



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**DIFERENCIAS EN LA ACTIVIDAD LOCOMOTRIZ
ANTICIPATORIA DURANTE UN PROTOCOLO DE
RESTRICCIÓN DE ALIMENTO ENTRE HEMBRAS
DELGADAS Y OBESAS DE *Neotomodon alstoni*.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

César Enrique Luna Illades



**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Manuel Miranda Anaya**

MÉXICO, D.F. 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**A mis padres Perla y Román, mi hermano Claudio,
mi hermosa Dio y mi hijo Ronnie.**

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno

Luna
Illades
César Enrique
(01 55) 55495511
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
300344275

2. Datos del tutor

Doctor
Manuel
Miranda
Anaya

3. Datos del sinodal 1

Doctora
Carolina
Escobar
Briones

4. Datos del sinodal 2

Doctora
Elsa Guadalupe
Escamilla
Chimal

5. Datos del sinodal 3

Maestro en Ciencias
Agustín
Carmona
Castro

6. Datos del sinodal 4

Doctor
Mauricio
Díaz
Muñoz

7. Datos del trabajo escrito

Diferencias en la actividad locomotriz anticipatoria durante un protocolo de restricción de alimento entre hembras delgadas y obesas de *Neotomodon alstoni*.
44 pp.
2013

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a los profesores de la Facultad de Ciencias.

A Manuel por dirigir y hacer posible este proyecto, así como a los miembros del jurado por sus valiosas observaciones y consejos.

A mi mentora en fisiología animal, Vania Carmona.

Al personal del Bioterio de la Facultad de Ciencias.

Al Laboratorio de Biología Animal Experimental, Departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias y al proyecto PAPIIT DGAPA IN-225311 por la beca otorgada durante la realización de este proyecto.

RESUMEN

La sobrealimentación y los subsecuentes problemas metabólicos y de obesidad que origina, representan uno de los mayores problemas de salud humana a nivel mundial. Estudiar las causas y consecuencias fisiológicas de esta condición es de gran importancia. Actualmente se acepta que la coordinación entre los patrones diarios de alimentación y el metabolismo, es fundamental para una adecuada regulación energética. Cuando hay acceso al alimento únicamente en la fase diaria de reposo, ocurren cambios fisiológicos controlados por un oscilador circadiano sincronizado por alimento (OSA), que es distinto al núcleo supraquiasmático (NSQ) que es considerado el marcapasos central. La restricción de acceso al alimento se caracteriza por que induce de manera gradual la expresión de un nuevo componente en la actividad diaria dos horas antes de la llegada del alimento, conocida como actividad anticipatoria al alimento (AAA). En este estudio se compara la respuesta de AAA entre ratones hembras delgados y obesos de la especie endémica de México *Neotomodon alstoni*, con el fin de conocer si la obesidad implica una deficiencia para responder a la expresión del OSA en esta especie. Para ello se estudió la actividad locomotriz de manera individual en animales delgados y obesos, durante varios días en condiciones de acceso al alimento y fotoperiodo controlado. Los resultados muestran en el grupo de ratones obesos una disminución en la magnitud de la expresión, duración y fase de la AAA. Por lo anterior se concluye que las alteraciones fisiológicas debidas a la condición de obesidad, generan diferencias tanto en la expresión de AAA como en la distribución de la actividad locomotriz durante el protocolo de alimentación restringida.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Ritmo Biológico	1
1.1.1 Clasificación ritmos biológicos	1
1.1.2 Ritmos circadianos y sus propiedades	2
1.2 Reloj Biológico y Sistema Circadiano	2
1.2.1 Núcleo supraquiasmático (NSQ)	3
1.2.2 Mecanismo molecular para la generación de ritmos	3
1.3 Oscilador Sincronizado por el Alimento (OSA)	4
1.3.1 Antecedentes y sincronización al alimento	4
1.3.2 Actividad anticipatoria al alimento	4
1.3.3 Restricción de alimento y OSA	5
1.3.4 Independencia entre el NSQ y OSA	6
1.3.5 Similitudes y diferencias en la maquinaria molecular del NSQ y OSA	6
1.3.6 Expresión de genes reloj en osciladores periféricos	7
1.3.7 Ubicación anatómica del OSA	7
1.4 Obesidad, Síndrome Metabólico y Alteraciones del Sistema Circadiano	8
1.4.1 Obesidad y sus consecuencias	8
1.4.2 Índice de masa corporal	8
1.4.3 Índice de Lee	9
1.5 El ratón de los volcanes <i>Neotomodon alstoni</i>	9
1.5.1 Características generales <i>N. alstoni</i>	9
1.5.2 <i>N. alstoni</i> como modelo de obesidad	10
1.5.3 Efectos de la obesidad en hembras de <i>N. alstoni</i>	10
1.6 Obesidad y OSA	11
1.6.1 Obesidad inducida genéticamente en ratas	11
1.6.2 Obesidad inducida mediante dieta hipercalórica en ratas	11
1.7 Obesidad y ritmos circadianos en <i>N. alstoni</i>	12
1.7.1 Alteraciones en el ritmo de actividad	12
1.7.2 Alteraciones en parámetros sanguíneos	12
1.7.3 Resistencia a leptina	12
2. JUSTIFICACIÓN	13
3. HIPÓTESIS	14
4. OBJETIVOS	14
4.1 Objetivo general	14
4.2 Objetivos particulares	14

5. MÉTODO Y MATERIALES	15
5.1 Obtención de animales y mantenimiento	15
5.2 Sistema de registro y adquisición de datos	16
5.3 Protocolo Experimental	17
5.3.1 Introducción a la restricción de alimento	17
5.3.2 Restricción de alimento (RA)	17
5.3.3 Ayuno en libre curso	17
5.3.4 Alimentación <i>ad libitum</i> en libre curso	18
5.4 Análisis de datos	18
6. RESULTADOS	19
6.1 Actogramas	19
6.1.1 Ratones delgados	19
6.1.2 Ratones obesos	21
6.2 Curvas promedio	23
6.2.1 Días utilizados para generar curvas promedio de actividad	23
6.2.2 Curva promedio en condiciones de alimentación <i>ad libitum</i>	24
6.2.3 Curva promedio en condiciones de RA	25
6.2.4 Curva promedio en libre curso y ayuno	26
6.3 Gráficas de barra	28
6.4 Tabla valores promedio de actividad	30
6.5 Consumo promedio de alimento	31
6.6 Variación del peso corporal	32
7. DISCUSIÓN	33
8. CONCLUSIONES	39
REFERENCIAS	40

1. INTRODUCCIÓN

Desde que se inició la vida, los diferentes organismos que habitan la Tierra han estado expuestos a fenómenos ambientales cíclicos y persistentes. Estos fenómenos tan diversos se presentan en forma de la sucesión del día y la noche, las cuatro estaciones del año, las mareas, etc. Los organismos están adaptados para obtener el mayor beneficio y el menor daño por la ritmicidad intrínseca en el ambiente, lo que les permite anticipar los cambios en el mismo y responder de una manera adecuada.

