding et al., 1997; Mathur & Golombek, 1996; Weber et al., 1995).

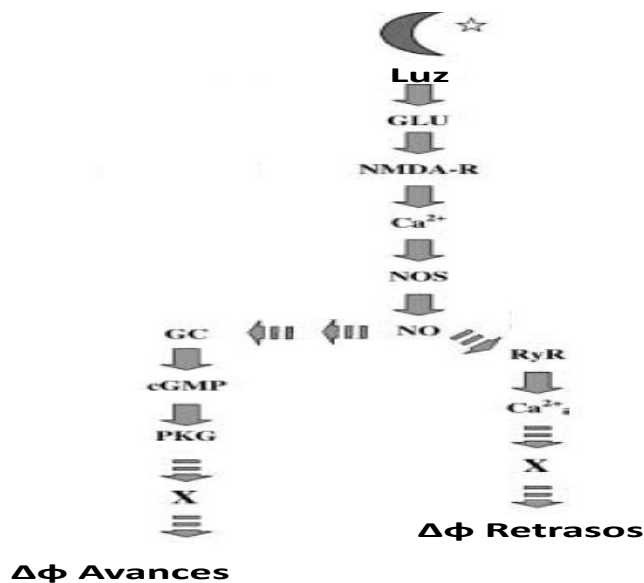


Figura 3.4.- Esquema de las cascadas de señalización que se activan en la noche subjetiva ante un estímulo luminoso. Glutamato (GLU), receptores NMDA (NMDA-R), óxido nítrico sintasa (NOS), óxido nítrico (NO), canales de ryanodina (RyR), proteína quinasa G (PKG). Tomado de Gillette & Mitchell, 2002.

¹⁸ *CREB* proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc

Inducción de genes en el NSQ por pulsos de luz

En resumen, los pulsos de luz en la noche subjetiva llevan a la fosforilación de CREB (P-CREB), el cual puede actuar como un factor de transcripción al unirse a los elementos CRE en la región promotora de diversos genes como los genes de periodo (*per*) o el gen de expresión temprana *c-fos* (Ginty et al., 1993; Obrietan et al., 1999; Tischkau et al., 2003). Los genes de periodo (*per1* y *per2*), además de ser fotoinducibles en la noche subjetiva, son parte del mecanismo molecular de oscilación y el aumento en su transcripción se ha relacionado con los cambios de fase del sistema circadiano (Albrecht et al., 1997; Shearman et al., 1997). Así se ha demostrado la fotoinducción en el NSQ de los genes *per1* y *per2*, sin encontrar este efecto en los genes *cry1*, *cry2* y *cry3* (Best et al., 1999; Field et al., 2000; Shearman et al., 1997; Shigeyoshi et al., 1997; Zylka et al., 1998). Por su parte, el incremento en la expresión de estos genes por un pulso de luz inicia en la región ventrolateral del NSQ, viajando posteriormente hacia la región dorsomedial, en donde los retrasos de fase están acompañados de un aumento en la expresión de *Per2*, mientras que los avances de fase se correlacionan con un aumento en la expresión de *Per1* (Yan & Silver, 2002, 2004). Por lo que respecta a *Bmal1*, se ha encontrado que los pulsos de luz en la noche subjetiva disminuyen la expresión de esta proteína (Tamaru et al., 2000)

Por su parte, la expresión de *c-fos* ante un estímulo luminoso fue demostrada en por Rea en 1989, si bien no es parte del mecanismo de sincronización a la luz (Honrado et al., 1996), sí está relacionado con la activación de los canales NMDA, por lo que ha sido ampliamente utilizado como un marcador de la respuesta del NSQ a los estímulos luminosos (Morin & Allen, 2006). Así, un pulso de luz en la zona de retrasos o de avances provoca una inducción de la proteína Fos en la región ventrolateral (Guido et al., 1999; Honrado et al., 1996). Para el caso de la región dorsomedial, la inducción de Fos cambia dependiendo de la especie: para hámsters aumenta sólo cuando el pulso es dado en la zona de avances (Guido et al., 1999), mientras que en la rata parece existir una subpoblación de la región dorsomedial que presenta fotoinducción de *c-Fos* en la noche subjetiva (Beaulé & Amir, 1999; Beaulé et al., 2001).

EFFECTOS DE LAS SEÑALES METABÓLICAS SOBRE EL NSQ Y LA CRF

Por otra parte, la información metabólica también puede afectar el funcionamiento del NSQ. La leptina es capaz de modular la actividad eléctrica e inducir avances de fase en el ritmo de disparo del NSQ (Inyushkin et al., 2009; Prosser & Bergeron, 2003), además de potenciar los avances de fase ocasionados por un pulso de luz en el ritmo de actividad locomotriz e inducir una mayor expresión de las proteínas de reloj PER1 y PER 2 (Mendoza et al., 2011). Por otra parte el bloqueo de la utilización de glucosa por la inyección de 2-deoxi-D-glucosa (2-DG) en ratones C57 reduce la magnitud de los retrasos de fase ante pulso de luz en el ritmo circadiano de actividad locomotriz, lo que indica que la disponibilidad de glucosa puede modular la respuesta del sistema circadiano a la luz (Challet et al., 1999a).

El hecho de que el reloj incorpore información del estado metabólico del organismo, hace factible que animales con problemas de obesidad y síndrome metabólico presenten alteraciones en la forma en la que el NSQ responde a otras señales ambientales como la luz. Así, se han encontrado alteraciones en la capacidad de sincronización en modelos de diabetes mellitus inducida por estreptozotocina (Challet et al., 1999b), y en animales deficientes de leptina (Sans-Fuentes et al., 2010). En ambos casos los retrasos de fase ante un estímulo luminoso aumentan. Por otra parte, ratones mantenidos con dietas hipercalóricas, los cuales desarrollan obesidad, hiperglicemia, hiperleptinemia e hiperinsulinemia, presentan una reducción en los avances de fase del ritmo de actividad locomotriz y en la inducción de la expresión de c-Fos en el NSQ en respuesta a la luz (Mendoza et al., 2008).

HIPÓTESIS

Se sabe que animales que desarrollan alteraciones metabólicas y obesidad pueden presentar una reducción de la capacidad de sincronización; por lo que animales obesos de la especie *Neotomodon alstoni* podrían presentar una reducción en la magnitud de los cambios de fase ante pulsos de luz aplicados en la noche subjetiva, debido a una menor respuesta de las células del NSQ ante el estímulo luminoso.

OBEJTIVO GENERAL

Determinar si existen diferencias en la curva de respuesta de fase a la luz, entre organismos delgados y obesos de la especie *N. alstoni*.

Objetivos particulares:

- Determinar si existen diferencias en la magnitud de los cambios de fase por un pulso de luz entre animales delgados y obesos del ratón de los volcanes.
- Evaluar si existen diferencias en la expresión de la proteína c-Fos en el núcleo supraquiasmático inducida por un pulso de luz, entre organismos delgados y obesos de *N. alstoni*.

MATERIAL Y MÉTOD

Para evaluar la magnitud de los cambios de fase por un pulso de luz en el ritmo circadiano de actividad locomotriz, se trabajó con ratones macho de la especie *N. alstoni* silvestres y F1; los cuales fueron separados en 4 grupos con base en su peso corporal: silvestres delgados (S-D), silvestres obesos (S-O), F1 delgados (F-D), F1 obesos (F-O). Los detalles sobre la captura, aclimatación y selección de animales obesos son descritas en el capítulo 2 (*Ver Capítulo 2: Obtención y mantenimiento de los animales*).

Protocolo experimental

Curva de Respuesta de Fase (CRF)

Para la obtención de la curva de respuesta de fase (CRF) a pulsos de luz se utilizaron 36 ratones S-D con un peso de 50 ± 2 g y 36 ratones S-O con un peso de 75.5 ± 4 g. Con el fin de descartar que las eventuales diferencias sean debidas a la edad, se trabajó con animales nacidos en bioterio con una edad de 6 a 8 meses, a los que se aplicaron pulsos de luz en la zona de avances de fase, en la de retrasos y en la mitad del día subjetivo; para ello se utilizaron 21 ratones F-D con peso corporal promedio de 48 ± 2 g y 18 ratones F-O con peso promedio de 68 ± 3 g.

El protocolo para la obtención de la CRF consistió en registrar la actividad locomotriz con sensores infrarrojos (*Ver Capítulo 2: Registro de actividad locomotriz*) bajo las siguientes condiciones: primero se sincronizó a los organismos a un fotoperiodo completo LO 12:12 (fotofase de 6:00 a 18:00 h) durante al menos una semana. Posteriormente, se colocó a los individuos en condiciones de libre corrimiento OO por 1 semana más. Después de esa semana se dio un pulso de luz en un tiempo circadiano determinado, con una duración de 1 hr (250 lux), como lo reportado en otros estudios con ratones que presentan alteraciones metabólicas (Sans-Fuentes et al., 2010). Los tiempos circadianos (TC) evaluados, para caracterizar la CRF en animales silvestres fueron: TC 02, TC 06, TC 10, TC 14, TC 18 y TC 22. El TC 12 corresponde al inicio de actividad locomotriz, y los demás se designan según el número de horas de diferencia respecto a éste. Por su parte en el caso de individuos F1 se evaluó la zona de máximo avance, retraso y zona muerta. Para dar el pulso de luz, se colocó al animal en un compartimiento independiente de donde se lleva a cabo el registro de actividad. En este sentido se realizaron pruebas en las que se determinó que la manipulación de los organismos para dar el pulso de luz no tenía efectos sobre el ritmo circadiano de actividad locomotriz. Por último, se regresó el animal al compartimiento de registro y se mantuvo en oscuridad constante por al menos otra semana, con el fin de poder evaluar el cambio de fase una vez alcanzado el estado estable (Daan & Pittendrigh, 1976). Cada individuo recibió solo un pulso de luz en alguno de los tiempos designados.

Inmunohistoquímica

Para evaluar si existen diferencias en el efecto del pulso de luz sobre el NSQ entre animales delgados y obesos, se determinó la expresión de las proteínas c-Fos y VIP en esta región. Se utilizaron 20 individuos F-D con peso promedio de 48 ± 2 g y 10 F-O de 70 ± 3.5 g.

Los machos del ratón de los volcanes permanecieron 15 días bajo ciclos LO 12:12 (fotofase de 6:00 a 18:00 hr, luz blanca 250 lux), con el fin de que su ritmo de actividad locomotriz se sincronizara y presentara un inicio de fase estable. Posteriormente, se colocaron en condiciones de oscuridad continua (OO), y en el tercer día bajo esta condición recibieron alguno de los siguientes tratamientos: pulso de luz (1 h; luz blanca 250 lux) en TC 14 (F-D=5, F-O=5), pulso en TC 22 (F-D=5, F-O=5), organismos sin pulso de luz, TC 1 (F-D=5), o sin pulso, TC 22 (F-D=5). Los pulsos de luz se aplicaron en un compartimiento separado.

Los organismos fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de pentobarbital (50 mg/kg). Mediante perfusión intracardiaca, se lavó el sistema circulatorio con 100 ml de solución salina isotónica (NaCl al 0.9%), para después fijar el tejido con 100 mL de PLP (paraformaldehído al 4%, lisina al 1.2%, m-peryodato al 0.2% en amortiguador de fosfatos 0.1M, pH 7.2). Los cerebros permanecieron en PLP por 24 horas, para después ser crioprottegidos por inmersión en soluciones de sacarosa en PBS (NaCl 0.9% en amortiguador de fosfatos 0.1M) de concentración creciente: 24 h en sacarosa 10%, 48 h en sacarosa 20%, 72 hr en sacarosa 30%).

Los cerebros fueron congelados en hielo seco por 5 minutos y se realizaron cortes coronales con un espesor de 40 μm a lo largo de la región del núcleo supraquiasmático (Franklin & Paxinus; 2008) con un criostato (LEICA CM 1850). Los cortes se colectaron en PBS en 4 series.

Una de las series de cortes fue incubada con un anticuerpo policlonal de conejo anti c-Fos (48 h a 4 °C; 1:1000; Santa Cruz Biotechnology) en PBSGT (1% suero de cabra, 0.1% tritón en PBS), la otra serie se incubó con un anticuerpo policlonal de conejo anti VIP (48 ha 4 °C; 1:500 en PBSGT; ImmunoStar). Posteriormente, ambas series fueron incubadas con el anticuerpo puente (2 h; 1:200 en PBSGT), para finalmente incubar con el complejo avidina-biotina (2 h; 1:300; Rabbit IgG Vectastain ABC kit). Después de cada incubación se hicieron 3 lavados de 10 min en PBS.

Para visualizar la reacción se incubaron los cortes por 10 min en una solución de 3,3-diaminobenzidina (10 mg / 100 mL; SIGMA) en amortiguador de Trizma 0.1 M a pH 7.2), se activó la reacción con peróxido de hidrógeno (3.5%) y se hicieron 3 lavados de 10 min. en PBS.

Los cortes fueron montados con CC-mount (SIGMA) en portaobjetos tratados con poly-D-lisina (SIGMA), dejándose secar por 2 días a 55°C. Las imágenes del NSQ se obtuvieron con un microscopio óptico en campo claro (OLYMPUS PROVIS AX70). El trabajo de microscopía fue realizado en el laboratorio de Microcine de la Facultad de Ciencias, UNAM.

Análisis de resultados

Efectos de un pulso de luz sobre el ritmo circadiano de actividad locomotriz

Los datos para determinar los cambios de fase se obtuvieron con los actogramas graficados en ACTIVIEW (Mini mitter Co., Inc, USA) y los periodos del ritmo circadiano de actividad locomotriz se determinaron con el programa DISPAC (IFC, UNAM), debido a que permite mayor resolución que el anterior.

Para el análisis estadístico se utilizó el paquete de cómputo Stat Graphics Centurion 16.1.05. (*Ver Capítulo 2: Análisis de resultados*). La comparación entre animales delgados y obesos en cada tiempo circadiano se realizó con una prueba t de Student para muestras no pareadas ($p < 0.05$). Por su parte, las comparaciones entre ratones silvestres y F1 se hicieron con una prueba de ANOVA de una vía y una prueba post-hoc de Tukey. Todos los análisis se realizaron con los datos de los últimos 5 días de cada condición.

Con el fin de evaluar los efectos del pulso de luz sobre el ritmo de actividad locomotriz del ratón de los volcanes se calculó:

- El cambio de fase ($\Delta\Phi$), que se obtuvo de restar el inicio de fase después del pulso de luz (Φ_{DP}) al inicio de fase un día antes del pulso de luz (Φ_{AP}):

$$\Delta\Phi = \Phi_{AP} - \Phi_{DP}$$

Es importante aclarar que Φ_{DP} se calcula como la proyección de los inicios de fase de los últimos 5 días en la condición de oscuridad constante después del pulso de luz (Fig. 4.2); en donde los inicios de fase eran evaluados con el algoritmo para inicio de fase descrito en el Capítulo 2 (*Ver Capítulo 2: Análisis de Datos*).

Con los cambios de fase obtenidos se construyó la CRF para el ritmo de actividad locomotriz de organismos delgados y obesos. Se graficó en el eje horizontal el tiempo circadiano (TC) en el cual se aplicó el pulso de luz, y en el eje vertical la magnitud del cambio de fase obtenido. Los adelantos de fase fueron representados como valores positivos y los retrasos de fase como negativos.

Efectos de un pulso de luz sobre la expresión de c-Fos en el NSQ

Para determinar la expresión de c-Fos en el núcleo supraquiasmático se hizo un conteo de las células inmunoreactivas a esta proteína por estereología que es una herramienta que nos permite cuantificar y hacer un análisis tridimensional de un tejido que se encuentra procesado como cortes subsecuentes. Brevemente, se colocó sobre la fotografía del corte, en la región del NSQ, una cuadrícula cuyos cuadros interiores representaban 50 μm de ancho; la cuadrícula era colocada siempre con el cuadrante central (5D) justo en el centro del NSQ. Para determinar el centro del NSQ se trazó un círculo sobre él (Fig. 4.5-A). Las dimensiones del círculo eran delimitadas por la expresión de VIP en los cortes adyacentes (*Anexo 2*).

Se analizaron conjuntamente los NSQ de ambos hemisferios cerebrales (Fig. 3.5-B) en cortes anterior, medial y posterior; los valores obtenidos se multiplicaron por 4, que es el número de series que se obtuvieron por cerebro. Con los conteos realizados se determinó la expresión total de c-Fos considerada como la suma de los cortes anterior, medial y posterior.

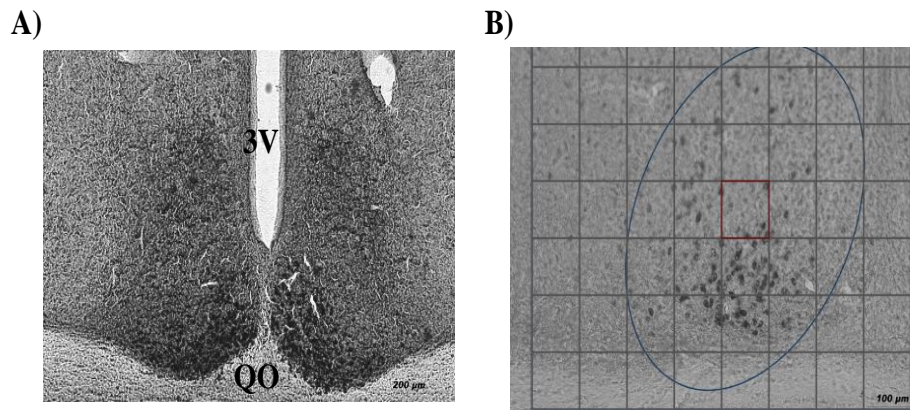


Figura 3.5. A) Fotomicrografía del núcleo supraquiasmático (NSQ), tercer ventrículo (3V), quiasma óptico (QO)
B) Rejilla para el conteo de c-Fos, sobre un fotomicrografía del NSQ izquierdo.

RESULTADOS

Tejido adiposo visceral

En los animales F1 en los cuales se realizó la perfusión, se colectó el tejido adiposo visceral, el hígado y el riñón, encontrando que la obesidad está asociada a un aumento significativo en el peso del hígado y del tejido adiposo visceral (Fig. 3.6).

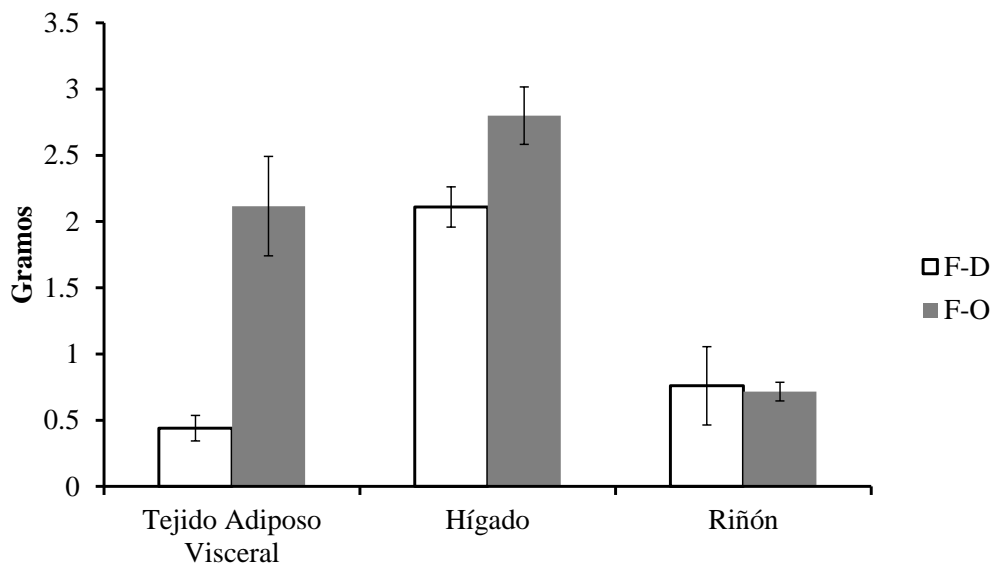


Figura 3.6. Media del peso en gramos \pm e. e. del tejido adiposo visceral, hígado y riñón. En machos F1 delgados (F-D) y obesos (F-O). * indica diferencias significativas entre grupo $p < 0.05$.

Efectos de un pulso de luz sobre el ritmo circadiano de actividad locomotriz

Con el fin de determinar si la obesidad afecta los mecanismos de sincronización no paramétrica a la luz en el ratón de los volcanes, se construyó la curva de respuesta de fase (CRF) del ritmo de actividad locomotriz para esta especie (Fig. 3.7). Al comparar la respuesta de los grupos S-D y S-O (Fig. 3.8) se encontró que los cambios de fase en el ritmo de actividad locomotriz por pulsos de luz aplicados en el día subjetivo (TC 02, TC 06) no presentaron

diferencias significativas. Por su parte, durante la noche subjetiva temprana (TC 10, TC 14) la luz provoca retrasos en la fase del ritmo de actividad, y la zona de máximo retraso se localizó en TC 14 (Fig. 3.7, 3.10); en este punto los retrasos de fase del grupo S-O fueron significativamente menores (Fig. 3.8; Fig. 3.7). Por último, los pulsos de luz aplicados durante la noche subjetiva tardía (TC 18, TC 22) provocaron un avance de fase del ritmo circadiano (Fig. 3.8), cuya máxima respuesta se encontró en TC 22 (Fig. 3.7, 3.11) sin que hubiera diferencias por la condición de obesidad.