1.1 Ritmo biológico

Se denominan ritmos biológicos, a los cambios de una variable (bioquímica, fisiológica, conductual) en un sistema biológico que se repiten en un patrón similar y en un intervalo constante de tiempo (Willard y Koukkari 2006).

1.1.1 Clasificación ritmos biológicos

Los ritmos biológicos se pueden clasificar de acuerdo a su frecuencia en relación a un día o al tiempo que transcurre para completar un ciclo. Cuando son clasificados con base en el ciclo geofísico con el que se presentan, reciben el prefijo latino circa (cercano a) y después el sufijo correspondiente al ciclo geofísico, tal como día (circadiano), año (circanual), marea (circamareal) etc. Si el periodo de un ritmo biológico observado en condiciones constantes, se encuentra en el rango de veinte a veintiocho horas, se considera circadiano, como es el caso de la variación en la temperatura corporal o el ciclo de sueño-vigilia en el ser humano. Si el periodo del ritmo es menor a veinte horas se considera ultradiano, como la frecuencia cardiaca. Cuando el periodo es mayor a veintiocho horas se denomina infradiano, como la floración estacional de muchas plantas y la reproducción en diversos animales.

1.1.2 Ritmos circadianos y sus propiedades

De los ritmos biológicos, los ritmos circadianos son los mejor conocidos en cuanto a sus propiedades y mecanismos y ellos suelen ser la base para poder explicar otro tipo de ritmos biológicos. Los ritmos circadianos presentan ciertas características generales: son endógenos y ubicuos en prácticamente todos los seres vivos, a manera de oscilaciones auto-sostenidas e innatas que pueden ocurrir a un nivel de organización celular o del organismo completo.

Los ritmos circadianos persisten en condiciones ambientales constantes, con un periodo cercano al previamente impuesto por un ciclo geofísico sincronizador, a esto se le conoce como "libre curso" u "oscilación espontánea". El periodo de un ritmo tras varios ciclos en libre curso tiene poca variación, esto muestra la presencia de un sistema subyacente preciso. A su vez el periodo en libre curso no es una característica fija de cada organismo, pues está sujeto a cambios espontáneos o inducidos dentro de un rango de valores. Los ritmos circadianos pueden compensar los cambios de temperatura ambiental, esto permite conservar con poca variación la precisión del periodo. El ritmo en libre curso se sincroniza a ciclos ambientales conocidos como sincronizadores o "zeitgebers" (del alemán "dador de tiempo") con periodos cercanos al del ritmo endógeno. Se considera como el principal sincronizador o *zeitgeber* al ciclo de luz y oscuridad, pero otras señales cíclicas como el horario de alimentación o la interacción social pueden tener el mismo efecto como sincronizador. Después de la sincronización, el ritmo en libre curso puede presentar una "memoria" de la sincronización o post-efectos y además ciclos transitorios siempre preceden a un nuevo estado estable del ritmo (Pittendrigh, 1960).

1.2 Reloj biológico y sistema circadiano

Para que un organismo sea capaz de generar una ritmicidad endógena debe poseer mecanismos con propiedades semejantes a las de un reloj, es decir, los ritmos circadianos son gobernados por un sistema oscilador interno, el cual es

capaz de ajustarse con las señales ambientales (Shibata *et al.*, 2010). El ciclo de luz-oscuridad es considerado como el principal sincronizador circadiano (Challet y Mendoza, 2010). El sistema circadiano es comúnmente representado por tres componentes distintos: un oscilador o reloj auto sostenido, una vía de sincronización aferente o vía de entrada y una vía de salida o eferente del ritmo manifiesto (Hall, 1995).

1.2.1 Núcleo supraquiasmático

En los mamíferos, el sistema interno capaz de generar las oscilaciones diarias es una estructura localizada en la base del hipotálamo anterior en el cerebro, llamada Núcleo supraquiasmático (NSQ). El NSQ es una estructura bilateral que comprende aproximadamente 20,000 neuronas que funcionan como marcapasos circadianos (Morin *et al.*, 2006). Se ha demostrado que casi cualquier célula es capaz de oscilar independientemente con un periodo propio, sin embargo las células del NSQ están acopladas y generan señales circadianas coordinadas entre si (Froy, 2010).

El sistema circadiano consiste también en una acción coordinada entre el NSQ y un conjunto de osciladores subordinados en órganos periféricos. Dicha coordinación puede ser trastornada cuando la actividad, los ciclos sueño-vigilia o de alimentación son alterados (Hastings *et al.*, 2003).

1.2.2 Mecanismo molecular para la generación de ritmos

La generación de ritmos circadianos obedece a un mecanismo molecular que está presente en todas las células, pero es más evidente en aquellas que tienen propiedad de oscilador. El ritmo circadiano se establece por la actividad intrínseca de transcripción/traducción de un grupo de genes, incluyendo la regulación post-transcripcional, mediante la cual se logra una expresión rítmica con un periodo aproximado a 24 horas (Ramsey *et al.*, 2007). En mamíferos se han descrito varios genes reloj, como *Clock*, *Bmal1*, y las familias *Per*, *Cry*.

La expresión de estos genes se regula mediante dos asas de activación/represión transcripcional. El asa de señales positivas está controlada por los genes *Clock* y *Bmal1*, cuyas proteínas dimerizadas CLOCK-BMAL1 favorecen la transcripción de *Per* y *Cry*; mientras que el asa negativa es efectuada por los genes *Per* y *Cry*, cuyas proteínas dimerizadas PER-CRY, inhiben la actividad de CLOCK-BMAL1. El ciclo completo de estas asas tiene una duración cercana a 24 horas y ha sido posible dilucidar algunos mecanismos en que son afectadas por influencias externas e internas de la célula (Dunlap *et al.*, 2004; Ralph, 2001).

1.3 Oscilador sincronizado por el alimento (OSA)

1.3.1 Antecedentes y sincronización al alimento

La energía que proviene del alimento es indispensable para todas las reacciones metabólicas que mantienen vivo a un organismo. Es por esto que los animales han desarrollado estrategias para optimizar la adquisición e ingesta del alimento. Dentro de estas estrategias se encuentra la capacidad de sincronización del ritmo de actividad a la presencia cíclica del alimento, mediante la cual los organismos se encuentran preparados para aprovechar al máximo el recurso mientras está disponible. La presencia cíclica del alimento puede ser un sincronizador tan fuerte como el del ciclo de luz y oscuridad. De manera natural ambos se encuentran coordinados; es decir que un animal suele alimentarse en la etapa de mayor actividad, que en especies diurnas coincide con la fase luminosa del día y en los roedores de hábitos nocturnos esto sucede por la noche.

1.3.2 Actividad anticipatoria al alimento

Cuando el alimento se encuentra únicamente en la fase de reposo del animal (fase de luz o día en animales nocturnos), se presentan una serie de

modificaciones conductuales y metabólicas que hacen suponer la emergencia de un oscilador independiente al NSQ. Este fenómeno fue descrito por primera vez en ratas en el año de 1922 (Richter, 1922). Se observó que las ratas en el laboratorio, a las que se les daba alimento una sola vez al día, presentaban un aumento notable en la actividad locomotriz, previo a la presencia del alimento. Esta anticipación se denomina Actividad Anticipatoria al Alimento (AAA) y consiste en un aumento de la actividad locomotriz y de la temperatura corporal del animal, previo a la presentación del alimento.

Esta conducta ha sido confirmada en diversas especies que han sido sometidas a un régimen de alimentación restringida y programada principalmente en la fase de reposo del animal, en donde es más fácil poder distinguirla del patrón diario de actividad del mismo (Stephan, 2001). Se ha sugerido que este fenómeno facilita el inicio del forrajeo y optimiza el aprovechamiento de nutrientes cuando hay acceso restringido al alimento (Stephan, 2002). La AAA se puede presentar desde una a tres horas antes de la presencia del alimento, que está disponible únicamente durante dos horas diarias (Mistlberger, 2011).

1.3.3 Restricción de alimento y OSA

El estudio de la AAA en mamíferos puso de manifiesto la existencia de un Oscilador Sincronizado por el Alimento (OSA), capaz de coordinar parámetros fisiológicos y del comportamiento con el horario diario de alimentación (Stephan, 2002); mediante distintos protocolos de restricción de alimento (RA) se ha obtenido evidencia sólida de que se trata de un oscilador circadiano independiente al NSQ. En animales sometidos durante varios días a RA, se puede observar un componente en la actividad diaria asociado al ciclo luz-oscuridad y un segundo componente de actividad asociado al inicio del periodo en el que estará disponible el alimento, que es la AAA.

En estas condiciones, el alimento parece adoptar la función de principal sincronizador de los osciladores periféricos y modifica algunos ritmos circadianos,

como son el de actividad y temperatura (Ramsey *et al.*, 2007). Cuando se restituye la alimentación *ad libitum*, el ritmo de actividad locomotriz recupera la sincronización respecto al ciclo de luz y oscuridad; sin embargo, cuando se impone nuevamente un ayuno la AAA reaparece (Mistlberger, 2011). Lo anterior sugiere la expresión de dos osciladores desacoplados (Hastings *et al.*, 2003), ya que durante la RA los ritmos circadianos que corresponden a osciladores periféricos son invertidos respecto al ciclo de luz-oscuridad, mientras que el NSQ parece no sufrir cambio alguno (Ramsey *et al.*, 2007).

1.3.4 Independencia entre el NSQ y OSA

Existen evidencias que muestran la independencia del OSA del NSQ, la principal es que los animales con una lesión bilateral del NSQ y que permanecen en condiciones de alimentación *ad libitum*, muestran arritmia en el patrón diario de actividad, aunque mantienen la capacidad de expresar AAA (Carneiro y Araujo 2009). Además esta sincronización al alimento se mantiene en condiciones constantes de iluminación y persiste hasta por tres ciclos de ayuno, lo que representarían la expresión en libre curso del OSA por medio de la AAA (Stephan, 2002).

1.3.5 Similitudes y diferencias en la maquinaria molecular del NSQ y OSA

El OSA no opera de la misma manera que los osciladores presentes en el NSQ, y se ha demostrado que algunos genes básicos para generar oscilaciones rítmicas en el NSQ como el gen *Bmal1*, no es necesario para la sincronización por alimento y la expresión de AAA (Pendergast *et al.*, 2009); sin embargo los ratones mutantes para el gen *Per2*, pierden la capacidad de anticipar la disponibilidad de alimento en ciclos de 24 horas aunque sólo de manera parcial (Feillet *et al.*, 2006) y esta misma mutación provoca arritmia en el patrón de actividad locomotriz de ratones en oscuridad constante (Steinlechner *et al.*, 2002). Lo anterior demuestra que los

dos osciladores (NSQ y OSA), comparten ciertos elementos de la maquinaria molecular para la generación de ritmos, aunque estos elementos no tienen la misma función en las diferentes vías de sincronización, ya sea por los ritmos diarios de luz-oscuridad o la disponibilidad de alimento.

1.3.6 Expresión de genes reloj en osciladores periféricos

Se ha comprobado en ratas que son mantenidas en un fotoperiodo 12:12 LO con alimentación restringida a la fotofase, que la expresión de genes reloj en el hígado es independiente a la del NSQ, lo que indica que en estas condiciones la expresión de genes reloj en el hígado se rige por el horario de alimentación y no por el NSQ (Yamazaki *et al.*, 2000). De manera opuesta a lo que ocurre en condiciones de alimentación *ad libitum* con la expresión cíclica de los genes reloj en el hígado. Esto confirma la presencia de osciladores periféricos que responden al alimento como un sincronizador, de manera independiente de la sincronización al fotoperiodo dada por el NSQ.

1.3.7 Ubicación anatómica del OSA

En la actualidad se desconoce si el OSA reside en una ubicación discreta, a pesar de los numerosos estudios realizados mediante lesiones en núcleos encefálicos orientados a eliminar la AAA en ratas (Comperatore y Stephan, 1990). Sólo se ha podido abolir, pero de manera temporal, la AAA provocando lesiones eléctricas o químicas sobre los núcleos parabraquiales de la formación reticular en mamíferos, lo que se traduce en una interrupción del relevo de la información sensorial entre sistema digestivo y cerebro (Davidson *et al.*, 2000). Esta incapacidad para definir una localización cerebral para el OSA apunta a una organización periférica, en coordinación con estructuras centrales implicadas en la sincronización de la actividad de los animales a la llegada del alimento (Ramsey *et al.*, 2007).

Por lo anterior se puede decir que el ritmo diario de actividad locomotriz de un organismo no sólo está determinado por el ciclo luz-oscuridad, sino también por el tiempo en que está disponible y resulta más ventajoso obtener alimento. Esto puede ser consecuencia de la selección natural para evitar a posibles depredadores y/o aprovechar los momentos del día en los que el alimento es más abundante o de mejor calidad. Por lo anterior, la capacidad de los organismos para anticipar el horario de alimentación es un rasgo evolutivo importante para la supervivencia.