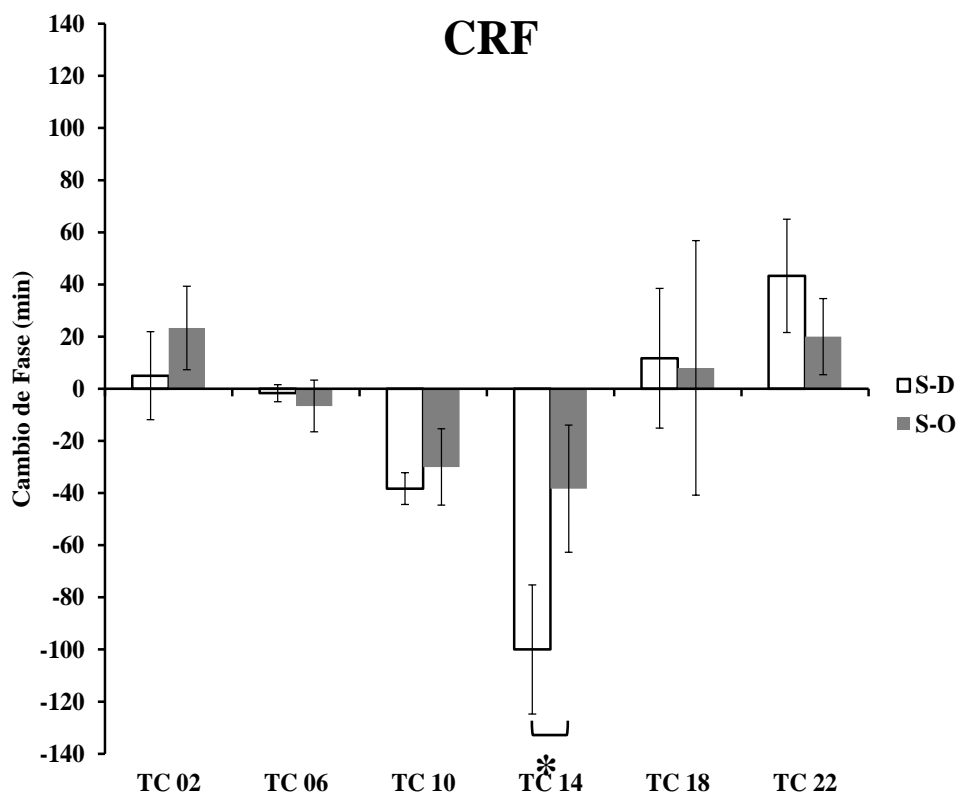


Figura 3.7.- Curva de respuesta de fase del ritmo de actividad locomotriz del ratón de los volcanes, en individuos Silvestres Delgados (S-D n=36, barras claras) o. Silvestres Obesos (S-O n=36, barras oscuras). Los datos representados son medias \pm 2 e. e. *: diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

Tiempo Circadiano	Silvestre Delgado (S-D)	Silvestre Obeso (S-O)	p< 0.05
TC 02	$\Delta\Phi$ 5 \pm 16.9 min	$\Delta\Phi$ 23.3 \pm 16 min	
TC 06	$\Delta\Phi$ -1.7 \pm 3.3 min	$\Delta\Phi$ -6.6 \pm 9.9 min	
TC 10	$\Delta\Phi$ -38.3 \pm 6.1 min	$\Delta\Phi$ -30 \pm 14.6 min	
TC 14	$\Delta\Phi$ -100 \pm 24.8 min	$\Delta\Phi$ -38.3 \pm 24.4 min	*
TC 18	$\Delta\Phi$ 11.7 \pm 26.8 min	$\Delta\Phi$ 8 \pm 48.8 min	
TC 22	$\Delta\Phi$ 43.3 \pm 21.7 min	$\Delta\Phi$ 20 \pm 14.6 min	

Figura 3.8.- Valores promedio del cambio de fase ($\Delta\Phi$) del ritmo de actividad locomotriz expresado en minutos \pm 2 e. e., dependiendo del tiempo circadiano (TC) en el cual se aplicó el pulso de luz. El * indica diferencias significativas ($p<0.05$).

Con el fin de descartar efectos debidos a la edad, se trabajó con animales F1 delgados (F-D, n=21) y F1 obesos (F-O, n=18) de entre 6 y 8 meses de edad. Estos recibieron pulso de luz en la zona de máximo avance (TC 22), máximo retraso (TC 14) y respuesta nula (TC 06).

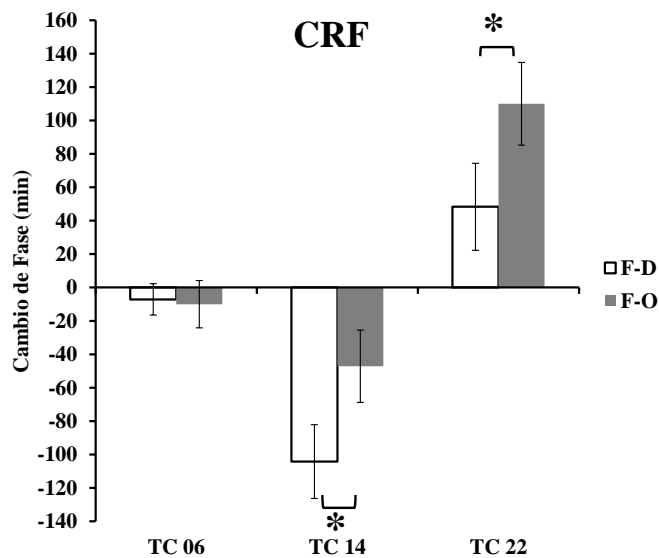


Figura 3.9.- Cambio de fase del ritmo de actividad locomotriz inducido por un pulso de luz aplicado en diferentes tiempos circadianos (TC), en ratones F1 Delgados (F-D n=21, barras claras) o F1 Obesos (F-O n=18, barras oscuras). Los datos son medias \pm 2 e. e., *: diferencia significativa ($p<0.05$).

Al comparar los cambios de fase del ritmo circadiano de actividad locomotriz entre estos grupos (Fig. 3.9) se observa que se presenta también la reducción en la magnitud del cambio de fase en la zona de retrasos asociada a la obesidad (Fig. 3.10) evidente entre los grupos F-O (CT 14= -104.2±22.1 min; n=18) y F-D (CT 14= -47.1±21.6 min; n=21). Sin embargo, cuando aplicamos un pulso de luz en la zona de avances (Fig. 3.11), los animales del grupo obeso presentan un aumento significativo en la magnitud del cambio de fase (F-O=110±24.7 min; n=18) con respecto al grupo de animales delgados (F-D=48.3±26 min).

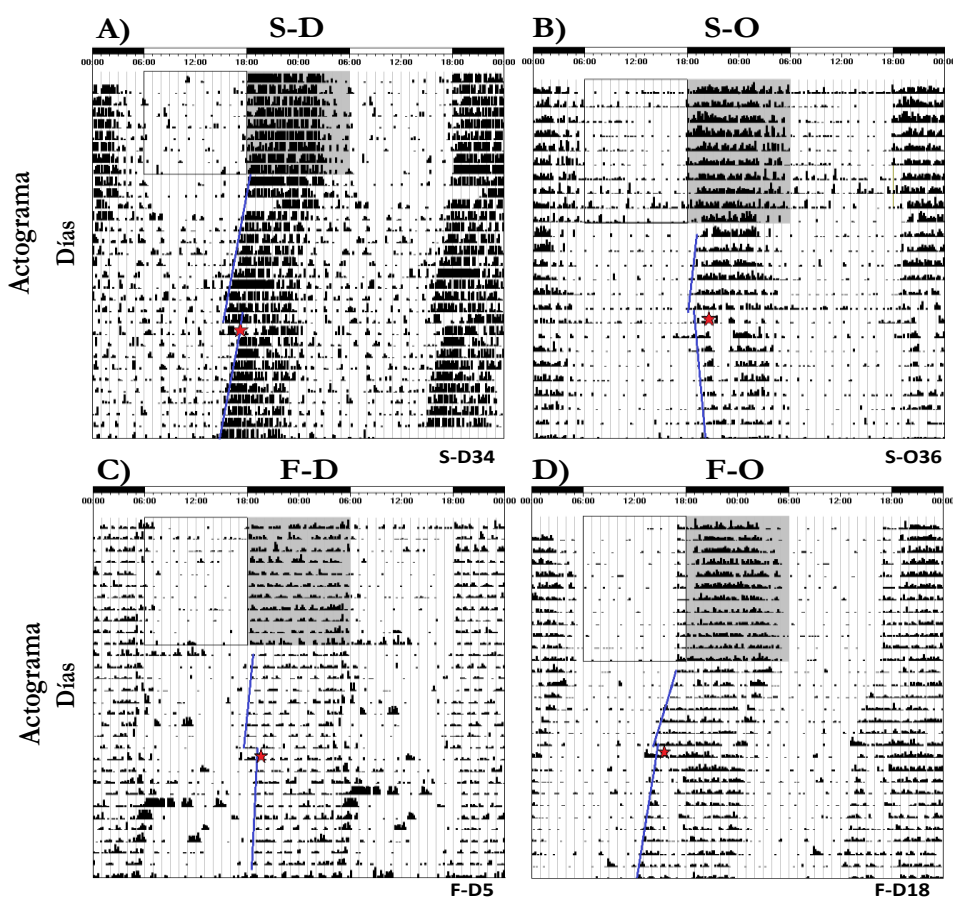


Figura 3.10.- Actogramas de gráfica doble del ritmo circadiano de actividad locomotriz de machos del ratón de los volcanes que recibieron un pulso de luz en CT 14 (estrella roja). Las líneas azules representan las proyecciones de los inicios de fase con las cuales se calcula el cambio de fase. La barra superior indica las fases de luz (clara) y oscuridad (negra). A) Silvestre delgado B) Silvestre obeso C) F1 delgado. D) F1 obeso. La etiqueta en la parte inferior del actograma corresponde al individuo registrado.

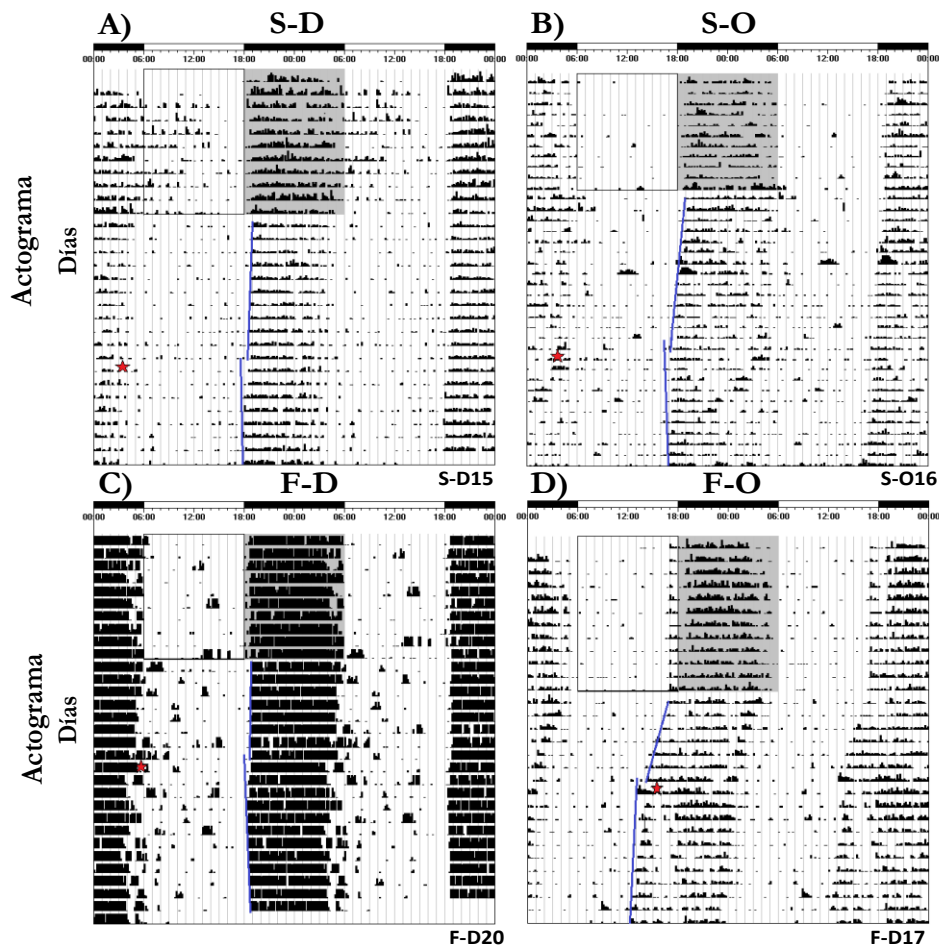


Figura 3.11.- Actogramas de gráfica doble del ritmo circadiano de actividad locomotriz de machos del ratón de los volcanes que recibieron un pulso de luz en CT 22 (estrella roja). Las líneas azules representan las proyecciones de los inicios de fase con las cuales se calcula el cambio de fase. La barra superior indica las fases de luz (clara) y oscuridad (negra). A) Silvestre delgado B) Silvestre obeso C) F1 delgado. D) F1 obeso. La etiqueta en la parte inferior del actograma corresponde al individuo registrado.

Efectos de un pulso de luz sobre la expresión de c-Fos en el NSQ.

Con el fin de determinar la respuesta del NSQ a los pulsos de luz se midió la inducción de c-Fos en las zonas de máximo retraso TC14 y máximo avance TC22 (Fig. 3.12). Se observaron diferencias significativas en el número de células inmunorreactivas entre los animales del grupo de F-D sin pulso (TC14=157.5±140.9, TC22=314±46.5) y los que

recibieron pulsos de luz de los grupos F-D (TC14=3051±1384, TC22=2897±222.3) y F-O (TC14=2175±663.1, TC22=2589±588).

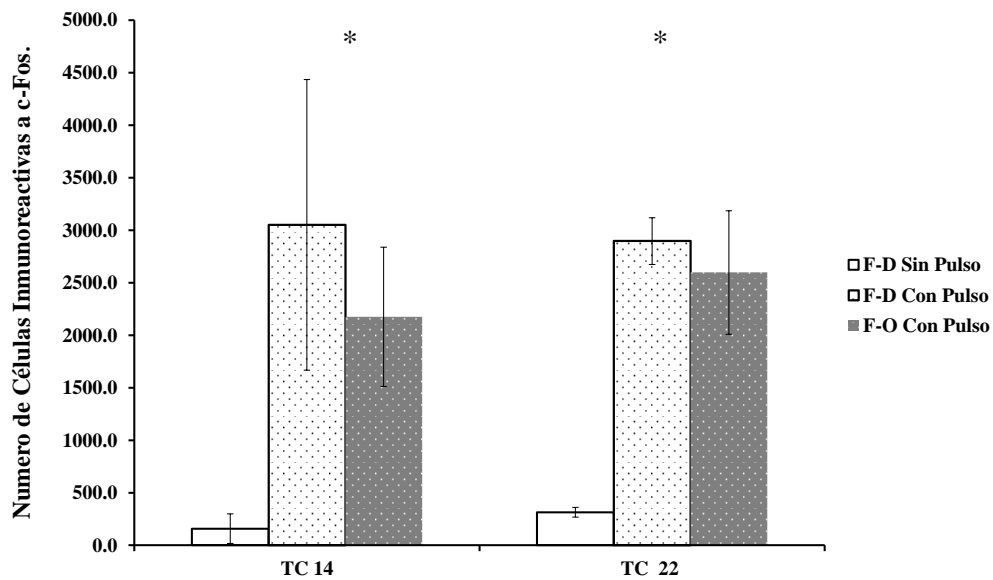


Figura 3.12.- Número de células inmunorreactivas a c-Fos en el núcleo supraquiasmático del ratón de los volcanes inducidas por un pulso de luz en dos momentos distintos del ciclo circadiano endógeno (TC 14, TC 22). Las barras claras son animales F-D sin pulso de luz (n=5), barras claras con puntos son F-D con pulso de luz (n=5). Las barras grises con puntos son animales F-O con pulso de luz (n=5). Los datos son medias ± 2 e. e. *: diferencia significativa (p<0.05) vs. los grupos en el mismo TC..

La respuesta al pulso de luz entre el grupo F-D y F-O no indujo diferencias significativas (Fig. 3.12), en la zona de retrasos (TC 14) o de avances (TC 22). Lo anterior se muestra en la figura 3.13, en donde se puede observar que los pulsos de luz en TC 14 (Fig. 3.13-A) y TC 22 (Fig. 3.13-B) induce la expresión de c-Fos en el NSQ de manera similar en animales F-D y F-O.

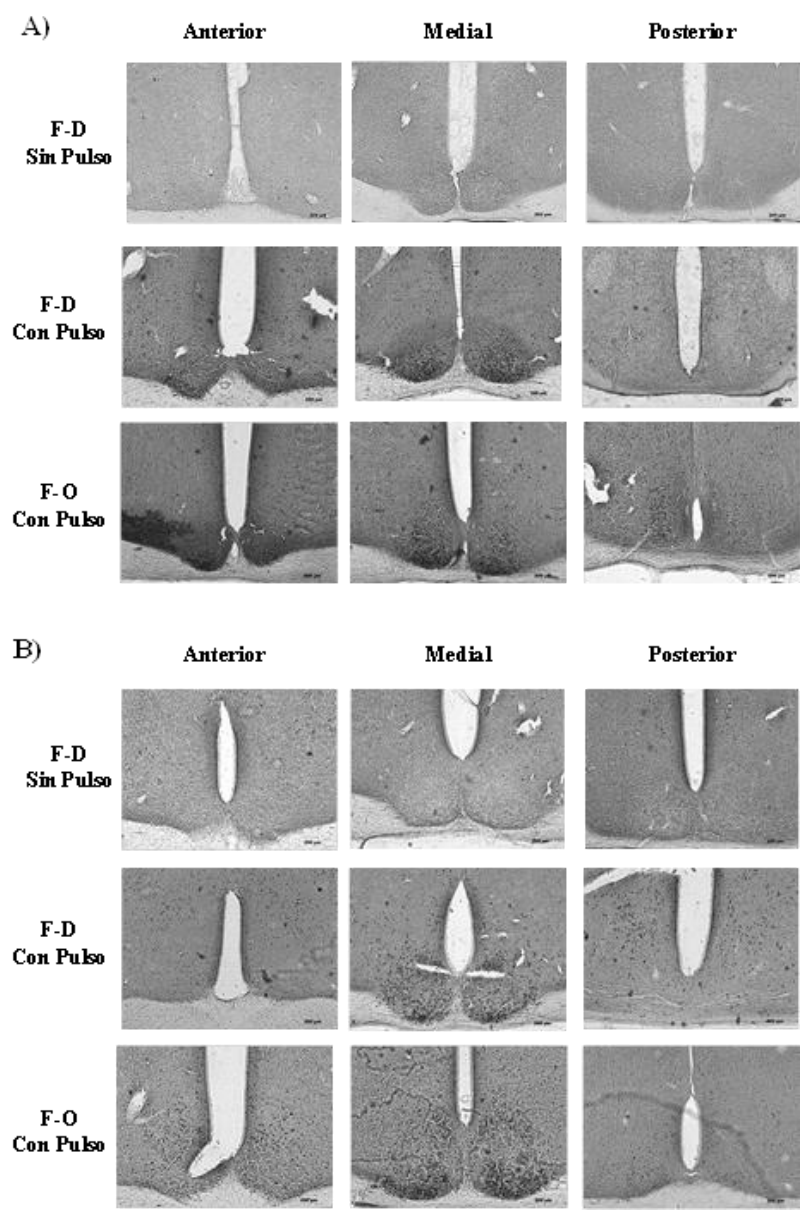


Figura 3.13.- Expresión de c-Fos en el núcleo supraquiasmático en TC 14 (A) y TC 22 (B).

DISCUSIÓN

Una de las principales ventajas de poseer un reloj biológico es la capacidad de sincronizar los ritmos circadianos a los ciclos geofísicos, lo cual permite a los organismos anticipar las variaciones en el ambiente, confiriendo una ventaja adaptativa (Golombek & Rosenstein, 2010; Horton, 2001). La sincronización de un ritmo circadiano implica que la señal ambiental es capaz de influenciar al sistema circadiano hasta lograr que el periodo del ritmo iguale al del ciclo ambiental (Daan & Aschoff, 2001; Pittendrigh, 1993).

Una de las herramientas más utilizadas para estudiar el efecto que tiene un sincronizador sobre el ritmo circadiano consiste en aplicar pulsos del estímulo sincronizador (luz) y medir el efecto que éstos tienen sobre la fase del ritmo. Estos efectos son graficados en la Curva de Respuesta de Fase (CRF), la cual es similar en diversas especies presentando una zona de insensibilidad a la luz en el día subjetivo, una zona de retrasos en la noche subjetiva temprana y una zona de avances en la noche subjetiva tardía (Daan & Pittendrigh, 1976; Johnson, 1999; Johnson et al., 2003). En el caso del ratón de los volcanes, se encontró que la CRF de animales silvestres (Fig. 3.7) presenta la misma forma descrita para otras especies (Daan & Pittendrigh, 1976), con una zona de retrasos máximos en TC 14 y avances máximos en TC 22. Por otra parte se observa que los retrasos de fase son de mayor magnitud que los avances.