1.4 Obesidad, síndrome metabólico, alteraciones del sistema circadiano

1.4.1 Obesidad y sus consecuencias

La obesidad puede ser definida simplemente como un estado en el que se acumula exceso de grasa en el cuerpo. Esta condición afecta la salud y se caracteriza por un desequilibrio crónico entre la cantidad de energía consumida y la que es gastada (Carmona-Alcocer *et al.*, 2012). La obesidad es el factor principal de riesgo de defunción en el mundo; entre los padecimientos más comunes asociados a la obesidad se encuentran las enfermedades cardíacas (hipertensión, hemorragia cerebral), diabetes mellitus, hiperlipidemias, problemas óseos y predisposición a ciertos tipos de cáncer (OMS, 2011).

1.4.2 Índice de masa corporal

La cantidad de grasa, su distribución en el cuerpo y las consecuencias en la salud asociadas a ésta, pueden variar considerablemente entre individuos obesos. Para el ser humano el índice de masa corporal (IMC) es un indicador simple de la relación entre el peso y la talla que se utiliza frecuentemente para identificar el sobrepeso y la obesidad. Se calcula dividiendo el peso de una persona en kilos por el cuadrado de su talla en metros (kg/m^2).

$$IMC = \frac{\text{peso corporal (kg)}}{\text{estatura (m)}^2}$$

Los individuos que presentan un IMC menor o igual a 18 son considerados con bajo peso e individuos con un IMC mayor o igual a 30 se consideran obesos (OMS, 2011).

1.4.3 Índice de Lee

Para obtener una aproximación indirecta del estado nutricional en el caso de roedores, un análogo del IMC es el índice de Lee. Este se calcula aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de Lee} = \frac{\sqrt[3]{\text{peso corporal (g)}}}{\text{longitud naso anal (mm)}} \times 10^4$$

En donde ratones con un Índice de Lee igual o menor a 285 son considerados delgados y con un índice mayor a 310 son considerados obesos (Bernardis, 1982; Carmona-Alcocer *et al.*, 2012).

1.5 El ratón de los volcanes, *Neotomodon alstoni*

El ratón de los volcanes (*Neotomodon alstoni*), es un mamífero roedor endémico de la familia de los múridos que habita en las montañas del centro de México.

1.5.1 Características generales de *N. alstoni*

Estos roedores alcanzan una longitud corporal de 10 a 13 cm, la cola mide en promedio entre 8 y 11 cm. Su peso es entre 30 y 60 g. Tienen pelaje denso y suave, de color gris oscuro en las partes dorsales, con matices amarillentos en los flancos, y blanco en el vientre. Los individuos juveniles son de color gris uniforme. Las orejas son relativamente grandes y prácticamente sin pelo (Chávez, 2005).

El ratón *N. alstoni* habita en alturas entre los 2,400 y 4,960 msnm, en el Eje Neo volcánico transversal, desde el estado de Michoacán hasta Veracruz. No se considera una especie amenazada, pues existen poblaciones saludables en parques nacionales protegidos, como el Pico de Orizaba, La Malinche, el Izta-Popo, el Ajusco y el Nevado de Toluca. Puede habitar en pastizales de montaña, pero también en bosques de coníferas y mixtos; muestra hábitos nocturnos y se haya asociado a pastos, entre cuyas raíces construye sus madrigueras. Esta especie es capaz de reproducirse en cautiverio durante todo el año, aunque la cantidad de partos es mayor de abril a septiembre. Las hembras tienen un promedio de 4 crías por camada (Chávez, 2005).

1.5.2 *N. alstoni* como modelo de obesidad

En condiciones de cautiverio y con una dieta de laboratorio estándar para roedores, un porcentaje alto de la población desarrolla obesidad (aproximadamente el 50%) . Esto se puede deber a la reducción en la actividad locomotriz debida al confinamiento en jaulas y a una disponibilidad permanente de alimento, sin embargo también parece manifestar cierta susceptibilidad en parte de la población (Carmona-Alcocer *et al.*, 2012). Esta situación lo hace un buen modelo de estudio para obesidad, ya que en gran parte, la obesidad en la población humana se debe a estos dos factores principales: sedentarismo y sobrealimentación.

1.5.3 Efecto de la obesidad en hembras de *N. alstoni*

Las hembras delgadas de *N. alstoni* son más activas que los machos, sin embargo las hembras obesas reducen su actividad en comparación con hembras delgadas (Carmona-Alcocer *et al.*, 2012). El presente estudio se realizó con hembras, ya que éstas desarrollan obesidad con una incidencia y peso corporal mayor al presentado por los machos. Además presentan mayor contraste en ciertos parámetros endocrinos relacionados con alteraciones en el metabolismo como son niveles elevados en sangre de triacilglicéridos, insulina, leptina, además de

presentar intolerancia a la glucosa y desarrollar lipomas (Carmona-Alcocer *et al.*, 2012; Fuentes-Granados, 2011).

1.6 Obesidad y Oscilador Sincronizado por Alimento

1.6.1 Obesidad inducida genéticamente en ratas

En estudios previos se ha reportado que en ratas Zucker con obesidad inducida genéticamente por la mutación del gen que codifica para el receptor de leptina, presentan un aumento en la amplitud de la AAA respecto a su contraparte silvestre delgada (Mistlberger y Merchant, 1999). Al ser la leptina un indicador del estado energético y de la proporción de reservas grasas, se menciona la posibilidad de que la regulación en la expresión de la AAA durante condiciones de RA, se lleva a cabo por medio de la interacción de la leptina con núcleo arqueado del hipotálamo (ARC) y el neuropéptido Y (NPY). En las ratas silvestres obesas al presentarse leptina funcional y en altas concentraciones, se inhibe la expresión de la AAA.

De manera contraria en los obesos mutantes al receptor de la leptina, los niveles de NPY aumentan y los niveles elevados de leptina no tienen efecto, por eso la AAA se expresa de manera exacerbada (Mistlberger y Merchant, 1999).

1.6.2 Obesidad inducida mediante dieta hipercalórica en ratas

En un estudio realizado con ratas Sprague-Dawley, en las que se inducía obesidad mediante una dieta hipercalórica, la AAA en ratas obesas era menor respecto a la presentada por ratas delgadas (Persons *et al.*, 1993). La poca AAA registrada en este experimento sugiere que la expresión de la AAA está de alguna forma modulada o correlacionada con el peso corporal, el cual mantiene una relación negativa con respecto a la expresión de AAA. Se menciona por los

autores que las reservas energéticas en forma de grasa y su utilización podrían ser factores que median este efecto.