Estudios previos en el ratón de los volcanes *Neotomodon alstoni* han mostrado que esta especie presenta ritmos de actividad locomotriz claros (Carmona-Alcocer et al., 2012, *Anexo 1*; Fuentes-Granados et al., 2010). Por otra parte, bajo condiciones cautiverio los individuos de esta especie presenta una tendencia a desarrollar obesidad, la cual va acompañada de alteraciones metabólicas y cambios en el ritmo de actividad locomotriz (Carmona-Castro, 2006; Carmona-Alcocer et al., 2012, *Anexo 1*; Fuentes-Granados, 2011). Lo anterior nos llevó a evaluar si la magnitud en los cambios de fase del ritmo de actividad ante un estímulo luminoso se modifican como lo observado en otros modelos de obesidad (Challet et al., 1999b; Mendoza et al., 2008; Sans-Fuentes et al., 2010).

En el caso de la CRF, se observó en animales silvestres que los individuos obesos presentan una reducción en la magnitud de los retrasos de fase del ritmo de actividad locomotriz (Fig. 3.10). En el caso de la zona de avances no se encontraron diferencias significativas (Fig. 3.11). Debido a que en animales silvestres no se puede conocer con

exactitud la edad de los organismos y éste podría ser un factor de variación interindividual en el funcionamiento del sistema circadiano (Kolker et al., 2004; Possidente et al., 1995; Scarbrough et al., 1997), se verificó el efecto de la obesidad sobre la capacidad del sistema circadiano para responder a pulsos de luz en organismos de edad conocida. Empleando organismos de bioterio (Fig. 3.9) se confirmó que los animales obesos, presenta una reducción en el cambio de fase en la zona de retrasos (TC 14; sin embargo, los animales F1 obesos que recibieron un pulso de luz en la zona de avances (TC 22) presentan un aumento del 50 % en la magnitud de los cambios de fase, efecto que no se había observado en animales silvestres. Así, la obesidad en la especie *N. alstoni* lleva a una reducción en la magnitud de los retrasos y un aumento en los avances de fase del ritmo circadiano de actividad locomotriz.

Los efectos de alteraciones metabólicas sobre la CRF a pulsos de luz, ha sido descrita en otros modelos de obesidad. Así, en ratones C57 alimentados con dietas hipercalóricas; los cuales desarrollan obesidad, hiperglucemia, hiperleptinemia e hiperinsulinemia, se presenta una reducción en los avances de fase del ritmo de actividad locomotriz, que está relacionada con una alteración en las vías de señalización activadas por el pulso de luz en la noche subjetiva tardía (Gillette & Mitchell, 2002; Mendoza et al., 2008) . En el caso del ratón de los volcanes *N. alstoni*, la obesidad provoca un efecto contrario en la zona de avances, incrementando la magnitud del cambio de fase, lo sugeriría que la obesidad en este animal esta afectando mecanismos del sistema circadiano diferentes. En este sentido la obesidad inducida por dietas hipercalóricas se ha relacionado con una disminución en la expresión de las proteínas c-Fos y P-ERK¹⁹, lo que implica cambios en la vía de señalización de la luz en la zona de avances (Mendoza et al., 2008). En este sentido se esperaría que *N. alstoni* presente cambios en la vía de señalización que involucra la movilización de los depósitos intracelulares de calcio (Ding et al., 1998).

Por lo que respecta a los avances de fase. En otros modelos, se ha reportado que los animales con deficiencia de leptina (ob/ob) presentan un aumento en la magnitud de los retrasos de fase (Sans-Fuentes et al., 2010), lo cual es opuesto a lo que encontramos en animales obesos de *N. alstoni* en los que la obesidad genera una reducción en la magnitud de los retrasos. Sin embargo las inyecciones interventriculares de esta hormona, en hembras del ratón C57, son capaces de provocar un aumento en la magnitud de los avances de fase

¹⁹ **P-ERK** quinasa regulada por señales extracelulares

inducidos por un pulso de luz (Mendoza et al., 2011), como lo que observamos en este estudio. Aunque en el roedor de los volcanes se han reportado un estado de hiperleptinemia en animales obesos silvestres (Carmona-Alcocer et al., 2012; Anexo 1), esto no se ha reportado para organismos F-O, mientras que en otras especies que desarrollan un estado hiperleptinémico no se encuentran estos efectos (Mendoza et al., 2008). En este sentido la correlación entre los estudios con inyecciones intraventriculares de leptina y lo observado en animales obesos con hiperleptinemia, es complicada ya que la obesidad si bien esta asociada a estados de hiperleptinemia, también va acompañada a un estado de resistencia a la leptina (Banks et al., 1999; Bays et al., 2008; Henry et al., 2012)

Una forma de conocer si la obesidad en el ratón de los volcanes afecta de algún modo la respuesta del NSQ a la luz, es medir la inducción de c-Fos ante estímulos luminosos. Esta proteína, si bien no es parte del mecanismo de sincronización a la luz (Honrado et al., 1996), sí está relacionada con la activación de los receptores NMDA, que son los que responden ante el glutamato liberado por el TRH durante la recepción de un pulso de luz (Morin & Allen, 2006) y que en última instancia son importantes en la transducción de los estímulos luminosos que desencadenan los cambios de fase de los ritmos (Ding et al., 1994; Vindlacheruvu, et al., 1992). Así, en el caso de *N. alstoni*, encontramos que los pulsos de luz inducen la expresión de c-Fos en el sistema circadiano (Fig. 3.12) Sin embargo a diferencia de lo reportado en otras especies de roedores (Beaulé y Amir, 1999; Guido et al., 1999; Honrado et al., 1996). no se encontró una diferencia en la inducción entre la zona de avances y retrasos en el grupo de F-D, lo que podría deberse a que en CT 14 encontramos una gran dispersión de los datos lo que dificulta la interpretación de los datos, por otra parte tampoco se encontraron diferencias significativas en la inducción de esta proteína entre animales delgados y obesos, en ninguno de los tiempos circadianos. Por último un hecho interesante es que bajo condiciones constantes la expresión de c-Fos es muy baja lo que recuerda el comportamiento en la expresión de c-Fos reportado para hámster (Guido, et al., 1999).

El hecho de que la inducción de c-Fos ante los estímulos luminosos sea igual en animales delgados y obesos, aunado a un efecto diferencial de la obesidad dependiendo del tiempo circadiano en el que se aplica la luz, nos lleva a suponer que la vía de entrada a luz podría no modificarse y que la obesidad, en este caso, podría afectar mecanismos que modulan la magnitud de los cambios de fase.

En este sentido, se ha descrito que el péptido activador de la adenilato ciclasa (PACAP) puede modular la respuesta del NSQ al glutamato. Así, el PACAP a través de su receptor PAC1 provoca que los cambios de fase inducidos por pulsos de luz y por glutamato sean mayores en el caso de los retrasos y menores los avances de fase (Chen et al., 1999; Tischkau et al., 2000). En este sentido el PACAP puede actuar a través de otros receptores como el VPAC2 presente también en el NSQ (Harmar et al., 2002; Laburthe & Couvineau, 2002). En el caso del receptor VPAC2, que también responde a VIP, se sabe que es importante en la regulación de los ritmos en el NSQ (Harmar et al., 2002). Así, animales mutantes para este receptor presentan un desacoplamiento entre las neuronas del NSQ y una mayor dispersión en los periodos del ritmo de actividad locomotriz (Aton et al., 2005). Por otra parte, estos mutantes también presentan alteraciones en la CRF ante pulsos luminosos que sugieren un efecto diferencial en la sensibilidad a la luz (Hughes & Piggins, 2008). El hecho de que la CRF en animales obesos de *N. alstoni* presente cambios contrarios a lo observado en animales a los que se les administra PACAP, así como las características que comparten con los animales deficientes en VPAC2, nos han llevado a iniciar estudios sobre la expresión del receptor VPAC2 en animales delgados y obesos. Los resultados preliminares muestran que la expresión de este receptor en el NSQ es menor en animales obesos (*Anexo 3*). Esto es interesante ya que el VIP está involucrado en funciones como inhibir la ingesta de alimento (Chance et al., 1995; Mizuno et al., 1998) y mediar la lipólisis en los adipocitos de las ratas a través de VPAC2 (Åkesson et al., 2005), por lo que cambios en la eficiencia de este receptor podrían explicar los cambios a nivel circadiano observado en animales obesos, así como la generación espontánea de obesidad sin cambios paralelos en la ingesta de alimento, lo cual explicaría el no encontrar un aumento en la ingesta de alimento en animales con fenotipo obeso.

CAPITULO 4: CONCLUSIONES

El ratón de los volcanes, *Neotomodon alstoni*, se ha utilizado como modelo para el estudio de la obesidad. En este caso se ha reportado que el desarrollo de un fenotipo obeso puede estar acompañado del desarrollo de lipomas, hipertrigliceridemia y esteatosis hepática (Carmona, 2006), hiperinsulinemia e hiperleptinemia (Carmona-Alcocer, et al., 2011; *Anexo 1*).

Los resultados de este trabajo muestran que además, los animales obesos presentan un aumento significativo en el peso el tejido adiposo visceral, el cual ha sido vinculado con el desarrollos de alteraciones metabólicas (Bays, et al., 2008). En este caso la obesidad no está asociada a un incremento en el consumo de alimento o a cambios en los patrones de alimentación. Sin embargo hacen falta estudios que determinen si durante los meses en que se establece el fenotipo obeso se presenta hiperfagia.

Éste es el primer estudio que se realiza en *N. alstoni* sobre la relación entre la obesidad y alteraciones en el sistema circadiano. En este sentido, los ratones obesos presentan una disminución en la actividad en la oscuridad, como lo observado en otros modelos de obesidad (Mendoza, et al., 2008; Murakami, et al., 1995; Turek, et al., 2005). Esto podría estar asociado a la hiperleptinemia que presentan animales con fenotipo obeso (Carmona-Alcocer, et al., 2012; *Anexo 1*). Sin embargo, podría ser que una disminución en la actividad fuese la que provocara un aumento de peso debido a un menor gasto energético y las alteraciones metabólicas observadas en esta especie. Es por ello, que un seguimiento de los ritmos circadianos de actividad locomotriz, así como estudios sobre el gasto energético en estos animales, antes y después del establecimiento del fenotipo obeso se vuelve importante

Por otra parte, en condiciones de oscuridad constante existe una tendencia a alargar el periodo endógeno del ritmo de actividad locomotriz, lo que puede interpretarse como un cambio en la fuerza de acoplamiento del sistema circadiano (Kohsaka et al., 2007; Mendoza et al., 2008; Murakami et al., 1995). De esto resulta que el estado de obesidad y las alteraciones metabólicas asociadas podrían llevar a un estado que debilite la comunicación entre los osciladores celulares del NSQ, de modo similar a lo propuesto para explicar el alargamiento de periodo en el caso de organismos viejos (Benloucif et al., 1997; Reeth et al. 2001). En este sentido se vuelve importante conocer el comportamiento de los componentes de inicio y final de actividad del ritmo circadiano de actividad locomotriz bajo protocolos como fotoperiodos

largos y cortos o bajo protocolos de luz constante (Pittendrigh & Dann, 1976b) con el fin de establecer si el acoplamiento entre los osciladores esta cambiando. Así, como realizar estudios sobre el comportamiento de los osciladores celulares en el NSQ (Aton et al., 2005; de la Iglesia et al., 2000; Ohta et al., 2005) en animales con fenotipo delgado y obeso

También, de manera importante, se observó que los animales obesos presentaron una reducción en la magnitud de los retrasos y un aumento en los avances de fase del ritmo circadiano de actividad locomotriz, ante un pulso de luz. Esto implica que el estado de obesidad tiene impacto en los mecanismos que integran la sincronización por luz. En este trabajo no se encontraron diferencias en la inducción de c-Fos ante los estímulos luminosos, lo que nos lleva a suponer que la vía de entrada a luz no es afectada y que la obesidad podría afectar más bien los mecanismos que modulan la magnitud de los cambios de fase. En este sentido, los estudios preliminares que se muestran en el presente trabajo sobre la expresión del receptor VPAC2 en el NSQ de *N. alstoni* (Anexo 3), muestran que los ratones obesos tienen menor expresión del receptor a VIP, lo que podría explicar el posible desacoplamiento y los cambios observados a nivel conductual (Hughes & Piggins, 2008). Esto plantea nuevas interrogantes acerca de si el estado de obesidad implica un acoplamiento débil entre los osciladores centrales y periféricos del sistema circadiano, lo que también podría favorecer el desarrollo de un fenotipo obeso.

Por ultimo, es importante resaltar las diferencias encontradas entre animales silvestres y F1. Existen pocos estudios que comparen las observaciones entre animales de campo y de laboratorio (Calisi & Bentley, 2009), sin embargo las diferencias encontradas entre ambos grupos ponen de manifiesto que el ambiente también moldea la expresión de los ritmos circadianos, y que por tanto es importante estudiar los efectos en el sistema circadiano bajo las presiones ambientales a las que se encuentra sometido. Un hecho importante es que a pesar de la variabilidad encontrada en los datos de animales silvestres, como es de esperar en una población no solo con una gran variabilidad genética, si no con una gran diversidad en las historias de vida, se encontraron alteraciones en el sistema circadiano en animales obesos, las cuales fueron confirmadas en animales de bioterio.

V. BIBLIOGRAFÍA

- Abrahamson, E. E., & Moore, R. Y. (2001). Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Res.*, 916 (1-2), 172-191.
- Abrahamson, E. E., & Moore, R. Y. (2006). Lesions of suprachiasmatic nucleus efferents selectively affect rest-activity rhythm. *Mol Cell Endocrinol.*, 252(1-2), 46-56.
- Aguilar-Roblero, R., Garcia-Hernandez, F., Aguilar, R., Arankowsky-Sandoval, G., Drucker-Colin, R. (1986). Suprachiasmatic nucleus transplants function as an endogenous oscillator only in constant darkness. *Neurosci Lett.*, 69(1), 47-52.
- Aguilar-Roblero, R., Alamilla, J., Mercado, C., Carmona-Alcocer, V., Colwell, C. S. (2008a). Neuronal activity in the suprachiasmatic nuclei: Cellular and molecular mechanisms. En: Fanjul-Moles M. L., & Aguilar-Roblero R. (Eds.), *Comparative Aspects of Circadian Rhythms*. Kerala, India: Transworld Research Network. 000-000.ISBN: 978-81-7895-329-8
- Aguilar-Roblero, R., Carmona-Alcocer, V., Fanjul-Moles, M. L. (2008b). Los ritmos circadianos. En: Fanjul-Moles M. L., Hiriart-Urdanivia, M., Aguilar-Roblero, R. (Eds.), *Biología Funcional de los Animales*, (Vol 2). México: Siglo XXI. 2da edición. 327-337
- Air, E. L., Strowski, M. Z., Benoit, S. C., Conarello, S. L., Salituro, G. M., Guan, X-M., Liu, K., Woods, SC., Zhang BB.. (2002). Small molecule insulin mimetics reduce food intake and body weight and prevent development of obesity. *Nat Med.*, 8(2), 179-183.
- Akashi, M., Tsuchiya, Y., Yoshino, T., Nishida, E. (2002). Control of Intracellular Dynamics of Mammalian Period Proteins by Casein Kinase I ϵ (CKI ϵ) and CKId in Cultured Cells. *Mol Cell Biol.*, 22(6), 1693-1703.
- Åkesson, L., Ahre, B., Edgren, G., Degerman, E. (2005). VPAC2-R Mediates the Lipolytic Effects of Pituitary Intestinal Polypeptide in Primary Rat Adipocytes. *Endocrinology*, 146(2), 744-750.
- Albrecht, U, Sun, Z. S., Eichele, G., Lee, C. C. (1997). A differential response of two putative mammalian circadian regulators, *mper1* and *mper2*, to light. *Cell*, 91(7), 1055-1064.
- Alingh Prins, A. B., de Jong-Nagelsmit, A., Keijser, J., Strubbe, J. H. (1986). Daily rhythms of feeding in the genetically obese and lean Zucker rats. *Physiol Behav.*, 38(3), 423-426.
- Ando, H., Kumazaki, M., Motosugi, Y., Ushijima, K., Maekawa, T., Ishikawa, E., Fujimura, A. (2011). Impairment of peripheral circadian clocks precedes metabolic abnormalities in *ob/ob* mice. *Endocrinology*, 152(4), 1347-1354.

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

- Ando, H., Yanagihara, H., Hayashi, Y., Obi, Y., Tsuruoka, S., Takamura, T., Kaneko, S., Fujimura, A. (2005). Rhythmic messenger ribonucleic acid expression of clock genes and adipocytokines in mouse visceral adipose tissue. *Endocrinology*, 146(12), 5631-5636.
- Angeles Castellano, M, Aguilar-Roblero R, Escobar C. (2004). c-Fos expression in hypothalamic nuclei of food-entrained rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physio.*, 286(1), R158-65.
- Antoch, M P, Song, E. J., Chang, AM., Vitaterna, M. H., Zhao, Y., Wilsbacher, L. D., Sangoram, AM., King, P. D., Pinto, L. H., Takahashi, J. S. (1997). Functional identification of the mouse circadian Clock gene by transgenic BAC rescue. *Cell*, 89(4), 655-667.
- Aschoff, J., (1965). Response curves in circadian periodicity. En: *Circadian clocks*. Aschoff J (Ed). Amsterdam: North-Holland, 95-111.
- Aschoff, J. (1960). Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. In: *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. Volume 25. *Biological Clocks*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press, 11–28.
- Aschoff, _J. (2001). A survey on Biological Rhythms. In F W Turek, J. S. Takahashi, R. Y. Moore (Eds.), *Handbook of Behavioral Neurobiology 12 Circadian Clocks*. New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers. 3-10pp.
- Aton, S. J., Colwell, C. S., Hahner, A. J., Waschek, J., Herzog, E. D. (2005). Vasoactive intestinal polypeptide mediates circadian rhythmicity and synchrony in mammalian clock neurons. *Nat Neurosci.*, 8(4), 476-483.
- Bady, I., Marty, N., Dallaporta, M., Emery, M., Gyger, J., Tarussio, D., Foretz, M., Thorens, B. (2006). Evidence from glut2-null mice that glucose is a critical physiological regulator of feeding. *Diabetes*, 55(4), 988-995.
- Bae, K., Jin, X., Maywood, E., Hastings, M., Reppert, S. M., Weaver, d. R. (2001). Differential functions of mPer1, mPer2, and mPer3 in the SCN circadian clock. *Neuron*, 30(2), 525-536.
- Bailey, C. J., Atkins, T. W., Conner, M. J., Manley, C. G., Matty, A. (1975). Diurnal variations of food consumption, plasma glucose and plasma insulin concentrations in lean and obese hyperglycaemic mice. *J.Horm Res.*, 6(5-6), 380-6.
- Banks, W. A., Coon, A. B., Robinson, S. M., Moinuddin, A., Shultz, J. M., Nakaoke, R., Morley, J. E. (2004). Triglycerides Induce Leptin Resistance at the blood-brain barrier. *Diabetes*, 53(5), 1253-1260.
- Banks, W. A, DiPalma, C. R., Farrell, C. L. (1999). Impaired transport of leptin across the blood-brain barrier in obesity. *Peptides*, 20(11), 1341-1345.

- Barnea, M., Madar, Z., Froy, O. (2009). High-fat diet delays and fasting advances the circadian expression of adiponectin signaling components in mouse liver. *Endocrinology*, 150(1), 161-168.
- Bays, H. E., González-Campoy, J. M., Bray, G. A., Kitabchi, A. E., Bergman, D. A., Schorr, A. B., Rodbard, H. W., Henry, R. R. (2008). Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity. *Expert Rev Cardiovasc Ther.*, 6(3), 343-368.
- Beaulé, C., & Amir, S. (1999). Photic entrainment and induction of immediate-early genes within the rat circadian system. *Brain Res*, 821(1), 95-100.
- Beaulé, C., Arvanitogiannis, A., Amir, S. (2001). Light suppresses Fos expression in the shell region of the suprachiasmatic nucleus at dusk and dawn: implications for photic entrainment of circadian rhythms. *Neuroscience*, 106(2), 249-254.
- Benloucif, S., Masana, M. I., Dubocovich, M. L. (1997). Responsiveness to melatonin and its receptor expression in the aging circadian clock of mice environmental stimulus circadian rhythms. *Am J Physiol.*, 273(6Pt2) R1855-R1860.
- Berson, David M, Dunn, F. A, Takao, M. (2002). Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science*, 295(5557), 1070-1073.
- Berthoud, H.R., & Morrison, C. (2008). The Brain , Appetite , and Obesity. *Annu Rev Psychol.*, (59), 55-92.
- Best, J.D., Maywood, E.S., Smith, K.L., Hastings, M.H., (1999). Rapid resetting of the mammalian circadian clock. *J. Neurosci.* 19, 828–835
- Bodosi, B., Gardi, J., Hajdu, I., Szentirmai, E., Obal, F., 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(5), R1071-R1079.
- Boulos, Z., Rosenwasser, A. M., Terman, M. (1980). Feeding schedules and the circadian organization of behavior in the rat. *Behav Brain Res.*, 1(1):39-65.
- Broberger, C., Johansen, J., Johansson, C., Schalling, M., Hökfelt, T. (1998). The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 95(25), 15043-15048.
- Brüning, J. C., Gautam, D., Burks, D. J., Gillette, J., Shubert, M., Orban, P. C., Klein, R., Krone, W., Muller-Wieland, D., Kahn, C. R. (2000). Role of brain receptor in control of body weight and reproduction. *Science*, 289(5487), 2122-2125.
- Buijs, R. M., Scheer, F. A., Kreier, F., Yi, C., Bos, N., Goncharuk, V. D., Kalsbeek, A. (2006). Organization of circadian functions: interaction with the body. *Prog Brain Res.*, 153, 341–360.

- Cailotto, C., La Fleur, S. E., Van Heijningen, C., Wortel, J., Kalsbeek, A., Feenstra, M., Pevet, P., 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 Neurosci.*, 22(10), 2531-2540.
- Calisi, R. M., & Bentley, G. E. (2009). Lab and field experiments: are they the same animal? *Horm Behav.*, 56(1), 1-10.
- Campfield, L. A., Smith, F. J., Guisez, Y., Devos, R., Burn, P. (1995). Recombinant mouse OB protein: Evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*, 269(5223), 546-549.
- Canani, R. B., Costanzo, M. D., Leone, L., Bedogni, G., Brambilla, P., Cianfarani, S., Nobili, V., Pietrobelli, A., Agostoni, C., (2011). Epigenetic mechanisms elicited by nutrition in early life. *Nutr Res Rev.*, 24(2), 198-205.
- 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.
- Carmona-Alcocer, V., Fuentes-Granados, C., Carmona-Castro, A., Aguilar-González, I., Cárdenas-Vázquez, R., Miranda-Anaya, M. (2012). Obesity alters circadian behavior and metabolism in sex dependent manner in the volcano mouse *Neotomodon alstoni*. *Physiol Behav.*, 105(3), 727-33.
- Ceballos G. & Oliva G. (2005). Los mamíferos silvestres de México. Distrito Federal, México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO)- Fondo de Cultura Económica
- Cha, M. C., Chou, C. J., Boozer, C. N. (2000). High-fat diet feeding reduces the diurnal variation of plasma leptin concentration in rats. *Metabolism*, 49(4), 503-7.
- Challet, E, Losee-Olson, S., Turek, F. W. (1999a). Reduced glucose availability attenuates circadian responses to light in mice. *Am J Physiol.*, 276(4Pt2), R1063-R1070.
- Challet, E., van Reeth, O., Turek, F. W. (1999b). Altered circadian responses to light in streptozotocin-induced diabetic mice. *Am J Physiol.*, 277(2Pt1), E232-E237.
- Challis, B. G., Coll, A. P., Yeo, G. S., Pinnock, S. B., Dickson, S. L., Thresher, R. R., Dixon, J., Zahn, D., Rochford, J. J., White, A., Oliver, R. L., Millington, G., Aparicio, S.A., Colledge, W.H., Russ, A. P., Carlton, M. B., O'Rahilly, S. (2004). Mice lacking pro-opiomelanocortin are sensitive to high-fat feeding but respond normally to the acute anorectic effects of peptide-YY(3-36). *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 101(13), 4695-4700.

- Chance, W. T., Thompson, H., Thomas, I., Fischer, J. E. (1995). Anorectic and neurochemical effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in rats. *Peptides*, 16(8), 1511-1516.
- Chen, D., Buchanan, G. F., Ding, J. M., Hannibal, J., Gillette, M. U. (1999). Pituitary adenylyl cyclase-activating peptide: a pivotal modulator of glutamatergic regulation of the suprachiasmatic circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(23), 13468-13473.
- Chen, H., Charlat, O., Tartaglia, L. A., Woolf, E. A., Weng, X., Ellis, S. J., Lakey, N. D., Culpepper, J., Moore, K. J., Duy, G. M., Tepper, R. I., Morgenstern, J. P. (1996). Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell*, 84(3), 491-495.
- Chen, P., Williams, S. M., Grove, K. L., Smith, M. S. (2004). Melanocortin 4 receptor-mediated hyperphagia and activation of neuropeptide Y expression in the dorsomedial hypothalamus during lactation. *J Neurosci*, 24(22), 5091-5100.
- Cheng, M. Y., Bullock, C. M., Li, C., Lee, A. G., Bermak, J. C., Belluzzi, J., Weaver, D. R., Leslie, F. M., Zhou, Q. Y. (2002). Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. *Nature*, 417(6887), 405-410.
- Coleman, R., & Lee, D. P. (2004). Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog Lipid Res.*, 43(2), 134-176.
- Daan, S., & Aschoff, J. (2001). The entrainment of circadian systems. En: Turek, F. W., Takahashi, J. S., Moore R. Y. (Eds.), *Handbook of Behavioral Neurobiology 12 Circadian Clocks*. New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers. 7-43
- Daan, S., & Pittendrigh, C. S. (1976). A Functional Analysis of Circadian Pacemakers in Nocturnal Rodents II. The Variability of Phase Response Curves. *J Comp Physiol*, 106, 253-266.
- Daan, S., & Pittendrigh, C. S. (1976b) A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. III. Heavy water and constant light: homeostasis of frequency? *J. Comp. Physiol.* 106,267–290.
- Dallmann, R., & Weaver, D. R. (2010). Altered body mass regulation in male mPeriod mutant mice on high-fat diet. *Chronobiol Int.*, 27(6), 1317-1328.
- Damiola, F., Le Minh, N., Preitner, N., Kornmann B, Fleury-Olela, F., Schibler, U. (2000). Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev*, 14(23), 2950-2961.
- Debruyne, J. P., Noton, E., Lambert, C. M., Maywood, E. S., Weaver, D. R., Reppert, S. M. (2006). A clock shock: mouse CLOCK is not required for circadian oscillator function. *Neuron*, 50(3), 465-77.

- de la Iglesia, H. O., Meyer, J., Carpino, A. Jr., Schwartz, W. J., (2000). Antiphase oscillation of the left and right suprachiasmatic nuclei. *Science*, 290(5492), 799-801.
- Delezie, J., & Challet, E. (2011). Interactions between metabolism and circadian clocks: reciprocal disturbances. *Ann N Y Acad Sci.*, 1243, 30-46.
- Devalaraja-Narashimha, K., & Padanilam, B. J. (2010). PARP1 deficiency exacerbates diet-induced obesity in mice. *J Endocrinol.*, 205(3), 243-52.
- Díaz-Muñoz, M., Vázquez-Martínez, O., Aguilar-Roblero, R., Escobar, C. (2000). Anticipatory changes in liver metabolism and entrainment of insulin, glucagon, and corticosterone in food-restricted rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 279(6), R2048-R2056.
- 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.
- Ding, J. M., Buchanan, G. F., Tischkau, S. a, Chen, D., Kuriashkina, L., Faiman, L. E., Alster, J. M., McPherson, P. S., Campbell, K. P., Gillette, M. U. (1998). A neuronal ryanodine receptor mediates light-induced phase delays of the circadian clock. *Nature*, 394(6691), 381-384.
- Ding, J. M., Chen, D., Weber, E. T., Faiman, L. E., Rea, M. a, Gillette, M. U. (1994). Resetting the biological clock: mediation of nocturnal circadian shifts by glutamate and NO. *Science*, 266(5191), 1713-1717.
- Ding, J. M., Faiman, L. E., Hurst, W. J., Kuriashkina, L. R., Gillette, M. U. (1997). Resetting the biological clock: mediation of nocturnal CREB phosphorylation via light, glutamate, and nitric oxide. *J Neurosci.*, 17(2), 667-675.
- Doyle, S. E., Yoshikawa, T., Hillson, H., Menaker, M. (2008). Retinal pathways influence temporal niche. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 105(35), 13133-13138.
- Duffield GE, Best JD, Meurers BH, Bittner A, Loros JJ, Dunlap JC. (2002). Circadian programs of transcriptional activation, signaling, and protein turnover revealed by microarray analysis of mammalian cells. *Curr Biol.*, 12(7), 551-557.
- Dulloo, A G., & Jacquet, J. (2001). An adipose-specific control of thermogenesis in body weight regulation. *Int J Obes Relat Metab Disord.*, 25 (5), S22-S29.
- Ebling, F. J., (1996). The role of glutamate in the photic regulation of the suprachiasmatic nucleus. *Prog Neurobiol.* 50(2-3):109-132.
- Eckert, R. & Randall, A. G., (1997). *Animal Physiology, Mechanisms and Adaptations*. W.H. Freeman NY. 728 p.

- Eide, E. J., Vielhaber, E. L., Hinze, W. a, Virshup, D. M. (2002). The circadian regulatory proteins BMAL1 and cryptochromes are substrates of casein kinase Iepsilon. *J Biol Chem.*, 277(19), 17248-17254.
- Elias, C. F., Lee, C., Kelly, J., Aschkenasi, C., Ahima, R. S., Couceyro, P. R., Kuhar, M. J., Saper, C. B., Elmquist, J. K. (1998). Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron*, 21(6), 1375-1385.
- Elmquist, J. K., Ahima, R. S., Elias, C. F., Flier, J. S., Saper, C. B. (1998). Leptin activates distinct projections from the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 95(2), 741-746.
- Ernsberger, P., Koletsky, R. J., Friedman, J. E. (1999). Molecular pathology in the obese spontaneous hypertensive Koletsky rat: a model of syndrome X. *Ann N Y Acad Sci.*, 892, 272-288.
- Escobar, C., Díaz-Muñoz, M., Encinas, F., Aguilar-Roblero, R. (1998). Persistence of metabolic rhythmicity during fasting and its entrainment by restricted feeding schedules in rats. *Am J Physiol.*, 274(5Pt2), R1309-R1316.
- Fan, W., Boston, B., Kesterson, R., Hruby, V., Cone, R. D. (1997). Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature*, 385(6612), 165-168.
- Field, M.D., Maywood, E.S., O'Brien, J.A., Weaver, D.R., Reppert, S.M., Hastings, M.H., (2000). Analysis of clock proteins in mouse SCN demonstrates phylogenetic divergence of the circadian clockwork and resetting mechanisms. *Neuron*, 25, 437-447.
- Fleur, S. E., Kalsbeek, A., Wortel, J., Buijs, R. M. (1999). A suprachiasmatic nucleus generated rhythm in basal glucose concentrations. *J Neuroendocrinol.*, 11(8), 643-652.
- Fleur, S. E., Kalsbeek, A., Wortel, J., van der Vliet, J., Buijs, R. M. (2001). Role for the Pineal and Melatonin in Glucose Homeostasis : Pinelectomy Increases Night-Time Glucose Concentrations. *J Neuroendocrinol.*, 13(12), 1025-1032.
- Foster, R G, Provencio, I., Hudson, D., Fiske, S., De Grip, W., Menaker, M. (1991). Circadian photoreception in the retinally degenerate mouse (rd/rd). *J Comp Physiol A*, 169(1), 39-50. Franklin, K. B. J. & Paxinos, G., (2008) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, 360.
- Freedman, M. S., Lucas, R., Soni, B., von Shantz, M., Muñoz, M., David-Gray, Z., Foster, R. (1999). Regulation of Mammalian Circadian Behavior by Non-rod, Non-cone, Ocular Photoreceptors. *Science*, 284(5413), 502-504.
- Fromme, T., & Klingenspor, M., (2011). Uncoupling protein 1 expression and high-fat diets. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 300(1), R1-8.

- Froy, O. (2010). Metabolism and Circadian Rhythms—Implications for Obesity. *Endocr Rev.*, 31(1), 1–24.
- Fuentes-Granados, C., Miranda-Anaya, M., Samario-Román, J., Moreno-Sáenz, E., Carmona-Castro, A., & Cárdenas-Vázquez, R. J. (2010). Circadian locomotor activity and response to different light conditions in the Volcano mouse, *Neotomodon alstoni* (Merriam, 1898). *Biological Rhythm Research*, 41(4), 269-278.
- Fuentes-Granados, C. (2011). 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 de Maestría. Facultad de Ciencias Universidad Nacional Autónoma de México, D. F.
- Fukagawa, K., Sakata, T., Yoshimatsu, H., Fujimoto, K., Uchimura, K., Asano, C. (1992). Advance shift of feeding circadian rhythm induced by obesity progression in Zucker rats. *Am J Physiol.*, 263(6Pt2), R1169-R1175.
- Garruti, G., Cotecchia, S., Giampetruzzi, F., Giorgino, F., Giorgino, R. (2008). Neuroendocrine deregulation of food intake, adipose tissue and the gastrointestinal system in obesity and metabolic syndrome. *J Gastrointest Liver Dis.*, 17(2), 193-198.
- Gekakis, N., Staknis, D., Nguyen, H. B., Davis, F. C., Wilsbacher, L. D., King, D. P., Takahashi, J. S., Weitz, C. J. (1998). Role of the CLOCK Protein in the Mammalian Circadian Mechanism. *Science*, 280(5369), 1564-1569.
- Gillette, Martha U, & Mitchell, J. W. (2002). Signaling in the suprachiasmatic nucleus : selectively responsive and integrative. *Cell Tissue Res.*, 309(1), 99-107.
- Ginty, D. D., Kornhauser, J. M., Thompson, M. A, Bading, H., Mayo, K. E., Takahashi, J. S., Greenberg, M. E. (1993). Regulation of CREB phosphorylation in the suprachiasmatic nucleus by light and a circadian clock. *Science*, 260(5105), 238-241.
- Giraud, S. Q., Billington, C. J., Levine, A S. (1998). Feeding effects of hypothalamic injection of melanocortin 4 receptor ligands. *Brain Res*, 809(2), 302-306.
- Gluckman, P. D. & Hanson, M.A., (2008). Developmental and epigenetic pathways to obesity: an evolutionary-developmental perspective. *Int J Obes (Lond)*, 32 Suppl 7, S62-S71
- Golombek, D. A., & Rosenstein, R. E. (2010). Physiology of Circadian Entrainment. *Physiol Rev.* 90(3), 1063-1102.
- Gong, D. W., Monemdjou, S., Gavrilova, O., Leon, L. R., Marcus-Samuels, B., Chou, C. J., Everett, C., Kozak, L. P., Li, C., Deng, C., Harper, M. E., & Reitman, M. L. (2000). Lack of obesity and normal response to fasting and thyroid hormone in mice lacking uncoupling protein-3. *J Biol Chem.*, 275(21), 16251-16257.
- Green, C. B., Takahashi, J. S., Bass, J. (2008). The meter of metabolism. *Cell*, 134(5), 728–742.

- Green, D. J., & Gillette, R. (1982). Circadian rhythm of firing rate recorded from single cells in the rat suprachiasmatic brain slice. *Brain Res.*, 245(1), 198-200.
- Gropp, E., Shanabrough, M., Borok, E., Xu, A. W., Janoschek, R., Buch, T., Plum, L., Balthasar, N., Hampel, B., Waisman, A., Barsh, G. S., Horvath, T. L., Brüning, J. C. (2005). Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding. *Nat Neurosci.*, 8(10), 1289-1291.
- Grundy, S. M. (1998). Multifactorial causation of obesity: implications for prevention. *Am J Clin Nutr.*, 67(3Suppl1), 563S-572S.
- Grundy, SM.(2005). A constellation of complications: the metabolic syndrome *Clin Cornerstone.*, 7(2-3), 36:45.
- Guan, X. M., Hess, J. F., Yu, H., Hey, P. J., van der Ploeg, L. H. (1997). Differential expression of mRNA for leptin receptor isoforms in the rat brain. *Mol Cell Endocrinol.*, 133(1), 1-7.
- Guido, M. E., Goguen, D., De Guido, L., Robertson, H. a, Rusak, B. (1999). Circadian and photic regulation of immediate-early gene expression in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience*, 90(2), 555-71.
- Güler, A. D., Ecker, J. L., Lall, G. S., Haq, S., Altimus, C. M., Liao, H-W., Barnard, A. R., Badea, T. C., Zhao, H., Hankins, M. W., Berson, D. M., Lucas, R. J., Yau, K. W., Hattar, S. (2008). Melanopsin cells are the principal conduits for rod-cone input to non-image-forming vision. *Nature*, 453(7191), 102-105
- Hagan, M., Rushing, P., Pritchard, L., Schwartz, M. W., Strack, A., van der Ploeg, L. H., Woods, S., Seeley, R. J., (2000). Long-term orexigenic effects of AgRP-(83--132) involve mechanisms other than melanocortin receptor blockade. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 279(1), R47-R53.
- Hahn, T. M., Breininger, J. F., Baskin, D. G., Schwartz, M. W. (1998). Coexpression of *Agrp* and *NPY* in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat Neurosci.*, 1(4), 271-272.
- Halaas, J. L., Gajiwala, K. S., Maffei, M., Cohen, S. L., Chait, B. T., Rabinowitz, D., Lallone, R. L., Burley, S. K., Friedman, J. M. (1995). Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*, 269(5223), 543-546.
- Hannibal, J., Vrang, N., Card, J. P., Fahrenkrug, J. (2001). Light-dependent induction of cFos during subjective day and night in PACAP-containing ganglion cells of the retinohypothalamic tract. *J Biol Rhythms.*, 16(5), 457-470.
- Hannibal, J. (2002). Neurotransmitters of the retino-hypothalamic tract. *Cell Tissue Res*, 309(1), 73-88.

- Harmar, A. J., Marston, H. M., Shen, S., Spratt, C., West, K. M., Sheward, W. J., Morrison, C. F., Dorin, J. R., Piggins, H. D., Reubi, J. C., Kelly, J. S., Maywood, E. S., Hastings, M. H. (2002). The VPAC(2) receptor is essential for circadian function in the mouse suprachiasmatic nuclei. *Cell*, 109(4), 497-508.
- Harrington, M E. (1997). The ventral lateral geniculate nucleus and the intergeniculate leaflet: interrelated structures in the visual and circadian systems. *Neurosci Biobehav Rev*, 21(5), 705-727.
- Hattar, S, Lucas, R. J., Mrosovsky, N., Thompson, S., Douglas, R. H., Hankins, M. W., Lem, J., Hofmann, F., Foster, R. G., Yau, K. W., (2003). Melanopsin and rod-cone photoreceptive systems account for all major accessory visual functions in mice. *Nature*, 424(6944), 76-81.
- Hattar, S, Liao, H. W., Takao, M., Berson, D. M., Yau, K. W. (2002). Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science*, 295(5557), 1065-1070.
- Henry, S. L., Bensley, J. G., Wood-Bradley, R. J., Cullen-McEwen, L. A., Bertram, J. F., Armitage, J. A. (2012). White adipocytes: more than just fat depots. *Int J Biochem Cell Biol.*, 44(3), 435-40.
- Hill, J. O. (2006). Understanding and addressing the epidemic of obesity: an energy balance perspective. *Endocr Rev.*, 27(7), 750-761.
- Hofbauer, K. G. (2002). Molecular pathways to obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord.*, 26 Suppl 2, S18-S27.
- Honma, S., Nakamura, W., Shirakawa, T., Honma, K. (2004). Diversity in the circadian periods of single neurons of the rat suprachiasmatic nucleus depends on nuclear structure and intrinsic period. *Neurosci Lett*, 358(3), 173-176.
- Honrado, G. I., Johnson, R. S., Golombek, D. A, Spiegelman, B. M., Papaioannou, V. E., & Ralph, M. R. (1996). The circadian system of c-fos deficient mice *J Comp Physiol A.*, 178(4), 563-570.
- Horton, T. H. (2001). Conceptual Issues in the Ecology and Evolution of Circadian Rhythms. In F W Turek, J. S. Takahashi, R. Y. Moore (Eds.), *Handbook of Behavioral Neurobiology 12 Circadian Clocks*. New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers. 45-54
- Hsieh, M. C., Yang, S.C., Tseng, H.L., Hwang, L.L., Chen, C.T., Shieh, K.R. (2010). Abnormal expressions of circadian-clock and circadian clock-controlled genes in the livers and kidneys of long-term, high-fat-diet-treated mice. *Int J Obes (Lond).*, 34(2), 227-239.
- Huang, X.F., Han, M., South, T., Storlien, L. (2003). Altered levels of POMC, AgRP and MC4-R mRNA expression in the hypothalamus and other parts of the limbic system of mice prone or resistant to chronic high-energy diet-induced obesity. *Brain Res.*, 992(1), 9-19.

- Hughes, A. T., & Piggins, H. D. (2008). Behavioral responses of *Vipr2*^{-/-} mice to light. *J Biol Rhythms*, 23(3), 211-219.
- Huszar, D., Lynch, C. A., Fairchild-Huntress, V., Dunmore, J. H., Fang, Q., Berkemeier, L. R., Gu, W., Kesterson, R. A., Boston, B.A., Cone, R. D., Smith, F. J., Campfield, L. A., Burn, P., Lee, F., (1997). Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell*, 88(1), 131-41.
- Ibata, Y., Okamura, H., Tanaka, M., Tamada, Y., Hayashi, S., Iijima, N., Matsuda, T., Munekawa, K., Takamutsu, T., Hisa, Y., Shigeyoshi, Y., Amaya F. (1999). Functional morphology of the suprachiasmatic nucleus. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 20(3), 241-268.
- Inouye, S., & Kawamura, H. (1979). Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic“ island” containing the suprachiasmatic nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(11), 5962-596.
- Inyushkin, A. N., Bhumbra, G. S., Dyball, R. E. J. (2009). Leptin modulates spike coding in the rat suprachiasmatic nucleus *J Neuroendocrinol.*, 21(8), 705-714.
- Johnson CH. (1990). Atlas of phase response curves for circadian and circatidal rhythms. Nashville, Tennessee: Department of Biology, Vanderbilt University. Available on line: <http://johnsonlab.biology.vanderbilt.edu>
- Johnson, C. H. (1999). Forty years of PRCs--what have we learned? *Chronobiol Int.*, 16(6), 711-743.
- Johnson, C. H., Elliott, J. A, Foster, R. (2003). Entrainment of circadian programs. *Chronobiol Int.*, 20(5), 741-774.
- Johnson, R. F., Moore, R. Y., Morin, L. P. (1988). Loss of entrainment and anatomical plasticity after lesions of the hamster retinohypothalamic tract. *Brain Res.*, 460(2), 297-313.
- Kalsbeek, A, Fliers, E., Romijn, J. A, La Fleur, S. E., Wortel, J., Bakker, O., Endert, E., Buijs, R. M. (2001). The suprachiasmatic nucleus generates the diurnal changes in plasma leptin levels. *Endocrinology*, 142(6), 2677-2685.
- Kalsbeek, A., Fleur, S. L., van Heijningen, C., Buijs, R. M. (2004). Suprachiasmatic GABAergic inputs to the paraventricular nucleus control plasma glucose concentrations in the rat via sympathetic innervation of the liver. *J Neurosci.*, 24(35), 7604-7613.
- Kim, S., Moustaid-Moussa, N., (2000). Secretory, endocrine and autocrine/paracrine function of the adipocyte. *J Nutr*,130(12),3110S-3115S.
- Ko, C. H., & Takahashi, J. S. (2006). Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum Mol Genet.*, 15 Spec No(2), R271-R277.