1.7 Obesidad y ritmos circadianos en *N. alstoni*

En estudios anteriores se han descrito varias de las alteraciones que presenta *N. alstoni* en el ritmo de actividad locomotriz y en algunos parámetros plasmáticos debido a la condición de obesidad (Carmona-Alcocer *et al.*, 2012; Fuentes-Granados *et al.*, 2012).

1.7.1 Alteraciones en el ritmo de actividad

La principal alteración en el ritmo diario de actividad en los ratones hembras obesos, es la reducción en la actividad promedio total respecto a la presentada por su contraparte ratones hembras delgados. Además los ratones obesos presentan una reducción en el periodo de descanso o inactividad durante condiciones de oscuridad constante (Carmona-Alcocer *et al.*, 2012).

1.7.2 Alteraciones en parámetros sanguíneos

En cuanto a las concentraciones plasmáticas de insulina, leptina y triacilglicéridos los ratones hembras obesos presentan niveles aumentados respecto a los delgados. En el caso de la concentración plasmática de cortisol, ésta es menor en el grupo de ratones obesos (Fuentes-Granados, 2011).

1.7.3 Resistencia a leptina

Debido a la alta concentración de leptina registrada en ratones obesos, se sugiere una posible resistencia a la misma, provocada por un defecto en el transporte hacia el sistema nervioso central por la barrera hematoencefálica, el cual puede

estar relacionado con la alta concentración de triacilglicéridos que presentan los ratones obesos (Carmona-Alcocer *et al.*, 2012; Fuentes-Granados *et al.*, 2012).

2. JUSTIFICACIÓN

La obesidad es una enfermedad que forma parte del síndrome metabólico y la cual se ha descrito como un problema de salud pública en naciones industrializadas a nivel mundial. Actualmente existe un incremento del 1.1% anual en las tasas de sobrepeso y obesidad en México. Una de las principales afecciones relacionada con la obesidad es la diabetes mellitus tipo II, la cual es la primer causa de muerte en México (Olaiz-Fernández *et al.*, 2006) Por otra parte, el estudio de las posibles alteraciones en el sistema circadiano, producto de la obesidad, son un tema reciente (Bass & Takahashi, 2010; Froy, 2010; Green *et al.*, 2008) y de suma importancia en materia de salud pública a nivel mundial.

El estudio de las causas y consecuencias que tiene la obesidad, se ha llevado a cabo en modelos animales en los que la obesidad se logra mediante modificaciones genéticas o mediante dietas hipercalóricas, generando en ocasiones resultados contradictorios. El estudio de la obesidad en modelos no tradicionales como *N. alstoni*, en el cual los animales obesos y delgados se logran de manera espontánea en condiciones estándar de bioterio, permitiría conocer si los resultados son consistentes con lo observado en otros modelos animales.

El modelo biológico propuesto en este trabajo puede ser útil para comprender el efecto de la obesidad en la capacidad de presentar AAA y establecer nuevas hipótesis respecto a los procesos fisiológicos que cambian durante la sincronización por alimento.

3. HIPÓTESIS

Si la AAA se manifiesta en función del estrés metabólico que provoca el ayuno ante un protocolo de RA; los ratones obesos mostrarán una disminución en AAA respecto al grupo de ratones delgados. Por lo tanto la expresión AAA guarda una relación proporcionalmente inversa respecto al peso corporal del animal.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- Establecer si existen diferencias en el perfil de actividad locomotriz y la amplitud de la AAA, entre ratones hembras delgados y obesos, sometidos a un protocolo de sincronización por alimento.

4.2 Objetivos particulares

Comparar entre ratones hembra delgados y obesos:

- Diferencias en el perfil de actividad locomotriz antes, durante y después de la presencia de alimento durante la sincronización al mismo.
- La expresión de actividad locomotriz durante el periodo de ayuno (60 h), en el que es posible observar la expresión del OSA en libre curso (oscuridad constante).
- El consumo de alimento durante las diferentes etapas del protocolo experimental.

5. MÉTODO Y MATERIALES

5.1 Obtención de animales y mantenimiento

Se utilizaron un total de 14 hembras adultas (9-12 meses) de *N. alstoni*, todos los animales nacieron en cautiverio en las instalaciones del vivario de la Facultad de Ciencias. De acuerdo al Índice de Lee, los animales se dividieron en dos grupos de 7 animales cada uno. El primer grupo (delgados) lo conformaron ratones que presentaron un índice de Lee menor o igual a 285, con un peso corporal promedio de $43.22 \pm 2.29\text{g}$. El segundo grupo (obesos) estaba conformado por ratones con un Índice de Lee mayor a 310, con un peso corporal promedio de $70.62 \pm 4.03\text{g}$.

Los animales fueron mantenidos en jaulas individuales de acrílico (32 x 23 x 15 cm), provistos con una cama de aserrín y agua *ad libitum* administrada mediante bebederos. Las jaulas fueron mantenidas en estantes aislados de madera, con una luminaria fluorescente (~ 250 luxes) y flujo continuo de aire por medio de ventiladores (Figura 1). Durante las primeras semanas contaban con alimento *ad libitum*, estándar para roedor Purina Rodent Lab Chow 5001 (Purina Inc.) y permanecieron al menos dos semanas en un ciclo de luz-oscuridad 12:12 (luz: 6:00-18:00 h), el fotoperiodo se cuantificó en forma de Tiempo de Zeitgeber (TZ) en el cual TZ0 equivale al encendido de la luz que se llevaba a cabo a las 600h y TZ12 al apagado de la luz a las 1800h en el ciclo Luz-Oscuridad.