Código de campo cambiado

- Kornmann, B., Schaad, O., Bujard, H., Takahashi, J. S., Schibler, U. (2007). System-driven and oscillator-dependent circadian transcription in mice with a conditionally active liver clock. *PLoS Biol.*, 5(2),179-189.
- Kohsaka, A., Laposky, A. D., Ramsey, K. M., Estrada, C., Joshu, C., Kobayashi, Y., Turek, F. W., Bass, J. (2007). High-fat diet disrupts behavioral and molecular circadian rhythms in mice. *Cell Metab.*, 6(5), 414-421.
- Kolker, D. E., Vitaterna, M. H., Fruechte, E. M., Takahashi, J. S., Turek, F. W. (2004). Effects of age on circadian rhythms are similar in wild-type and heterozygous Clock mutant mice. *Neurobiol Aging*, 25(4), 517-523.
- Kondratov, R. V., Kondratova, A. A., Gorbacheva, V. Y., Vykhovanets, O. V., Antoch, M. P., (2006). Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock. *Genes Dev.*, 20(14),1868-73.
- Kovac, J., Husse, J., Oster, H., (2009). A time to fast, a time to feast: the crosstalk between metabolism and the circadian clock. *Mol Cells.*, 28(2), 75-80.
- Kramer, , Yang, F. C., Snodgrass, P., Li, X., Scammell, T. E., Davis, F. C., Weitz, C. J. (2001). Regulation of daily locomotor activity and sleep by hypothalamic EGF receptor signaling. *Science*, 294(5551), 2511-2515.
- Kraves, S., & Weitz, C. J. (2006). A role for cardiotrophin-like cytokine in the circadian control of mammalian locomotor activity. *Nat Neurosci.*, 9(2), 212-219.
- Kristensen, P., Judge, M. E., Thim, L., Ribel, U., Christjansen, K. N., Wulff, B. S., Clausen, J. T., Jensen, P. B., Madsen, O. D., Vrang, N., Larsen, P. J., Hastrup, S. (1998). Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature*, 393(6680), 72-76.
- Kudo, T., Tamagawa, T., Kawashima, M., Mito, N., Shibata, S. (2007). Attenuating effect of clock mutation on triglyceride contents in the ICR mouse liver under a high-fat diet. *J Biol Rhythms.*, 22(4), 312-323.
- Kume, K., Zylka, M. J., Sriram, S., Shearman, L. P., Weaver, D. R., Jin, X., Maywood, E. S., Hastings, M. H., Reppert, S. M., (1999). mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell*, 98(2), 193-205.
- Laburthe, M., & Couvineau, A. (2002). Molecular pharmacology and structure of VPAC Receptors for VIP and PACAP. *Regulatory Peptides*, 108(2-3), 165-173.
- Lamia, K. A., Storch, K. F., Weitz, C. J. (2008). Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(39), 15172-15177.

- Lanza-Jacoby, S., Stevenson, N. R., 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 Nutr.*, 116(9), 1798-1809.
- Li, J.D., Hu, W. P., Boehmer, L., Cheng, M. Y., Lee, A. G., Jilek, A., Siegel, J. M., Zhou, Q. Y. (2006). Attenuated circadian rhythms in mice lacking the prokineticin 2 gene. *J Neurosci.*, 26(45), 11615-11623.
- Liou, S. Y., Shibata, S., Iwasaki, K., Ueki, S. (1986). Optic nerve stimulation-induced increase of release of 3H-glutamate and 3H-aspartate but not 3H-GABA from the suprachiasmatic nucleus in slices of rat hypothalamus. *Brain Res Bull.*, 16(4), 527-531.
- Lowell, B. B., & Spiegelman, B. M. (2000). Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature*, 404(6778), 652-660.
- Luis, J., Cervantes, F. A., Martínez-Torres, M., Cárdenas, R., Delgado, J. Carmona, A. 2004. Male influence on maternal behavior and offspring of captive Volcano mice (*Neotomodon alstoni*) from México. *J. Mammalogy.* 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). *Revista de Biología Tropical.* 57 (1-2): 433-439.
- Luquet, S., Perez, F., Hnasko, T., Palmiter, R. (2005). NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. *Science*, 310(5748), 683-685.
- Marchant, E. G., Mistlberger, R. E., (1997). Anticipation and entrainment to feeding time in intact and SCN-ablated C57BL/6j mice. *Brain Res.*, 765(2), 273-82.
- Martelot, G., Claudel, T., Gatfield, D., Schaad, O., Kornmann, B., Sasso, G. L., Moschetta, A., Schibler, U., (2009). REV-ERB α participates in circadian SREBP signaling and bile acid homeostasis. *PLoS Biol.*, 7(9), e1000181.
- Mathur, A., & Golombek, D. A. (1996). cGMP-dependent protein kinase inhibitors block light-induced phase advances of circadian rhythms in vivo. *Am J Physiol.*, 270 (5Pt2), R1031-1036.
- Mendoza, J, Lopez-Lopez, C., Revel, F. G., Jeanneau, K., Delerue, F., Prinszen, E., Challet, E., Moreau, J. L., Grundschober, C., (2011). Dimorphic effects of leptin on the circadian and hypocretinergic systems of mice. *J Neuroendocrinol.*, 23(1), 28-38.
- Mendoza, Jorge, Pévet, P., Challet, E., (2008). High-fat feeding alters the clock synchronization to light. *JPhysiol.*, 586(Pt 24), 5901-10.
- Menéndez, J.A., & Atrens, D., (1991). Insulin and the paraventricular hypothalamus: modulation of energy balance. *Brain Res.*, 555(2), 193-201.

- Minana-Solis, M. C., Angeles-Castellanos, M., Feillet, C., Pevet, P., Challet, E., Escobar, C., (2009). Differential effects of a restricted feeding schedule on clock-gene expression in the hypothalamus of the rat. *Chronobiol Int.*, 26(5), 808-820.
- Mistlberger, R. E., (1994). Circadian food-anticipatory activity: formal models and physiological mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev.* 18(2), 171-195.
- Mistlberger, R. E., Holmes, M. M., (2000). Behavioral feedback regulation of circadian rhythm phase angle in light-dark entrained mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 279(3), 813-821.
- Mistlberger, R E, Lukman, H., Nadeau, B. G. (1998). Circadian rhythms in the Zucker obese rat: assessment and intervention. *Appetite*, 30(3), 255-267.
- Mistlberger, R, E. & Skene, D. J., (2004). Social influences on mammalian circadian rhythms: animal and human studies. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 79(3), 533-56.
- Mizuno, Y., Kondo, K., Terashima, Y., Arima, H., Murase, T., Oiso, Y. (1998). Anorectic effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in rats: lack of evidence for involvement of hypothalamic neuropeptide gene expression. *J Neuroendocrinol.*, 10(8), 611-616.
- Moga, M. M., & Moore, R. Y. (1997). Organization of neural inputs to the suprachiasmatic nucleus in the rat. *J Comp Neurol.*, 389(3), 508-34.
- Moore, Robert Y, Speh, J. C., Leak, R. K. (2002). Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell Tissue Res.*, 309(1), 89-98.
- Morin, L. P., & Allen, C. N. (2006). The circadian visual system, 2005. *Brain Res Rev*, 51(1), 1-60.
- Morris, D. L., Rui, L., (2009). Recent advances in understanding leptin signaling and leptin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, 297(6), E1247-59.
- Morrison, R. F., & Farmer, S. R. (1999). Insights into the transcriptional control of adipocyte differentiation. *J Cell Biochem.*, Suppl 32-33, 59-67.
- Motosugi, Y., Ando, H., Ushijima, K., Maekawa, T., Ishikawa, E., Kumazaki, M., Fujimura, A. (2011). Tissue-dependent alterations of the clock gene expression rhythms in leptin-resistant Zucker diabetic fatty rats. *Chronobiol Int.*, 28(10), 968-972.
- Mrosovsky, N., & Hattar, S. (2003). Impaired masking responses to light in melanopsin-knockout mice. *Chronobiol Int.*, 20(6), 989-999.
- Murakami, D. M., Horwitz, B. A, Fuller, C. A. (1995). Circadian rhythms of temperature and activity in obese and lean Zucker rats. *Am J Physiol.*, 269(5Pt2), R1038-R1043.

- Mühlbauer, E., Wolgast, S., Finckh, U., Peschke, D., Peschke, E. (2004). Indication of circadian oscillations in the rat pancreas. *FEBS Lett.*, 564(1-2), 91-96.
- Nowak R.M. (1999). *Walker's Mammals of the World*. Vol. II. Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press; 6th ed.
- Obici, S., Feng, Z., Karkanias, G., Baskin, D. G., Rossetti, L. (2002). Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats. *Nat Neurosci.*, 5(6), 566-572.
- Obrietan, K., Impey, S., Smith, D., Athos, J., & Storm, D. R. (1999). Circadian regulation of cAMP response element-mediated gene expression in the suprachiasmatic nuclei. *J Biol Chem.*, 274(25), 17748-17756.
- Ohta, H., Yamazaki, S., McMahon, D. G., (2005). Constant light desynchronizes mammalian clock neurons. *Nat Neurosci.*, 8(3), 267-269.
- Oishi, K., Atsumi, G.-I., Sugiyama, S., Kodomari, I., Kasamatsu, M., Machida, K., Ishida, N. (2006). Disrupted fat absorption attenuates obesity induced by a high-fat diet in Clock mutant mice. *FEBS Lett.*, 580(1), 127-130.
- Ollmann, M. M., Wilson, B., Yang, Y.K., Kerns, J., Chen, Y., I, G., Barsh, G. S. (1997). Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by Agouti-related protein. *Science*, 278(5335), 135-138.
- OMS. (2011). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/index.html>
- Oster, H., Damerow, S., Kiessling, S., Jakubcakova, V., Abraham, D., Tian, J., Hoffmann, MW., Eichele, G., (2006) The circadian rhythm of glucocorticoids is regulated by a gating mechanism residing in the adrenal cortical clock. *Cell Metab.*, 4(2),163-173.
- Pan, X. & Hussain, M. M., (2009). Clock is important for food and circadian regulation of macronutrient absorption in mice. *J Lipid Res.*, 50(9), 1800-1813.
- Panda, S., Antoch, M. P., Miller, B. H., Su, A. I., Schook, A. B., Straume, M., Schultz, P. G., Kay, S.A., Takahashi, J.S., Hogenesch, J. B., (2002). Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell*, 109(3), 307-320.
- Panda, S., Provencio, I., Tu, D. C., Pires, S. S., Rollag, M. D., Castrucci, A. M., Pletcher, M. T., Sato, T. k., Wilthire, T., Andahazy, M., Kay, S. a., Gelder, R. N., Hogenesch, J. B. (2003). Melanopsin is required for non-image-forming photic responses in blind mice. *Science*, 301(5632), 525-527.
- Park, H. T., Baek, S. Y., Kim, B. S., Kim, J. B., Kim, J. J. (1993). Profile of Fos-like immunoreactivity induction by light stimuli in the intergeniculate leaflet is different from that of the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.*, 610(2), 334-339.

Código de campo cambiado

- Peirson, S. N., Bovee-Geurts, P. H. M., Lupi, D., Jeffery, G., DeGrip, W. J., Foster, R. G. (2004). Expression of the candidate circadian photopigment melanopsin (Opn4) in the mouse retinal pigment epithelium. *Brain Res Mol Brain Res*, 123(1-2), 132-135.
- Pelleymounter, M. a, Cullen, M. J., Baker, M. B., Hecht, R., Winters, D., Boone, T., Collins, F. (1995). Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science*, 269(5223), 540-543.
- Pittendrigh, C. S. (1954). On temperature independence in the clock system controlling emergence time in drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 40(10), 1018-1029.
- Pittendrigh, C. S. (1993). Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. *Annu Rev Physiol.*, 55(1), 17-54.
- Pittendrigh, C. S., & Daan, S. (1976). A functional analysis of circadian pacemaker in nocturnal rodents I. The stability and lability of spontaneous frequency *J Comp Physiol* , 106, 223-252.
- Pittendrigh, C. S., & Daan, S. (1976b)., A functional analysis of circadian pacemaker in nocturnal rodents V. Pacemaker structure: A clock for all seasons. *J Comp Physiol.*, 106, 333-355.
- Possidente, B., McEldowney, S., Pabon, A. (1995). Aging lengthens circadian period for wheel-running activity in C57BL mice. *Physiol Behav.*, 57(3), 575-579.
- Preitner, N., Damiola, F., Zakany, J., Duboule, D., Albrecht, U., Schibler, U. (2002). The Orphan Nuclear Receptor REV-ERBalpha Controls Circadian Transcription within the Positive Limb of the Mammalian Circadian Oscillator. *Cell*, 110, 251-260.
- Prosser, R. A., & Bergeron, H. E. (2003). Leptin phase-advances the rat suprachiasmatic circadian clock in vitro. *Neurosci Lett.*, 336(3), 139-142.
- Provencio, I., Rollag, M. D., Bakun, A. (2002). Photoreceptive net in the mammalian retina. *Nature*, 415(6871), 493-494.
- Ralph, Martin R, Foster, R. G., Davis, F. C., Menaker, M. (1990). Transplanted Suprachiasmatic Nucleus Determines Circadian Period. *Science*, 247(41945), 975-978.
- Ramírez, C., García, A., Valdez, P., (2009). Ritmos Biológicos. En.Valdez, P (Ed.) *Cronobiología: Respuestas Fisiológicas al Tiempo*.Monterrey, México: Universidad de Nuevo León, 21-46
- Ramsey, K. M., Marcheiva, B., Kohsaka, A., & Bass, J. (2007). The Clockwork of Metabolism. *Annu Rev Nutr.*, 27, 219-240.

- Rattenborg, N.C., Voirin, B., Vyssotski, A.L., Kays, R.W., Spoelstra, K., Kuemmeth, F., Heidrich, W., Wikelski, M. (2008). Sleeping outside the box: electroencephalographic measures of sleep in sloths inhabiting a rainforest. *Biology Lett.*, 4, 402–405.
- Raspe, E., Duez, H., Mensen, A., Coralie, F., Fievet, C., Fruchart, J.C., Vennstrom, B., & Staels, B. (2002). Identification of Rev-erbalpha as a physiological repressor of apoC-III gene transcription. *J Lipid Res.*, 43(12), 2172-2179.
- Rea, M.A., (1989). Light increases Fos-related protein immunoreactivity in the rat suprachiasmatic nuclei. *Brain Res. Bull.* 23, 577–581.
- Reddy, A. B., Karp, N. A., Maywood E.S., Sage, E.A., Deery, M., O'Neill, J. S., Wong, G. K., Chesham J, Odell M, Lilley KS, Kyriacou CP, Hastings MH., (2006). Circadian orchestration of the hepatic proteome. *Curr Biol.*, 16(11), 1107-1115.
- Reeth, O., Weibel, L., Olivares, E., Maccari, S., Turek, F. W. (2001). Melatonin or a melatonin agonist corrects age-related changes in circadian response to environmental stimulus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 280(5), R1582-R1591.
- Rogers, P., & Webb, G. P. (1980). Estimation of body fat in normal and obese mice. *Br J Nutr.*, 43(1), 83-86.
- Ronti T, Lupattelli G, Mannarino E. 2006. The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clin Endocrinol (Oxf)*., 64(4), 355-365.
- Rudic, R.D., McNamara, P., Curtis, A.M., Boston, R.C., Panda, S., Hogenesch, J.B., Fitzgerald, G. A., (2004). BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis. *PLoS Biol.*, 2(11), e377.
- Ruiter, M., Fleur, S. E. L., Heijningen, C. V., Vliet, J. V. D., 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(7), 1709-1715.
- Rutter, J., Reick, M., Wu, L. C., McKnight, S. L., (2001). Regulation of clock and NPAS2 DNA binding by the redox state of NAD cofactors. *Science*. 293(5529), 510-514.
- Sage, D., Ganem, J., Guillaumond, F., Laforge-Anglade, G., François-Bellan, A.-M., Bosler, O., Becquet, D. (2004). Influence of the corticosterone rhythm on photic entrainment of locomotor activity in rats. *J Biol Rhythms.*, 19(2), 144-156.
- Salazar-Juárez, A., Escobar, C., Aguilar-Roblero, R. (2002). Anterior paraventricular thalamus modulates light-induced phase shifts in circadian rhythmicity in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 283(4), R897-R8904.
- Sans-Fuentes, M. A., Díez-Noguera, A., Cambras, T. (2010). Light responses of the circadian system in leptin deficient mice. *Physiol Behav.*, 99(4), 487-494.

- Sato, T. K., Yamada, R. G., Ukai, H., Baggs, J. E., Miraglia, L. J., Kobayashi, T. J., Welsh, D. K., Kay, S. A., Ueda, H. R., Hogenesch, J. B. (2006). Feedback repression is required for mammalian circadian clock function. *Nat Genet.*, 38(3), 312-319.
- Scarbrough, K., Losee-Olson, S., Wallen, E. P., Turek, F. W. (1997). Aging and photoperiod affect entrainment and quantitative aspects of locomotor behavior in Syrian hamsters. *Am J Physiol.*, 272(4 Pt 2), R1219-R1225.
- Schoeller, D. A. (2001). The importance of clinical research: the role of thermogenesis in human obesity. *Am J Clin Nutr.*, 73(3), 511-516.
- Segal, K. R., Edaño, A., Blando, L., Pi-Sunyer, F. X. (1990). Comparison caloric loads of thermic effects in lean and obese. *Am J Clin Nutr.*, 51(1), 14-21.
- Shearman, L. P., Zylka, M. J., Weaver, D. R., Kolakowski, L. F., Reppert, S. M. (1997). Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. *Neuron*, 19(6), 1261-1269.
- Shigeyoshi, Y., Taguchi, K., Yamamoto, S., Takekida, S., Yan, L., Tei, H., Moriya, T., Shibata, S., Loros, J.J., Dunlap, J.C., Okamura, H., (1997). Light-induced resetting of a mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the mPer1 transcript. *Cell* 91, 1043–1053.
- Shibata S, & Moore RY. (1993). Neuropeptide Y and optic chiasm stimulation affect suprachiasmatic nucleus circadian function in vitro. *Brain Res.* 615(1), 95-100.
- Shibata, S, Oomura, Y., Kita, H., Hattori, K. (1982). Circadian rhythmic changes of neuronal activity in the suprachiasmatic nucleus of the rat hypothalamic slice. *Brain Res*, 247(1), 154-158.
- Shinohara, K., Honma, S., Katsuno, Y., Abe, H., Honma, K. (1995). Two distinct oscillators in the rat suprachiasmatic nucleus in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 92(16), 7396-7400.
- Shimba, S., Ishii, N., Ohta, Y., Ohno, T., Watabe, Y., Hayashi, M., Wada, T., Aoyagi, T., Tezuka, M., (2005). Brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1), a component of the molecular clock, regulates adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 102(34), 12071-12076.
- Silva, J. E., (2006). Thermogenic mechanisms and their hormonal regulation. *Physiol Rev.*, 86(2), 435-464.
- Sniderman, A.D. & Faraj, M., (2007). Apolipoprotein B, apolipoprotein A-I, insulin resistance and the metabolic syndrome. *Curr Opin Lipidol.*, 18(6), 633-637.
- Speakman, J. R. (2004). Obesity: the integrated roles of environment and genetics. *J Nutr.*, 134(8), 2090S-2105S.

- Stephan, F. K., Swann, J. M., Sisk, C.L. (1979). Entrainment of circadian rhythms by feeding schedules in rats with suprachiasmatic lesions. *Behav Neural Biol.*, 25(4), 545-554.
- Stephan, F. K. (2002). The “Other” Circadian System: Food as a Zeitgeber. *J Biol Rhythms.*, 17(4), 284-292.
- Storch, K. F., Lipan, O., Leykin, I., Viswanathan, N., Davis, F. C., Wong, W. H., Weitz, C.J., (2002). Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature*, 417(6884), 78-83.
- Tahara, Y., Kuroda, H, Saito, K., Nakajima, Y., Kubo, Y., Ohnishi, N., Seo, Y., Otsuka, M., Fuse, Y., Ohura, Y., Komatsu, T., Moriya, Y., Okada, S., Furutani, N., Hirao A, Horikawa K, Kudo T, Shibata S. 2012 In Vivo monitoring of peripheral circadian clocks in the mouse. *Curr Biol.*, 22(11), 1029-1034.
- Tamaru, T., Isojima, Y., Yamada, T., Okada, M., Nagai, K., Takamatsu, K. (2000). Light and glutamate-induced degradation of the circadian oscillating protein BMAL1 during the mammalian clock resetting. *J Neurosci* 20, 7525–7530.
- Thresher, R. J. Vitaterna, M. H., Miyamoto, Y., Kazantsev, A., Hsu, D. S., Petit, C., Selby, C. P., Dawut, L., Smithies, O., Takahashi, J. S., Sancar, A. (1998). Role of Mouse Cryptochrome Blue-Light Photoreceptor in Circadian Photoresponses. *Science*, 282(5393), 1490-1494.
- Tischkau, S. A, Gallman, E. A, Buchanan, G. F., Gillette, M. U. (2000). Differential cAMP gating of glutamatergic signaling regulates long-term state changes in the suprachiasmatic circadian clock. *J Neurosci.*, 20(20), 7830-7837.
- Tischkau, S. A., Mitchell, J. W., Tyan, S.H., Buchanan, G. F., & Gillette, M. U. (2003). Ca²⁺ / cAMP response element-binding protein (CREB) -dependent activation of Per1 is required for light-induced signaling in the suprachiasmatic nucleus circadian clock . *J Biol Chem*, 278(2), 718-723.
- Triqueneaux, G., Thenot, S., Kakizawa, T., Antoch, M. P., Safi, R., Takahashi, J. S., Delaunay, F., Laudet, V., (2004). The orphan receptor Rev-erbalpha gene is a target of the circadian clock pacemaker. *J Mol Endocrinol.*, 33(3), 585-608.
- Turek, Fred W, Joshu, C., Kohsaka, A., Lin, E., Ivanova, G., McDearmon, E., Laposky, A., Losee-Olson, S., Easton, A., Jensen, D. R., Eckel, R. H., Takahashi, J. S., Bass, J. (2005). Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science*, 308(5724), 1043-1045.
- Urrejola, D., Lacey, E.A., Wiczorek, J.R., Ebensperger, L.A., 2005. Daily activity patterns of free-living cururos (*Spalacopus cyanus*). *J. Mam.*, 86, 302–308
- Vega, A. (1993). Análisis estadístico en cronobiología. *Psiquis*, 2(6), 139-149

- Vidal-Puig, A. J., Grujic, D., Zhang, C. Y., Hagen, T., Boss, O., Ido, Y., Szczepanik, A., Wade, J., Moothes, V., Cortright, R., Muoio, D. M., & Lowell, B. B., (2000). Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice. *J Biol Chem.*, 275(21), 16258-16266.
- Vieira, E., Marroquí, L., Batista, T. M., Caballero-Garrido, E., Carneiro, E. M., Boschero, A. C., Nadal, A., Quesada, I., (2012). The clock gene *Rev-erb α* regulates pancreatic β -cell function: modulation by leptin and high-fat diet. *Endocrinology*, 153(2), 592-601.
- Villa, A. R., Escobedo, M. H., Méndez-Sánchez, N. (2004). Estimación y proyección de la prevalencia de obesidad en México a través de la mortalidad por enfermedades asociadas. *Gac Méd Méx*, 140(2), S21–26.
- Vindlacheruvu R. R., Ebling F. J., Maywood E. S., Hastings M. H. (1992). Blockade of Glutamatergic Neurotransmission in the Suprachiasmatic Nucleus Prevents Cellular and Behavioural Responses of the Circadian System to Light. *Eur J Neurosci.* 4(7):673-679.
- Vogelbaum, M. A., & Menaker, M. (1992). Temporal chimeras produced by hypothalamic transplants. *J Neurosci.*, 12(9), 3619-3627.
- Wang, J. & Lazar, M. A., (2008). Bifunctional role of *Rev-erb α* in adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol.*, 28(7), 2213-20.
- Wang, D. & Sul, H. S., (1998). Insulin stimulation of the fatty acid synthase promoter is mediated by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. Involvement of protein kinase B/Akt. *J Biol Chem*, 273(39), 25420-25426.
- Weber, E. T., Gannon, R. L., & Rea, M. A. (1995). cGMP-dependent protein kinase inhibitor blocks light-induced phase advances of circadian rhythms in vivo. *Neurosci Lett.* 197(3), 227-230.
- Welsh, D K, Logothetis, D. E., Meister, M., Reppert, S. M. (1995). Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron*, 14(4), 697-706.
- Woods, S. C., Seeley, R. J., Porte, D., Schwartz, M. W. (1998). Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science*, 280(5368), 1378-1383.
- Wynne, K., Stanley, S., McGowan, B., Bloom, S. (2005). Appetite control. *J Endocrinol.*, 184(2), 291-318.
- Yan, L., & Silver, R. (2002). Differential induction and localization of *mPer1* and *mPer2* during advancing and delaying phase shifts. *Eur J Neurosci.*, 16(8), 1531-1540.
- Yan, L., & Silver, R. (2004). Resetting the brain clock: time course and localization of *mPER1* and *mPER2* protein expression in suprachiasmatic nuclei during phase shifts. *Eur J Neurosci.*, 19(4), 1105-1109.

- Yang, S., Liu, A., Weidenhammer, A., Cooksey, R. C., McClain, D., Kim, M. K., Aguilera, G., Abel, E. D., Chung, J. H.. (2009). The role of mPer2 clock gene in glucocorticoid and feeding rhythms. *Endocrinology*, 150(5), 2153-60.
- Yannielli, P. C., Molyneux, P. C., Harrington, M. E., Golombek, D. A., (2007). Ghrelin effects on the circadian system of mice. *J Neurosci.*, 27(11), 2890-2895.
- Yaswen, L., Dichl, N., Brennan, M. B., Hochgeschwender, U., (1999). Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nat Med.*, 5(9), 1066-1070.
- Yi, C.X., Challet, E., Pévet, P., Kalsbeek, A., Escobar, C., Buijs, R. M., (2008). A circulating ghrelin mimetic attenuates light-induced phase delay of mice and light-induced Fos expression in the suprachiasmatic nucleus of rats. *Eur J Neurosci.*, 27(8), 1965-1972.
- Yi, C. X., de Vliet, J., Dai, J., Yin, G., Ru, L., Buijs, R. M. (2005). Suprachiasmatic Nucleus. *Endocrinology*, 147(1), 283-294.
- Yoo, S. H., Yamazaki, S., Lowrey, P. L., Shimomura, K., Ko, C. H., Buhr, E. D., Slepka, S. M., Hong, H. K., Oh, W. J., Yoo, O. J., Menaker, M., Takahashi, J. S.. (2004). PERIOD2 :: LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 101(15), 5339-5346.
- Yu, W., Nomura, M., & Ikeda, M. (2002). Interactivating feedback loops within the mammalian clock: BMAL1 is negatively autoregulated and upregulated by CRY1, CRY2, and PER2. *Biochem Biophys Res Commun.*, 290(3), 933-941.
- Zhang, C. Y., Perret, P., Krauss, S., Peroni, O., Grujic, D., Hagen, T., Vidal-Puig, A. J., Boss, O., Kim, Y. B., Zheng, X. X., Wheeler, M. B., Shulman, G. I., Lowell, B. B. (2001). Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes. *Cell*, 105(6), 745-755.
- Zheng, B., Albrecht, U., Kaasik, K., Sage, M., Lu, W., Vaishnav, S., Li, Q., Sun, Z. S., Eichele, G., Bradley, A., Lee, C. C (2001). Nonredundant roles of the mPer1 and mPer2 genes in the mammalian circadian clock. *Cell*, 105(5), 683-694.
- Zvonic, S., Pitsyn, A. A., Conrad, S. A., Scott, L. K., Floyd, Z. E., Kilroy, G., Wu, X., Goh, B. C., Mynatt, R. L., Gimble, J. M. (2006). Characterization of Peripheral Circadian Clocks in Adipose Tissues. *Diabetes*, 55(4), 962-970.

ANEXO 1: ARTÍCULO PUBLICADO

Carmona-Alcocer, V., Fuentes-Granados, C., Carmona-Castro, A., Aguilar-González, I., Cárdenas-Vázquez, R., & Miranda-Anaya, M. (2012). **Obesity alters circadian behavior and metabolism in sex dependent manner in the volcano mouse *Neotomodon alstoni***. *Physiology & behavior*, 105(3), 727-33.



Obesity alters circadian behavior and metabolism in sex dependent manner in the volcano mouse *Neotomodon alstoni*

Vania Carmona-Alcocer, Citlalli Fuentes-Granados, Agustín Carmona-Castro, Ivette Aguilar-González, René Cárdenas-Vázquez, Manuel Miranda-Anaya*

Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, UNAM 04510, México D.F., México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 July 2011

Received in revised form 29 August 2011

Accepted 29 September 2011

Keywords:

Circadian rhythm

Sex differences

Neotomodon alstoni

Obesity

Volcano mouse

ABSTRACT

The aim of the present study is to evaluate whether circadian locomotor activity, and the daily profile of plasma parameters related to metabolic syndrome (nutrients: glucose and triacylglycerides, and hormones: insulin and leptin), differ between male and female *Neotomodon alstoni* mice, both lean and obese. Young adult animals were captured in the field and kept at the laboratory animal facility. After 6 to 7 months feeding the animals *ad libitum* with a regular diet for laboratory rodents, 50–60% of mice became obese. Comparisons between sexes indicated that lean females were more active than males; however obese females reduced their nocturnal activity either in LD or DD, and advanced the phase of their activity-onset with respect to lights off. No differences in food intake between lean and obese mice, either during the day or night, were observed. Daily profiles of metabolic syndrome-related plasma parameters showed differences between sexes, and obesity was associated with increased values, especially leptin (500% in females and 273% in males) and insulin (150% in both females and males), as compared with lean mice. Our results indicate that lean mice display behavioral and endocrine differences between sexes, and obesity affects the parameters tested in a sex-dependent manner. The aforementioned leads us to propose *N. alstoni*, studied in captivity, could be an interesting model for the study of sex differences in the effects of obesity.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Obesity is an increasing problem in the industrialized world. It has become the most common nutritional disorder in Western populations and is characterized by a chronic imbalance between energy intake and expenditure [1]. Its effects are mainly associated with health problems such as glucose intolerance, hypertriglyceridemia and hypertension which, altogether, are the principal parameters that constitute metabolic syndrome (MS) [2,3]. Rodent models for studying and understanding obesity have been favored for many reasons, depending on the goals of a given study. Most of these models require artificial genetic or physiologic intervention, and obesity may be induced by hypercaloric diets high in lipids or carbohydrates [for review, see: 4–6]. Most physiological functions oscillate during the day according to a circadian clock, with endogenous circadian rhythms originating in the Suprachiasmatic Nucleus (SCN). The circadian clock plays an important role in the regulation of virtually all aspects of behavior and physiology [7,8]. Deregulation of circadian rhythms is linked with factors that produce obesity and metabolic syndrome; such deregulation may result from disrupting the communication between the SCN and hypothalamic areas involved in food

intake and organization of activity, or from disrupting the link between the core cellular mechanism of the mammalian circadian clock and the cellular regulation of lipid metabolism and adipogenesis [9,10, for review, see 11–13]. Therefore, obesity and deregulation of circadian rhythms seem to be a current health issue.

The use of nontraditional mammal models to approach problems related to obesity allows the advantage of allelic variation in natural populations, the raw material on which natural selection works [14]. Also, the need for a better understanding of the consequences of obesity in humans, addressed in different animal models, makes it important to study the daily changes in parameters related to MS. The volcano mouse *Neotomodon alstoni*, is an endemic species from the Mexican Neovolcanic Transversal Belt. This species has been the focus of diverse biological and physiological studies including circadian rhythms [15–23]. When *N. alstoni* is fed regular rodent chow in captivity, after about 6 months, some animals (50–60% of both females and males) show an increase in body weight. Obese *N. alstoni* show some signs of metabolic syndrome, such as hepatic steatosis, hypertriglyceridemia, glucose intolerance and hyperleptinemia (Carmona-Castro A, personal communication). The aforementioned makes this species a good model for studying the relationship between circadian behavior and metabolic disorders, as well as the role of sex. Indeed, it is known that sex hormones directly influence the circadian properties of locomotor activity in mice [24] and also participate in the development of obesity [for review, see 25]. The

* Corresponding author at: Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, UNAM, México, D.F. 04510, Mexico. Tel.: +52 55 56224833; fax: +52 55 56224828.

E-mail address: miranmanuel@ciencias.unam.mx (M. Miranda-Anaya).

link between sex hormones and obesity could be related to the human sex differences in body fat distribution [26]. The aim of the present work is to compare sexes in the effects of obesity on daily and circadian locomotor activity, and daily profiles of parameters related to MS (circulating glucose, triacylglycerides, insulin and leptin) in the adult mouse *N. alstoni*. Due to the possible relationship between circadian alterations and metabolic disorders, this species is of special interest in addressing this problem, because of spontaneous weight gain in captivity, when fed with regular chow diet.

2. Methods

2.1. Animals and housing

Female (F) and male (M) young adult *N. alstoni* were collected in the field as described elsewhere [23]. The following morphological characteristics were used to identify the captured population: body weight below 40 g, body length between 100 and 130 mm, ears almost hairless, and the upper parts of the body covered with a dense clear gray fur and whitish underbelly [27,28]. All animals were deparasitized by ether anesthesia and brushing, and then kept in individual cages at the vivarium facilities of the Facultad de Ciencias, UNAM. Commercial diet for laboratory rodents (Rodent Lab Chow 5001, Purina Inc.) and tap water were provided *ad libitum*, room temperature was between 18 and 23 °C, light–dark cycles (LD) were set at 12:12 (photophase: 0600–1800, 200–250 lx). By the seventh month in captivity, female and male mice were separated by bodyweight (BW) in two groups: lean male (LM) and lean female (LF) mice (BW 49 ± 2 g) and obese male (ObM) and obese female (ObF) mice (BW 73 ± 2 g), with obesity characterized according to the Lee index, [29] modified by Ernsberger [30] calculated as the cube root of body weight ($g^{0.33}$) divided by nasoanal length (mm) and multiplied by 10^4 . Food intake estimation in LD was performed by weighing chow pellets, at lights on and lights off for ten days. All procedures described in this work were carried out in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [31] and the official Mexican regulation for experimentation in animals [32].

2.2. Locomotor activity recordings

Freely moving locomotor activity was recorded by infrared light beams in a non-wheel running environment. Each cage was placed in a light-tight wooden box, equipped with a fluorescent lamp (200–250 lx) controlled by a timer. Ventilation inside the chamber was kept constant using a small fan, and room temperature was kept between 23 and 25 °C. Equipment and acquisition data software

ACTBIO were designed at Facultad de Psicología, UNAM, Mexico. Each beam interruption was considered as a single event and data were collected by a PC every 10 min (bin cell), and analyzed both in photophase and scotophase (light or dark phase of the LD cycle, respectively) by means of software ACTIVIEW® (Minimitter, Sunriver, OR) and DISPAC (IFC UNAM, Mex.). When maintenance was needed in darkness, a background of dim red light was used (2–3 lx). Data obtained from locomotor activity recordings were compared among groups (28 lean and 28 obese males, and 20 lean and 20 obese females).

2.3. Metabolite and hormone assays

A separate group of mice (6 LM, 6 ObM, 6 LF and 6 ObF) were used to quantify blood parameters (except for leptin, where we used 5 from each group) at the following LD cycle time of sampling: at lights-on, at noon, at lights-off, and at midnight, corresponding to Zeitgeber time (ZT): 0, 6, 12 and 18 respectively. Samples of around 800 µl were taken from each animal, with a frequency not exceeding once every fourth day. In order to quantify basal concentrations of each parameter, the animals were deprived of food 4 h before sampling. Blood samples were taken from the retro orbital sinus using heparinized capillary tubes, in animals anesthetized with volatilized isoflurane (Dorin, Halocarbon Labs, USA). All samples were spun at 3500 rpm/5 min, and then 400 µl of plasma were separated and kept at –70 °C until assayed. The analytical assays were done according to the manufacturer's instruction: triacylglycerides and glucose were quantified in plasma by an enzymatic method, using Spinreact Glucose-Tr and Spinreact Triacylglycerides-L kits; insulin and leptin were quantified by Ultra Sensitive Mouse Insulin and Mouse Leptin ELISA kits, (both from Cristal Chem. Inc, USA). All reactions were measured by means of a micro plate reader (Spectramax 190, Molecular Devices, USA).

2.4. Data analysis

All values are shown as mean ± SEM. Comparisons were made by means of Analysis of Variance (one way ANOVA) followed by Tukey's multiple pairwise comparisons, or unpaired student's *T*-test when indicated (Stat Graphics Centurion 16.1.05 software). Statistical significance was considered when $p < 0.05$. Activity data were analyzed by means of double plotted actograms, average waveforms and χ^2 periodograms were obtained by means of ACTIVIEW® and DISPAC software. Phase of activity onset was defined as the time at which activity exceeded 50% of the amplitude during at least six consecutive bin units. During entrainment in LD, phase angle relationship (Ψ), was considered as the difference in time (min) of the activity onset

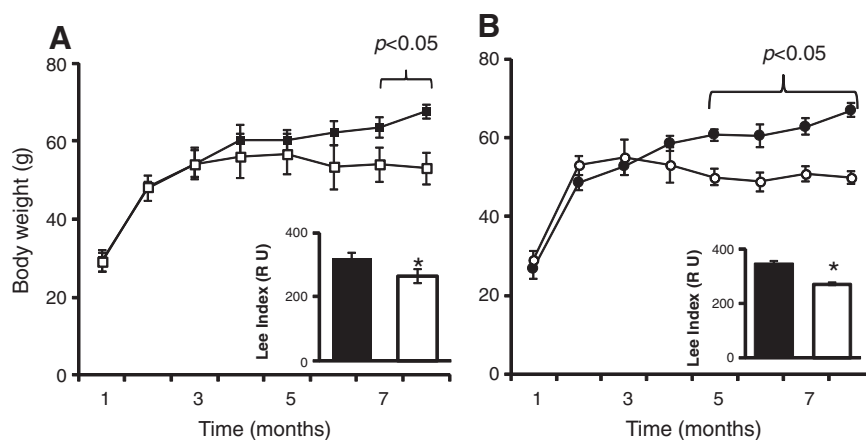


Fig. 1. Changes in body weight average (\pm SEM) in *Neotomodon alstoni*. Males (A) and females (B), followed during 8 months ($n = 6$ mice, each group). Empty symbols represent lean animals and filled ones indicate obese animals. Lee index in relative units (RU) for obese and lean mice at month 8th in captivity is compared within each graph ($* = p < 0.05$, student's *T* test).

and lights off; when the activity onset occurs before lights off, Ψ is shown with a positive sign. Activity during subjective night (α) or during subjective day (ρ) in DD, was determined by the average waveform of 10 consecutive days in DD, from actograms fitted to resultant period.

3. Results

3.1. Body weight increment

Fig. 1A shows the growth curves of males (LM = empty squares; ObM = filled squares) and Fig. 1B of females (LF = empty circles; ObF = filled circles), from a sample of 6 each group, followed during 8 months. After capture, all animals increased their BW during the first month and then, the rate of BW increase diverged among individuals. By the 7th month, two groups of mice with different BWs could be distinguished ($p < 0.05$). The same occurred with the Lee Index in Relative

Units (RU) shown in the same figure (inside plots). By the 8th month, the average index for ObF: 321 ± 20 RU and LF: 267 ± 22 RU, while in ObM: 348 ± 28 RU and for LM: 272 ± 18 RU; $p < 0.05$, student's *T*-test.