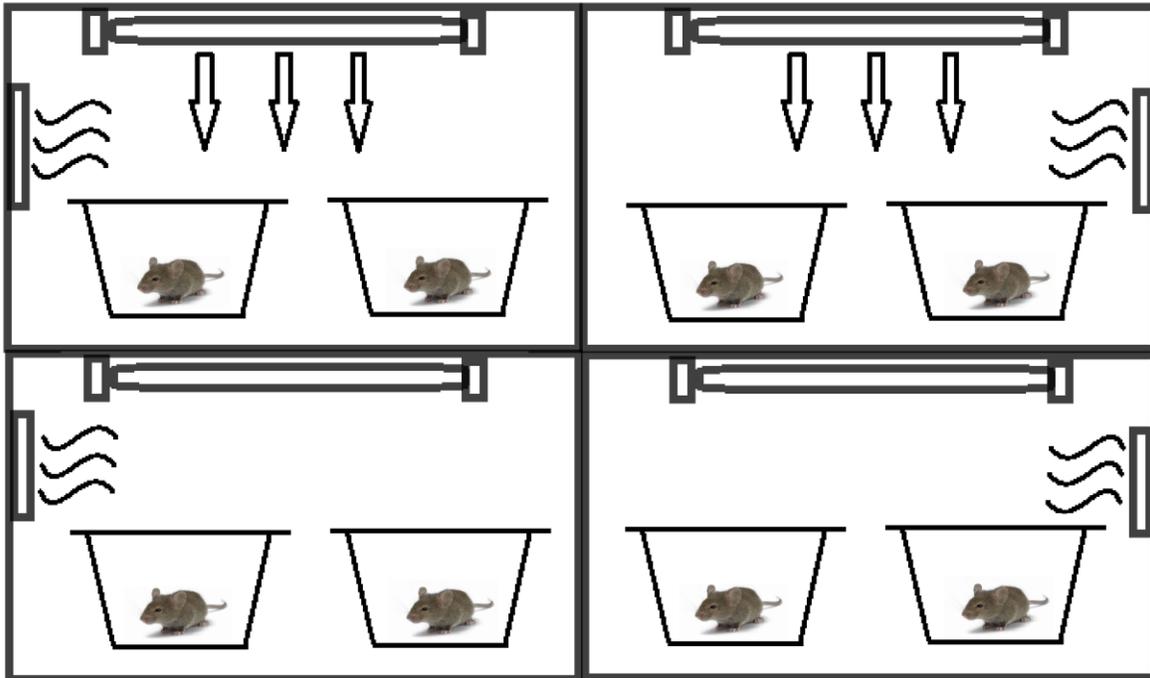


Figura 1. Diagrama que muestra el sistema en donde se llevó a cabo el protocolo experimental, las flechas indican la luz de las luminarias fluorescentes y las líneas onduladas el flujo de aire de la ventilación.

5.2 Sistema de registro y adquisición de datos

El registro de actividad libre se realizó por medio de un haz de luz infrarroja ubicado en el centro de cada jaula (13.5 x 8cm), de tal manera que un evento era contabilizado por cada interrupción del mismo en consecuencia al desplazamiento del animal dentro de la jaula. Se consideró el número de interrupciones cada 10 minutos y la adquisición de datos se realizó en una computadora PC con el programa ACTIBIO (Facultad de psicología-UNAM).

5.3 Protocolo experimental

5.3.1 Introducción a la restricción de alimento

Después de las primeras dos semanas del registro, los ratones fueron sometidos a un protocolo de reducción progresiva en la disponibilidad de alimento. Diariamente se reducían dos horas en el tiempo que estaba disponible el alimento, hasta llegar a un intervalo de sólo cinco horas diarias.

La finalidad de realizar un protocolo de reducción progresiva de alimento es evitar una baja excesiva de peso en los animales, ya que usualmente en los protocolos de RA, se realiza un cambio abrupto del periodo de disponibilidad de alimento de 24 a solo cuatro horas diarias. En trabajos anteriores (Pendergast *et al.*, 2009), se ha reportado una baja sobrevivencia de ratones sometidos a este cambio abrupto en la disponibilidad de alimento. De esta manera se optimizó el protocolo para las características de nuestro modelo biológico.

5.3.2 Restricción de alimento (5 h)

Pasado el periodo de seis días de introducción a la RA, se mantuvo un intervalo diario de disponibilidad del alimento de cinco horas, el cual se presentó durante la fotofase de TZ5 a TZ10.

5.3.3 Ayuno en libre curso

Después de al menos 13 días de RA a cinco horas diarias, los animales fueron sometidos a condiciones de oscuridad constante (O:O) y ayuno durante un periodo de 60 horas, lo que permitía el análisis de hasta 3 ciclos completos de AAA para observar la expresión del OSA en condiciones constantes. De esta manera podríamos comprobar si existe una verdadera sincronización de un componente del ritmo diario de actividad al alimento, ya que un componente de la actividad mantendría la misma relación de fase respecto al pulso de alimento (OSA) y otro con la del fotoperiodo (NSQ).

5.3.4 Alimentación *ad libitum* en libre curso

Después del periodo de 60 horas de ayuno, los animales fueron mantenidos en oscuridad constante, pero a partir de TZ 7 con acceso *ad libitum* al alimento. Durante la introducción a la RA y durante la restricción como tal, se registró el peso corporal de los animales y el consumo de alimento. El alimento era proporcionado al ras del suelo, con ayuda de un alambre metálico que era fijado en la tapa de cada una de las jaulas (Figura 2); en éste se colocaban cubos del alimento perforados a manera de cuentas de collar. Esto permitió tener un mejor control de la cantidad de alimento consumido (se registraba el peso y cantidad de cubos) y una manera rápida y efectiva de retirar el alimento.

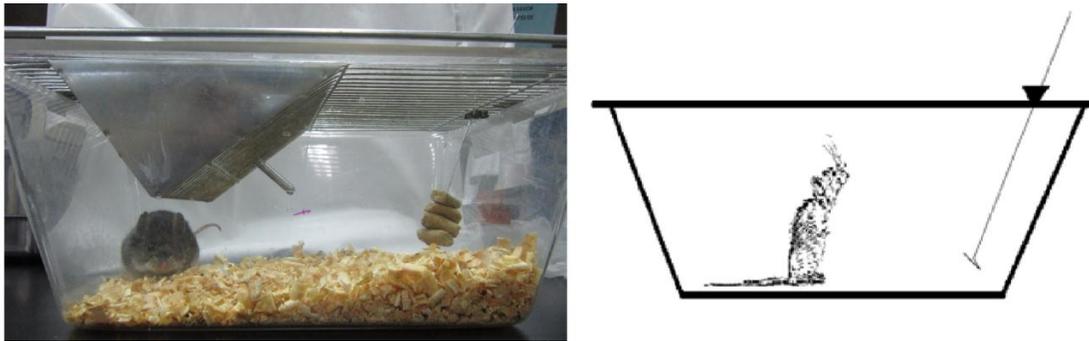


Figura 2. Foto que ilustra el dispositivo para administrar el alimento durante el protocolo de restricción.

5.4 Análisis de datos

Con los datos obtenidos se generaron actogramas y curvas promedio de actividad diaria, utilizando el programa ACTIVIEW® (Minimitter, Sunriver, OR). De igual manera se realizaron perfiles de actividad promedio y gráficas con el programa Microsoft Office® Excel 2010.

Se realizaron comparaciones entre los dos grupos para las diferentes condiciones del protocolo de restricción mediante una prueba paramétrica (T-student), con ayuda del programa STATISTICA 7 (StatSoft ®) y Microsoft Office Excel 2010.