3.2. Locomotor activity in LD and DD

Fig. 2A shows representative actograms from lean (left) and obese mice (right) entrained to LD cycles and then released to DD. Photophase is indicated with a square inside the actogram. Comparisons of the average locomotor activity (crossings/bin cell; Fig. 2B) showed that in scotophase, LF display greater mean activity than LM (88.3 ± 15.4 , and 30.8 ± 6.4 crossings/bin cell, respectively, $p < 0.05$). Also, ObF (49.5 ± 8.5 crossings/bin cell) display lower mean activity than LF; while no differences were found between ObM and LM (34.8 ± 6.3 and 30.8 ± 6.4 crossings/bin cell, respectively). No differences were found between groups during the photophase (ObF: 7.7 ± 3.4 and LF: 5.9 ± 1.6 ; ObM: 5.3 ± 0.1 and LM: 2.9 ± 0.5 crossings/bin

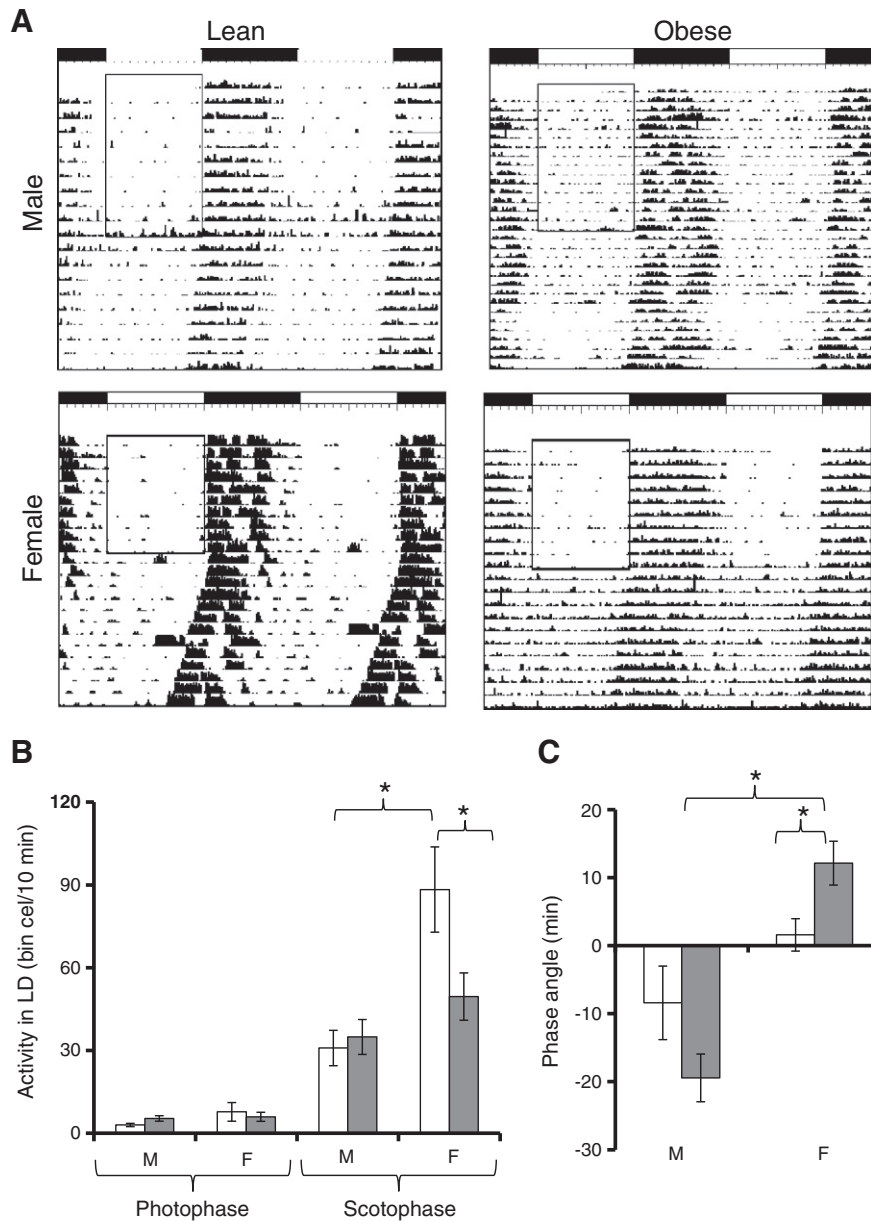


Fig. 2. Daily locomotor activity. Representative actograms (A) depicting the locomotor activity rhythm in LD (photophase indicated as an esquare inside actograms) and DD, from lean (left) and obese (right) *N. alstoni*. (B; filled bars = obese, empty bars = lean), shows the quantification of locomotor activity under LD cycles. During the night, differences were found between LF and LM, as well as between LF and ObF. A similar pattern of differences were observed in the onset of activity (C). Males did not show differences between lean and obese. (* = $p < 0.05$, student's *T* test).

cell). When analyzing the phase relationship (Ψ) in LD with respect to lights-off (Fig. 2C), it was observed that LF tend to display an earlier onset ($\Psi: 1.5 \pm 2.3$ min) than LM ($\Psi: -8.4 \pm 5.4$ min). This tendency became statistically significant in ObM and ObF ($\Psi = -19.4 \pm 3.5$ min, $\Psi = 12.1 \pm 3.2$ min, respectively; $p < 0.05$; student's *T*-test).

When comparing mean daily food intake for ten days during photophase, no significant differences were found between LM (0.28 ± 0.08 g per animal) and LF (0.21 ± 0.05 g), neither in ObM (0.25 ± 0.04 g) ObF (0.21 ± 0.06 g) nor during the scotophase in LM (4.7 ± 2.2 g) and LF (5.22 ± 0.4 g) and between ObM (4.7 ± 0.4 g) and ObF (5.5 ± 0.32 g). This feeding pattern corresponds to a nocturnal animal.

After at least 10 days in LD, the animals were exposed to constant darkness (DD). Fig. 3A shows some characteristics of the free-running circadian rhythm of locomotor activity. Fig. 3A shows the percentage of the circadian rhythm classified as subjective day (ρ white bars) or subjective night (α black bars). The circadian cycles of lean mice are characterized by a larger period of rest (ρ LM = $56.6\% \pm 0.85$, ρ LF =

$55.2\% \pm 1.2$), whereas obese mice show reduced resting time, particularly ObF (ρ $49.5 \pm 1.5\%$). Comparing the average amount of locomotor activity either in α and ρ respectively (crossings/bin cell; Fig. 3B), showed that in subjective night (α), LF display more average activity than LM (82 ± 12.5 , and 28 ± 6.5 crossings/bin cell, respectively, $p < 0.05$). ObF (42.3 ± 10.7 crossings/bin cell) also displayed lower average activity than lean females ($p < 0.05$). Also, LF were more active in subjective day than LM (11.7 ± 2.4 and 4.5 ± 1 crossings/bin cell, respectively). Circadian free running period, as determined by periodogram analysis (*t*, Fig. 2C), did not show statistical differences between lean and obese mice, either in males (LM $t = 23.7 \pm 0.05$ h; ObM $t = 23.76 \pm 0.05$ h), nor females (LF $t = 23.8 \pm 0.09$ h; ObF $t = 24.11 \pm 0.26$ h).

3.3. Metabolites and hormones profile in LD

Table 1 shows the highest (up arrow) and the lowest (down arrow) average of the values (\pm SEM) of all blood parameters tested, as well as their corresponding time (ZT). Significant differences in timing ($p < 0.05$, one way ANOVA) along LD cycle are indicated with (*) in lean mice. Leptin did not show daily variations in lean mice, either for M or F, neither did insulin vary among F; otherwise most of the parameters display daily variations. Peak times (ZT) were different between LM and LF in glucose (ZT 06, and 12), insulin (ZT 06 and 0) and leptin (ZT 12 and 0), respectively.

Differences in peak amplitude, or lowest average values between obese and lean are indicated with a (#). The peak of insulin in ObF was increased 156% relative to that in LF. Leptin was elevated five-fold (500%) in ObF compared to LF; while ObM showed an increase of about 273% relative to LM.

Fig. 4 displays double-plotted curves for average values (\pm SEM), at all time points tested, for basal glucose, insulin, triacylglycerides and leptin. Amplitudes of curves in all of the graphs indicate a tendency toward higher values in obese than in lean mice, statistical differences (Student's *T*-test, $p < 0.05$) at the same time point between lean and obese are shown with an (*).

3.3.1. Glucose

Increased average glucose levels (14%), were mainly found in ObF during the photophase, whereas ObM did not show differences with LM. Glucose peaks at ZT 6 were present in both obese and lean mice. Lowest values were found during the scotophase. Comparisons between obese and lean mice at all ZT timepoints indicate significantly higher values in ObF at ZT 6 and 12.

3.3.2. Insulin

Increased levels of insulin were observed in ObF at ZT 0 and 6, *i.e.* by the end of the night and at noon (156% increase), whereas in ObM, these higher levels (60%) were only detected at ZT 12.

3.3.3. Triacylglycerides

Increased triglyceride levels (49%) were found in ObF compared with lean; however, significant differences were detected only at ZT 18. However, the variance in female triacylglyceride levels was greater than that for insulin concentrations.

3.3.4. Leptin

Both ObM and ObF showed increased leptin levels compared with lean mice at all timepoints tested (273% and 500%, respectively). Particularly, the highest levels were found in obese females. Leptin peaks occurred at the end of the dark phase in both groups.

No differences were found when comparing LM and LF in all parameters tested; however, we observed that females tended to have higher basal glucose and leptin levels.

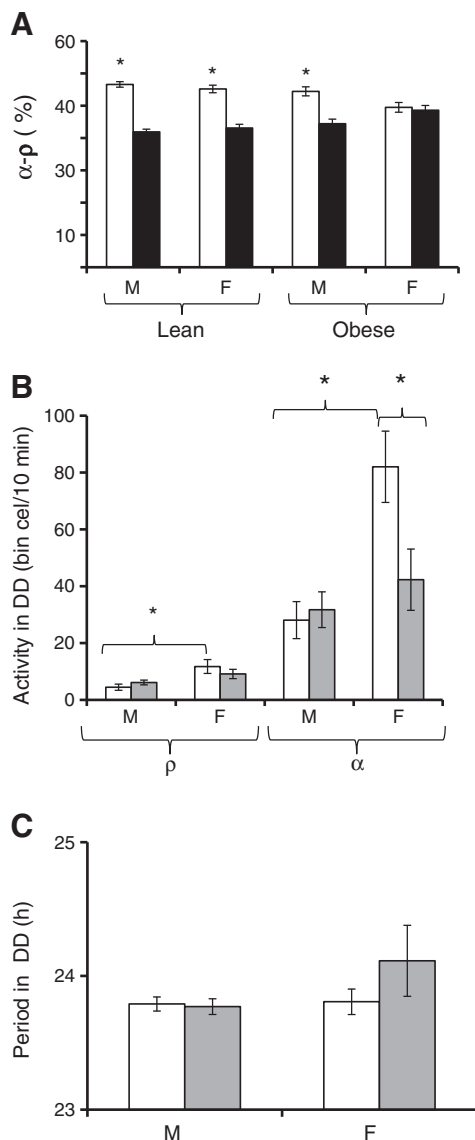


Fig. 3. Circadian locomotor activity. Percentage of activity (α black bars) and rest (ρ empty bars) in constant darkness (A), shows that there are significant differences between α and ρ in all groups, except in obese females. Activity average (crossings/10 min) is also shown in (B), with a significant decrease in ObF. No significant changes in free running period were noted between sexes or between lean and obese mice.

Table 1

Serum profiles. Average (\pm SEM) of the highest (up arrow) and lowest values (down arrow) found in lean and obese mice. Corresponding ZT is also noted. Significant differences between high and low values in the same group are indicated with (*) while significant differences between obese and lean for each parameter tested are indicated with (#).

		Females				Males			
		↑	ZT	↓	ZT	↑	ZT	↓	ZT
Glucose (mg/dl)	Lean	98 \pm 10*	06	72 \pm 6	18	115 \pm 11*	12	77 \pm 4	18
	Obese	140 \pm 29	06	82 \pm 6	18	111 \pm 11	06	94 \pm 7	00
Insulin (ng/ml)	Lean	0.85 \pm 0.22#	06	0.56 \pm 0.29	18	1.09 \pm 0.28*	00	0.33 \pm 0.06#	12
	Obese	2.18 \pm 0.59	00	0.91 \pm 0.21	18	1.60 \pm 0.42	00	0.82 \pm 0.19	18
Triacylglycerides (mg/dl)	Lean	113 \pm 25*	06	36 \pm 6	18	117 \pm 20*	06	34 \pm 5#	18
	Obese	169 \pm 41*	06	60 \pm 11	18	134 \pm 22	00	73 \pm 20	18
Leptin (ng/ml)	Lean	0.44 \pm 0.18#	12	0.24 \pm 0.09#	18	0.45 \pm 0.13#	00	0.17 \pm 0.04#	18
	Obese	2.65 \pm 0.70	00	1.34 \pm 0.51	06	1.68 \pm 0.42	00	0.91 \pm 0.26	12

4. Discussion

In the present work, mice were kept in a non-wheel running environment, yet displayed clear circadian rhythms in locomotor activity, as previously observed [23]. We used wild captured mice, which presumably have high variability among individuals. As part of this variability, we consider the possibility that age in all animals used is not the same; however, the main criteria to choose animals were characteristics usually shown by young adults [28]. By the time the activity recordings were performed and blood samples were taken, the animals had been kept under vivarium conditions for 7 months, reducing the possibility that the findings were a consequence of incomplete acclimation to laboratory conditions. It is known that in other models of rodents, many of the circadian properties studied in the present work may change with age [33–38]. It is important to note that *N. alstoni* in captivity have shown a lifespan longer than 3 years ([18] and unpublished

observations); therefore, it is unlikely that the young adults here could be considered old.

Steroid hormones from the male and female gonads influence the function of the circadian system in adulthood [39]. Sex differences in free running period have been reported in other species of rodents [40–44], as well as differences in the timing of activity onset [36]. In mice, sex differences in circadian rhythms indicate that androgen receptors are more abundant in the male SCN, and gonadectomized mice drastically change their activity profile and free-running period. In contrast, ovariectomized females do not show such profound effects, but they do display a reduction in activity levels and increased variance in the activity onset time [24].

With regard to the latter, it is important to point out that similar results were observed in *Obf N. alstoni*, both in circadian locomotor activity and metabolite/hormone profiles (Figs. 2 and 3). There is increasing evidence that obesity in mice may be related to a deficiency

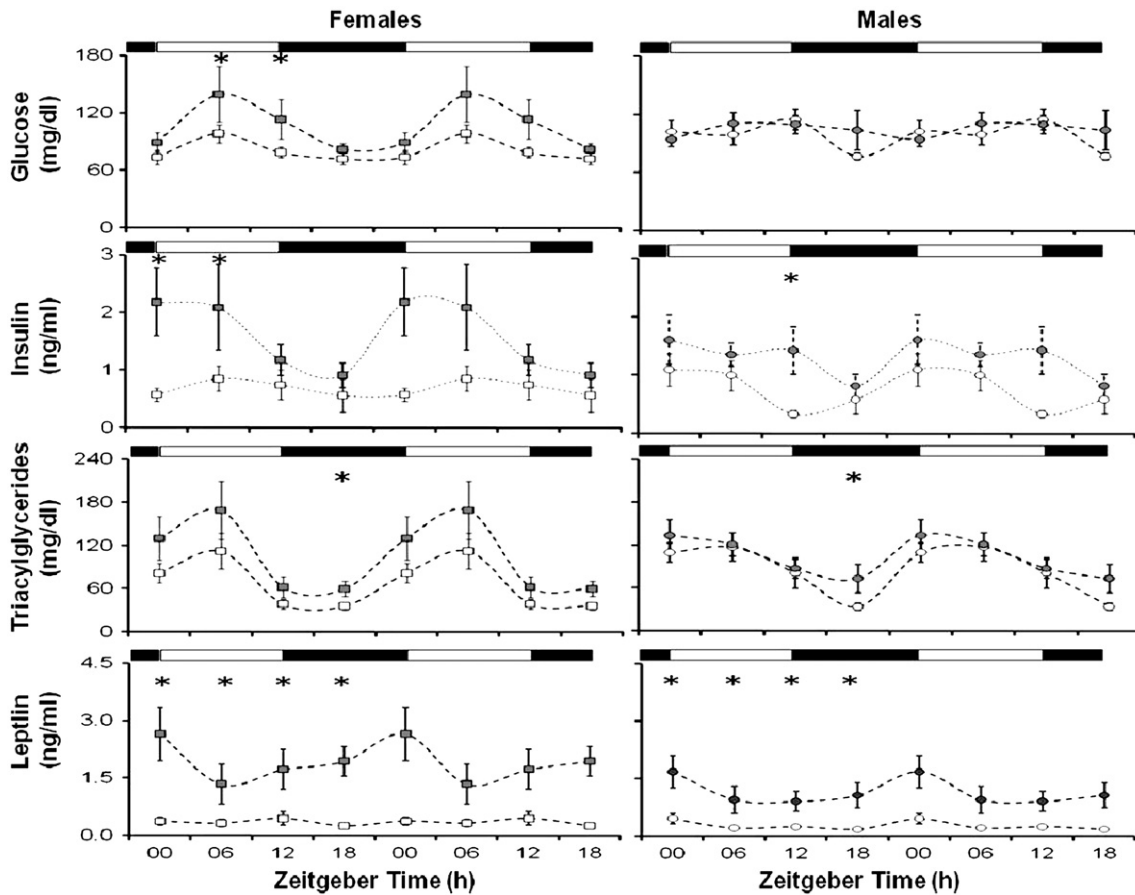


Fig. 4. Daily profiles of obesity-related metabolites in *N. alstoni*. Filled symbols are data from obese mice; empty symbols are from lean mice (average \pm SEM). LD regimen is indicated with horizontal white/black bars and asterisks denote significant differences between groups at a given time point (student's *T*-test, $p < 0.05$). Left graphs are data obtained from females and right from males.

in estrogen signaling [for review, see 25], in other rodent species has been shown that the presence of estrogen receptors in female's SCN is reduced, however its input or output pathways may be affected [45,46], therefore it is possible that a deficient signaling in estrogens may occur in ObF *Neotomodon*. It is unlikely that the observed reduction in activity is due to a masking effect in LD (Fig. 2), since the analysis of data in DD indicate similar reduction of the activity in subjective night (Fig. 3).

With the caveat that precise age is unknown in these wild mice, it was nevertheless possible to discern a difference in weight-gain tendency in mice kept in animal house facilities. During the first month after capture, all animals showed a rapid increase in BW, but by the fourth month some animals stabilized their BW while others kept increasing it (Fig. 1). Initially, females showed a more rapid increase in BW than males; however, by the 7th month the percent of animals classified as obese is 50–60% for each sex. This fact may be of interest because of the known relationship between sex and of the development of obesity [41,42,47,48]. Since obesity in *N. alstoni* is spontaneously developed by *ad libitum* provisions of food, this species may provide a good system for addressing the question of how sex differences in weight gain occur. The fact that some mice develop obesity while others do not, even though they all were exposed to the same conditions (space, food, etc.), indicates that the propensity for obesity in *N. alstoni* may be heritable, triggered by the *ad libitum* food access; however, further studies on population genetics are needed.

Some of the changes in circadian locomotor activity rhythm observed in the present work have also been observed in rodents with hypercaloric diets or genetically induced obesity [9,49–54]. We consistently found that MS plasma-related parameters in obese mice, affect females to a greater extent than males, as observed in Table 1. Also, we observed that the peak times for most of these parameters were different in lean mice, in addition to observed sex differences. The daily profile of plasma metabolites, as well as circadian locomotor rhythm properties (phase relationship relative to zeitgebers and reduced average activity) indicate a sex difference in the effects of obesity in this species.

Obesity may be affecting clock mechanisms [9,55–57]. In particular, the high concentrations of leptin associated with obesity may be related to observed changes in circadian and entrained locomotor activity rhythms. It is known that leptin exerts a feedback effect on the circadian pacemaker. The presence of leptin receptors in the SCN has been reported in the rat [58,59], and *in vitro* leptin induces phase advances in the firing rate in the SCN [60,61] as well as synthesis of key clock proteins PER1 and PER2 [53].

In lean mice, we observed daily variation in the basal concentrations of most metabolites studied, indicating a possible circadian regulation (Table 1, ANOVA differences indicated by an *). Glucose results are consistent with findings in other strains of mice [62] and might correlate with the hypothesis that during the day, nocturnal mice are resting and almost no feeding occurs; therefore, the homeostatic levels should ensure sufficient glucose and triacylglycerides to provide energy during rest. We tested glucose after 4 h of fasting to obtain basal serum concentrations; but it is likely that in non-fasted animals, glucose levels would be higher at the beginning of the dark phase, when mice start their locomotor activity and feeding.

Of particular interest is the fact that leptin increases five fold in obese females, while in obese males it increases only about two fold, even though BW was similar between groups; indicating another important sex difference in the obese condition in this rodent. Leptin regulates energy pathways [63] and a high level of leptin in the obese is suggestive of a state of leptin resistance. High level of insulin associated with leptin resistance is known in humans as “selective leptin resistance” [64,65], and aging could favor weight gain and changes in leptin levels [66,67]. Also, it is important to note that in obese animals, all the parameters tested, except triacylglycerides, were statistically arrhythmic (ANOVA); which may indicate that the

MS-related condition is accompanied by a circadian deregulation. The average values of main parameters in obese animals appear to be rhythmic, however because of the larger variability in data, no statistical differences were found between timing of samples tested, indicating that circadian rhythmicity could be disrupted in each individual. Alternatively, individuals could be desynchronized from each other, or some combination of these mechanisms.

Non-traditional models allow studies of variation in physiology, typical within natural populations [68], and may lead to the discovery of useful animal models of human disease, as in the case of the mouse *Peromyscus californicus*, which develops diabetes mellitus type 2 when fed commercial diets [69,70]. The results obtained in the present work lead us to conclude that the Mexican volcano mouse *N. alstoni* have naturally occurring variation in the development of obesity, in association with some of the parameters typically present in the MS in humans, such as hypertriglyceridemia, hyperinsulinemia and hyper leptinemia. Nevertheless it is important to get complementary evidence, such as blood pressure, and free fatty acid blood concentration, to make an analogy with the MS in humans.

Differences between obese and lean mice are clearer in female than in male *N. alstoni*; which is important considering that this model may be useful in addressing the relationship between obesity and sex [25,26]. In the present work, obesity in mice resulted from regular rodent chow and was not induced by any treatment. Most importantly of all, only some animals developed obesity, suggesting that genetic variation in the natural population may lead to differences in the propensity for developing obesity.

Acknowledgments

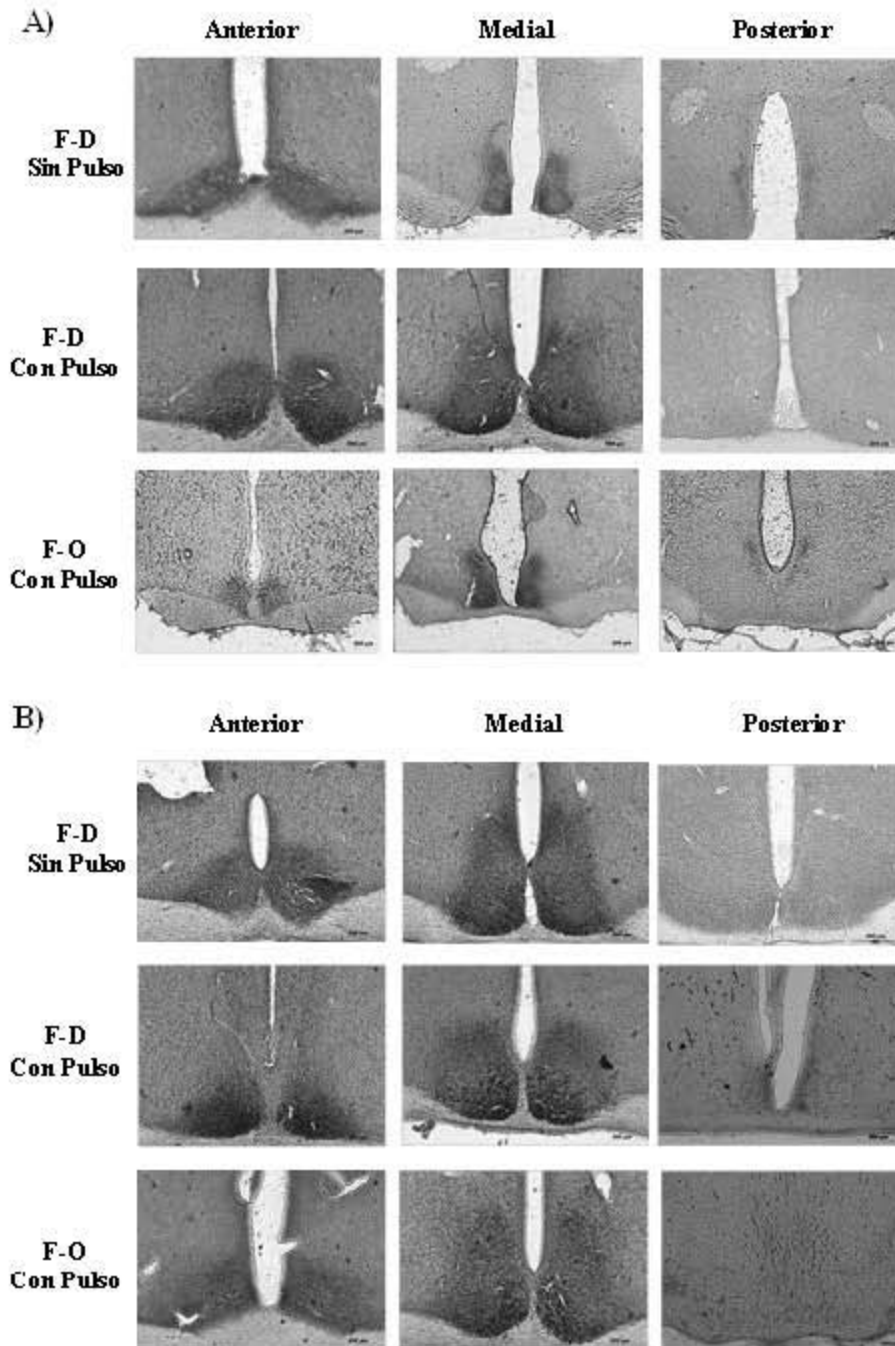
We would like to thank Dr. Mauricio Díaz for his useful comments to the manuscript. Also we thank Mario Soriano, D. Salazar and I. Antunez for animal care and animal house assistance; A. Moore and T. Bosques for language review and useful comments; F. Salinas and Ana I. Bieler for technical support. This work is a partial fulfillment of V. Carmona-Alcocer to obtain the Ph.D. program in Ciencias Biomédicas at the UNAM and was supported by PAPIIT, UNAM IN225311; VCA and CFG were also supported by CONACyT scholar fellowship Nos 194977 and 220274–23056 respectively.

References

- [1] Ziotopoulou M, Mantzoros CS, Hileman SM, Flier JS. Differential expression of hypothalamic neuropeptides in the early phase of diet-induced obesity in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000;279:E838–45.
- [2] Ginsberg HN, MacCallum PR. The obesity, metabolic syndrome, and type 2 diabetes mellitus pandemic: part I. Increased cardiovascular disease risk and the importance of atherogenic dyslipidemia in persons with the metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. *J Cardiometab Syndr* 2009;4(2):113–9.
- [3] Maury E, Ramsey KM, Bass J. Circadian rhythms and metabolic syndrome: from experimental genetics to human disease. *Circ Res* 2010;106(3):447–62.
- [4] Tschöp M, Heiman ML. 2001. Overview of rodent models for obesity research. *Curr. Protocols in Neuroscience. Preclinical models of neurologic and psychiatric disorder*. John Wiley ed. (suppl 17) 9.10.1–14.
- [5] Ghosh S, Golbidi S, Werner I, Verchere BC, Laher I. Selecting exercise regimens and strains to modify obesity and diabetes in rodents: an overview. *Clin Sci (Lond)* 2010;119(2):57–74.
- [6] Kennedy AJ, Ellacott KL, King VL, Hasty AH. Mouse models of the metabolic syndrome. *Dis Model Mech* 2010;3(3–4):156–66.
- [7] Waterhouse JM, DeCoursey PJ. Human circadian organization. In: Dunlap J, Loros J, DeCoursey P, editors. *Chronobiology, Biological Time Keeping*. Mass: Sinauer; 2004. p. 291–324.
- [8] Moore-Ede M, Sulzman FM, Fuller C. *The Clocks that Time Us. Physiology of the Circadian Timing System*. Cambridge, London: Harvard Univ. Press; 1982.
- [9] Turek WF, Joshu C, Koksaka A, Lin E, Ivanova G, McDearmon E, et al. Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science* 2005;308(5724):1043–5.
- [10] Shimba S, Ishii N, Ohta Y, Ohno T, Watabe Y, Hayashi M, et al. Brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1), a component of the molecular clock, regulates adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(34):12071–6.
- [11] Green CB, Takahashi J, Bas J. The meter of metabolism. *Cell* 2008;134:728–42.
- [12] Froy O. Metabolism and circadian rhythms—implications for obesity. *Endocr Rev* 2010;31(1):1–24.

- [13] Bass J, Takahashi JS. Circadian integration of metabolism and energetics. *Science* 2010;330(6009):1349–54.
- [14] Smale L, Heidemann P, French JA. Behavioral neuroendocrinology in nontraditional species of mammals: things the “knockout” mouse CAN’T tell us. *Horm Behav* 2005;48(4):474–83.
- [15] Fa JE, Sanchez-Cordero V, Mendez A. Interspecific agonistic behaviour in small mammals in a Mexican high-elevation grassland. *J Zool* 1996;239(2):396–401.
- [16] Granados H, Luis J, Carmona A, Espinosa G, Arenas T. Agonistic behavior of male *Neotomodon alstoni* (Rodentia: Cricetidae). *Rev Biol Trop* 1996;44(2B):861–5.
- [17] Martinez-Merlos T, Canedo-Merino R, Diaz-Munoz M. 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* 1997;29(3):529–39.
- [18] Ayala-Guerrero F, Vargas-Reyna L, Ramos JI, Mexicano G. Sleep patterns of the volcano mouse (*Neotomodon alstoni alstoni*). *Physiol Behav* 1998;64(4):577–80.
- [19] Villalpando I, Villafan-Monroy H, Aguayo D, Zepeda-Rodriguez A, Granados-Espitia H, Chavez-Olivares A. Ultrastructure and motility of the caudal epididymis spermatozoa from the volcano mouse (*Neotomodon alstoni alstoni* Merriam, 1898). *J Exp Zool* 2000;287(4):316–26.
- [20] Villalpando I, Ramirez M, Zepeda-Rodriguez A, Carmona-Castro A, Cardenas-Vazquez R, Vilchis F. The Harderian gland of the Mexican volcano mouse *Neotomodon alstoni alstoni* (Merriam 1898): a morphological and biochemical approach. *J Exp Zool* 2005;303A(1):13–25.
- [21] Luis J, Carmona A, Delgado J, Cervantes FA, Cardenas R. Parental behavior of the volcano mouse, *Neotomodon alstoni* (Rodentia: Muridae), in captivity. *J Mammal* 2000;81(2):600–5.
- [22] Luis J, Cervantes FA, Martinez M, Cardenas R, Delgado J, Carmona A. Male influence on maternal behavior and offspring of captive volcano mice (*Neotomodon alstoni*) from Mexico. *J Mammal* 2004;85(2):268–72.
- [23] Fuentes-Granados C, Miranda-Anaya M, Samario-Román J, Moreno-Sáenz E, Carmona-Castro A, Cárdenas-Vázquez RJ. Circadian locomotor activity and response to different light conditions in the volcano mouse, *Neotomodon alstoni* (Merriam, 1898). *Biol Rhythm Res* 2010;41(4):269–78.
- [24] Iwahana E, Karatsoreos I, Shibata S, Silver R. Gonadectomy reveals sex differences in circadian rhythms and suprachiasmatic nucleus androgen receptors in mice. *Horm Behav* 2008 Mar;53(3):422–30.
- [25] Mauvais-Jarvis F. Estrogen and androgen receptors: regulators of fuel homeostasis and emerging targets for diabetes and obesity. *Trends Endocrinol Metab* Jan 2011;22(1):24–33.
- [26] Woods SC, Gotoh K, Clegg DJ. Sex differences in the control of energy homeostasis. *Exp Biol Med* 2003;228:1175–80.
- [27] Nowak RM. Walker’s Mammals of the World, 6th ed., Vol. II. Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press; 1999.
- [28] Ceballos G, Oliva G. Los mamíferos silvestres de México. Distrito Federal, México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO)-Fondo de Cultura Económica; 2005.
- [29] Rogers P, Webb GP. Estimation of body fat in normal and obese mice. *Br J Nutr* 1980 Jan;43(1):83–6.
- [30] Ernsberger P, Koletsky RJ, Friedman JE. Molecular pathology in the obese spontaneous hypertensive Koletsky rat: a model of syndrome X. *Ann N Y Acad Sci* 1999;892:272–88.
- [31] National Research Council. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8 ed. Washington, D.C.: The National Academies Press; 2010.
- [32] NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, 75. Diario Oficial de la Federación; 2001. p. 113–60.
- [33] Possidente B, McEldowney S, Pabon A. Aging lengthens circadian period for wheel-running activity in C57BL mice. *Physiol Behav* 1995;57(3):575–9.
- [34] Scarbrough K, Losee-Olson S, Wallen EP, Turek FW. Aging and photoperiod affect entrainment and quantitative aspects of locomotor behaviour in Syrian hamsters. *Am J Physiol* 1997;272(4Pt 2):R1219–25.
- [35] Kolker DE, Vitaterna MH, Fruechet EF, Takahashi JS, Turek FW. Effects of age on circadian rhythms are similar in wild-type and heterozygous Clock mutant mice. *Neurobiol Aging* 2004;25:517–23.
- [36] Benloucif S, Masana MI, Dubocovich ML. Responsiveness to melatonin and its receptor expression in the aging circadian clock of mice. *Am J Physiol* 1997;273(6Pt2):R1855–60.
- [37] Valentinuzzi VS, Scarbrough K, Takahashi JS, Turek FW. Effects of aging on the circadian rhythm of wheel-running activity in C57BL/6 mice. *Am J Physiol* 1997;273(6Pt2):R1957–64.
- [38] Sutin EL, Dement WC, Heller HC, Kilduff TS. Light-induced gene expression in the suprachiasmatic nucleus of young and aging rats. *Neurobiol Aging* 1993;14(5):441–6.
- [39] Gorman MR, Lee TM. Hormones and biological rhythms. In: Becker B, Breedlove M, Crews D, McCarthy M, editors. Behavioral Endocrinology. Cambridge, London: The MIT Press; 2002. p. 451–89.
- [40] Davis FC, Darrow JM, Menaker M. Sex differences in the circadian control of hamster wheel-running activity. *Am J Physiol* 1983;244:R93–105.
- [41] Zucker I, Fitzgerald KM, Morin LP. Sex differentiation of the circadian system in the golden hamster. *Am J Physiol* 1980;238:R97–101.
- [42] Albers HE. Gonadal hormones organize and modulate the circadian system of the rat. *Am J Physiol* 1981;241:R62–6.
- [43] Daan S, Damassa D, Pittendrigh CS, Smith ER. An effect of castration and testosterone replacement on a circadian pacemaker in mice (*Mus musculus*). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975;72:3744–7.
- [44] Daan S, Pittendrigh CS. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. II. The variability of response curves. *J Comp Physiol* 1976;106:253–66.
- [45] De la Iglesia HO, Blaustein JD, Bittman EL. The suprachiasmatic area in the female hamster projects to neurons containing estrogen receptors and GnRH. *Neuroreport* 1995;6(13):1715–22.
- [46] De La Iglesia HO, Blaustein JD, Bittman EL. Oestrogen receptor/alpha-immunoreactive neurones project to the suprachiasmatic nucleus of the female Syrian hamster. *J Neuroendocrinol* 1999;11(7):481–90.
- [47] Saad MF, Riad-Gabriel MG, Khan A, Sharma A, Ragui M, Sujata D, et al. Diurnal and ultradian rhythmicity of plasma leptin: effects of sex and adiposity. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;32(2):453–9.
- [48] Strain GW, Zurnoff B, Miller LK, Rosner W. Sex difference in the effect of obesity on 24-hour mean serum gonadotropin levels. *Horm Metab Res* 2003;35:362–6.
- [49] Murakami DM, Horwitz BA, Fuller CA. Circadian rhythms of temperature and activity in obese and lean Zucker rats. *Am J Physiol* 1995;269(5Pt2):R1038–43.
- [50] Mistlberger RE, Lukman H, Nadeau BG. Circadian rhythms in the Zucker obese rat: assessment and intervention. *Appetite* 1998;30:255–67.
- [51] Sans-Fuentes MA, Díez-Noguera A, Cambras T. Light responses of the circadian system in leptin deficient mice. *Physiol Behav* 2010;99:487–94.
- [52] Mendoza J, Pevet P, Challet E. High-fat feeding alters the clock synchronization to light. *J Physiol* 2008;586(24):5901–10.
- [53] Mendoza J, Lopez-Lopez C, Revel FG, Jeanneau K, Delerue F, Prinszen E, et al. Dimorphic effects of leptin on the circadian and hypocretinergic systems of mice. *J Neuroendocrinol* 2011;23(1):28–38.
- [54] Kohsaka A, Laposky AD, Ramsey KM, Estrada C, Joshu C, Kobayashi Y, et al. High-fat diet disrupts behavioral and molecular circadian rhythms in mice. *Cell Metab* 2007;6:414–21.
- [55] Vitaterna MH, King DP, Chang AM, Kornhauser JM, Lowrey PL, McDonald JD, et al. Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian behavior. *Science* 1994;264(5159):719–25.
- [56] Cermakian N, Monaco L, Pando MP, Dierich A, Sassone-Corsi P. Altered behavioral rhythms and Clock gene expression in mice with a targeted mutation in the period1 gene. *EMBO J* 2001;20(15):3967–74.
- [57] Spoelstra K, Albrecht U, van der Horst GTJ, Brauer V, Daan S. Phase responses to light pulses in mice lacking functional per or cry genes. *J Biol Rhythms* 2004;19:518–29.
- [58] Guan XM, Hess JF, Yu H, Hey PJ, van der Ploeg LH. Differential expression of mRNA for leptin receptor isoforms in the rat brain. *Mol Cell Endocrinol* 1997;133:1–7.
- [59] Elmquist JK, Ahima RS, Elias CF, Flier JS, Saper CB. Leptin activates distinct projections from the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:741–6.
- [60] Inyushkin AN, Bhumbra GS, Dyball RE. Leptin modulates spike coding in the rat suprachiasmatic nucleus. *J Neuroendocrinol* 2009;21:705–14.
- [61] Prosser RA, Bergeron HE. Leptin phase-advances the rat suprachiasmatic circadian clock in vitro. *Neurosci Lett* 2003;336:139–42.
- [62] Yokoe T, Alonso LC, Romano LC, Rosa TC, O’Doherty RM, Garcia-Ocana A, et al. Intermittent hypoxia reverses the diurnal glucose rhythm and causes pancreatic beta-cell replication in mice. *J Physiol* 2008;586(3):899–911.
- [63] Anubhuti AS. Leptin and its metabolic interactions: an update. *Diabetes Obes Metab* 2008;10(11):973–93.
- [64] Goncalves AC, Tank J, Diedrich A, Plehm R, Bader M, et al. Diabetic hypertensive leptin receptor-deficient db/db mice develop cardioregulatory autonomic dysfunction. *Hypertension* 2009;53(2):387–92.
- [65] Prolo P, Ma-Li W, Licinio J. Leptin. Molecules in focus. *Int J Biochem Cell Biol* 1998;30:1285–90.
- [66] Connelly DM, Taberner PV. Characterization of the spontaneous diabetes obesity syndrome in mature male CBA/Ca mice. *Pharmacol Biochem Behav* 1989;34(2):255–9.
- [67] Åhrén B, Mansson S, Gingerich RL, Havel PJ. Regulation of plasma leptin in mice: influence of age, high-fat diet, and fasting. *Am J Physiol* 1997;273(1Pt2):R113–20.
- [68] Heidemann PD. 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* 2004;45(1):4–13.
- [69] Krugner-Higby L, Shadoan M, Carlson C, Gendron A, Cofta P, Marler C, et al. Type 2 diabetes mellitus, hyperlipidemia, and extremity lesions in California mice (*Peromyscus californicus*). *Comp Med* 2000;50(4):412–8.
- [70] Krugner-Higby L, Shelness GS, Holler A. Heritable, diet-induced hyperlipidemia in California mice (*Peromyscus californicus*) is due to increased hepatic secretion of very low density lipoprotein triacylglycerol. *Comp Med* 2006;56(6):468–75.

ANEXO 2: MICROFOTOGRAFÍAS DE VIP

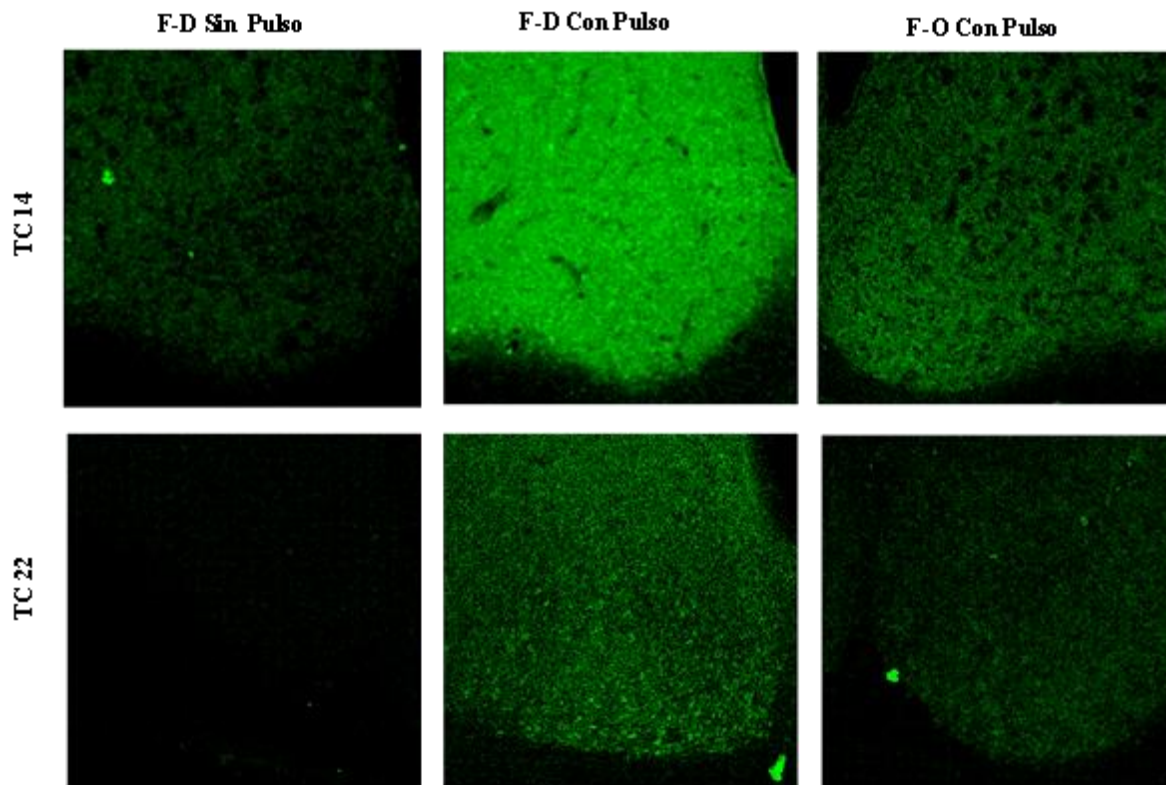


Anexo 1.- Expresión de VIP (péptido intestinal vasoactivo) en el núcleo supraquiasmático de ratones... (definir los grupos) en TC 14 (A) y TC 22 (B). El Protocolo de inmunohistoquímica es descrito en Capítulo 4.

ANEXO 3: MICROFOTOGRAFÍAS DE VIPR2

En el caso de la visualización en la expresión del receptor VIPR2, los cerebros fueron incubados con el anticuerpo VIPR2 (48 hr; 1:250; Santa Cruz Biotechnology) en PBSGT (1% suero de cabra, 0.1% tritón en PBS. Posteriormente se colocó en el anticuerpo secundario (2 h; 1:1000 en PBS).. Después de cada incubación se hicieron 3 lavados de 10 min en PBS.

Los cortes fueron montados en portaobjetos tratados con poly-D-lisina (SIGMA), con una solución de montaje (CC-mount; SIGMA) y dejando secar toda la noche. .Las imágenes del NSQ se obtuvieron con microscopía confocal en el Instituto de Neurobiología de la UNAM.



Anexo 1.- Expresión de VIPR2 (péptido intestinal vasoactivo) en el núcleo supraquiasmático de ratón de los volcanes...en TC 14 y TC 22.