6. RESULTADOS

6.1 Actogramas

6.1.1 Ratones Delgados

En el inciso a) de la figura 3, se muestra una doble representación de un actograma característico del grupo de ratones delgados. Desde el 7 al 18 de octubre fueron mantenidas condiciones de alimentación *ad libitum* (indicada en la figura como ADLB) y fotoperiodo 12:12 LO. El ritmo de actividad locomotriz está sincronizado al fotoperiodo, con inicio de actividad justo al apagado de la luz (TZ 12). Luego el periodo de Introducción a la Restricción, es indicado como IRA.

A partir del 24 de octubre inicia la condición de RA por cinco horas, donde se observan dos componentes en la distribución diaria de la actividad, uno asociado al inicio del pulso de alimentación (TZ 5) y otro que corresponde al inicio de la actividad locomotriz nocturna (TZ 12). Conforme avanzaron los días en esta condición, el bloque de actividad nocturna disminuyó en amplitud y duración, mientras que de manera inversa, la actividad diurna que se presenta previa al pulso de alimento (representado por el rectángulo gris) aumentó, lo que constituye la AAA, ésto se observó más fácilmente a partir del 25 de octubre. Para considerarse como AAA, la actividad debía ser continua durante al menos una hora y presentarse en las dos horas previas al pulso de alimento.

Del 3 al 5 de noviembre, en condiciones constantes de oscuridad y ayuno, se observó la persistencia de la AAA, la cual pareció fusionarse en un sólo bloque con la actividad relacionada con el apagado de la luz. La AAA en esta condición es continua y se observó desde tres horas antes de la ventana de tiempo en donde se presentaba el pulso de alimento durante la restricción.

A partir del día 6 de noviembre, se restituyó la condición de alimentación *ad libitum* pero se mantuvo la de oscuridad constante. Se pueden observar ciclos transitorios de la AAA, con un alargamiento de periodo ($\tau = 24.46$ h) antes de unirse al componente de actividad sincronizado a la luz presumiblemente regulado por el NSQ, el cual osciló con periodo corto ($\tau = 23.36$ h); a partir del 17 de

noviembre se observó un sólo componente en la actividad diaria como el que se presentaba en la condición inicial control.

A la derecha de la Figura 3, se muestran el promedio de cinco días para la actividad locomotriz registrada cada diez minutos durante condiciones estables, tanto de alimentación *ad libitum* (b) como para condiciones de RA a cinco horas diarias (c). Cabe señalar que las escalas son las mismas en ambas gráficas, por lo que la superior, muestra un “recorte” de datos a un máximo de 50 movimientos por evento de grabación. En condiciones de alimentación *ad libitum* (b) la actividad diurna en este grupo fue reducida respecto a la presentada durante la escotofase, durante la restricción (c) se hizo evidente un brote en la actividad diurna, previo al pulso de alimento (TZ3 a TZ5).

En ratones delgados, el promedio de actividad diurna obtenido en condiciones de RA fue mayor (3.3 ± 1.2 movimientos/10 min) al registrado durante condiciones de alimentación *ad libitum* (0.6 ± 0.2 movimientos/10 min).

Los promedios de actividad nocturna también fueron diferentes en ambas condiciones, pero de manera inversa, ya que el obtenido en condiciones de RA fue menor (27.3 ± 11.3 movimientos/10 min) al obtenido en condiciones de alimentación *ad libitum* (42.5 ± 0.2 movimientos/10 min). Además la varianza promedio de las curvas obtenidas en condiciones de alimentación *ad libitum* fue mayor a la obtenida durante la RA, lo que reflejó que en condiciones control un ritmo diario de actividad locomotriz nocturna mejor consolidado.

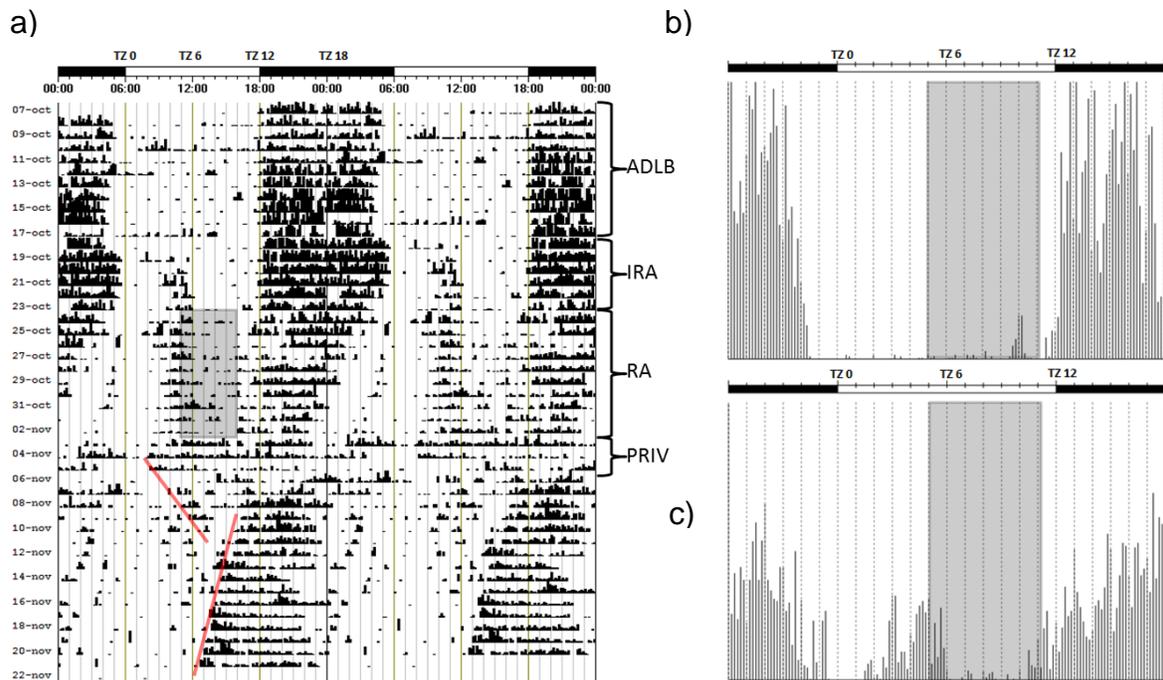


Figura 3. a) Actograma de un ratón delgado en el que se representa al pulso de alimento por el recuadro gris. En corchetes se muestran las diferentes etapas del protocolo, *ad libitum* (ADLB), introducción a la restricción (IRA), restricción 5 horas por día (RA) y privación (PRIV). Se puede observar la AAA en las 3 horas previas al pulso de alimento y como ésta persiste durante el periodo de ayuno (PRIV) y oscuridad constante. En b) se muestra la curva promedio para condiciones de alimentación *ad libitum* y en c) durante restricción alimento, el recuadro gris representa en ambas el horario de acceso al alimento.

6.1.2 Ratones obesos

En el inciso a) de la Figura 4, se muestra una doble representación de un actograma característico del grupo de ratones obesos. Del 7 al 18 de octubre, con un fotoperíodo de 12:12 LO y acceso *ad libitum* al alimento (ADLB), se observó que el ritmo diario de actividad locomotriz para el grupo de ratones obesos no fue robusto como el obtenido para el grupo de ratones delgados (Figura 3). Al iniciar la RA, se apreció una reducción en los brotes diurnos de actividad entre TZ0 y TZ5, respecto a lo registrado en condiciones de alimentación *ad libitum*. A partir del 25 de octubre, se observaron dos componentes en la actividad diaria, pero a diferencia del actograma del grupo delgados, la actividad diurna se presentó a

partir de la presencia del alimento (TZ5 – TZ8) y no antes. Cabe resaltar que en condiciones de alimentación *ad libitum* la amplitud de la actividad nocturna fue menor para el grupo obesos respecto a su contraparte del grupo delgados.

Durante los días de ayuno (3-5 de noviembre, indicado como PRIV en el actograma), y a diferencia del grupo de ratones delgados, hubo poca actividad durante el día subjetivo. El 6 de noviembre en condiciones de oscuridad constante y alimentación *ad libitum*, se observó que la actividad locomotriz inició en donde previamente se presentaba el pulso de alimento (TZ5). Del 12 al 14 de noviembre se observó un componente de actividad diurna, que mantuvo la misma relación de fase, respecto a la presencia del alimento que la presentada durante la RA. Este componente de la actividad diaria osciló con un periodo largo ($\tau = 24.79$ h) para fusionarse ya en el día 16 de noviembre con el componente de actividad principal (NSQ) en libre curso, con un periodo menor a 24 horas ($\tau = 23.71$ h).

A la derecha de la figura 4, se muestran el promedio de cinco días para la actividad locomotriz registrada cada diez minutos durante condiciones estables de alimentación *ad libitum* (b) y durante el protocolo de RA (c) representativas del grupo de ratones obesos. En b) se muestra que la actividad locomotriz no estuvo restringida solamente a la escotofase, sino que presentó brotes de actividad distribuidos a lo largo de la fotofase. En c) es notable que se presentara un brote de actividad de mayor amplitud, durante y no antes del pulso de alimento (representado con el rectángulo gris). El promedio de actividad diurna arrojado por las curvas del grupo de ratones obesos en condiciones de RA (4.7 ± 1.2 movimientos/10min) fue mayor al obtenido en condiciones de alimentación *ad libitum* (1.4 ± 0.2 movimientos/10min). En el caso del promedio para la actividad nocturna, ésta fue mayor en condiciones de alimentación *ad libitum* (17.1 ± 8.5 movimientos/10min), respecto al registrado en condiciones de RA (8.0 ± 2.2 movimientos/10min), este comportamiento fue semejante a lo ocurrido en el grupo de ratonas delgadas.

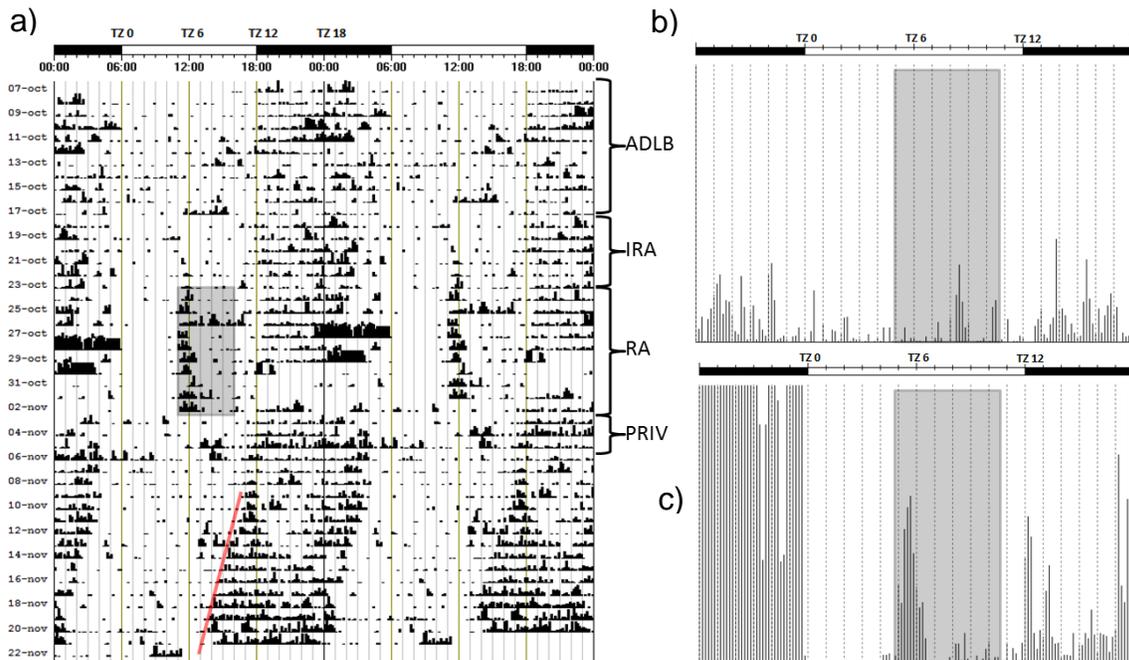


Figura 4. a) Actograma de un ratón obeso, en el que se representa el pulso de alimento por el recuadro gris, en corchetes se muestran las diferentes etapas del protocolo, *ad libitum* (ADLB), introducción a la restricción (IRA), restricción 5 horas por día (RA) y privación (PRIV). Durante la fotofase en condiciones de RA, el grueso de actividad se presenta durante el pulso de alimento y durante la privación esta disminuye. A la derecha se muestran las curvas promedio para condiciones de alimentación *ad libitum* (b) y durante restricción alimento (c) en las que el recuadro gris representa el acceso libre al alimento.

6.2 Curvas promedio

6.2.1 Días utilizados para generar curvas promedio de actividad

En la Figura 5 se muestran dos actogramas (izquierda ratones delgados, derecha ratones obesos) que indican los días del registro que se utilizaron para generar las gráficas equivalentes al promedio de actividad (\pm EEM) para siete animales por grupo, en las diferentes condiciones del protocolo. Para las gráficas en condiciones de alimentación *ad libitum* y RA con fotoperiodo 12:12 LO, se tomaron en cuenta 5 días consecutivos por cada animal (indicados en color azul). Para generar la gráfica de la condición de privación de alimento y oscuridad constante, se tomaron en cuenta solo 3 ciclos por cada animal (indicados con color rojo).

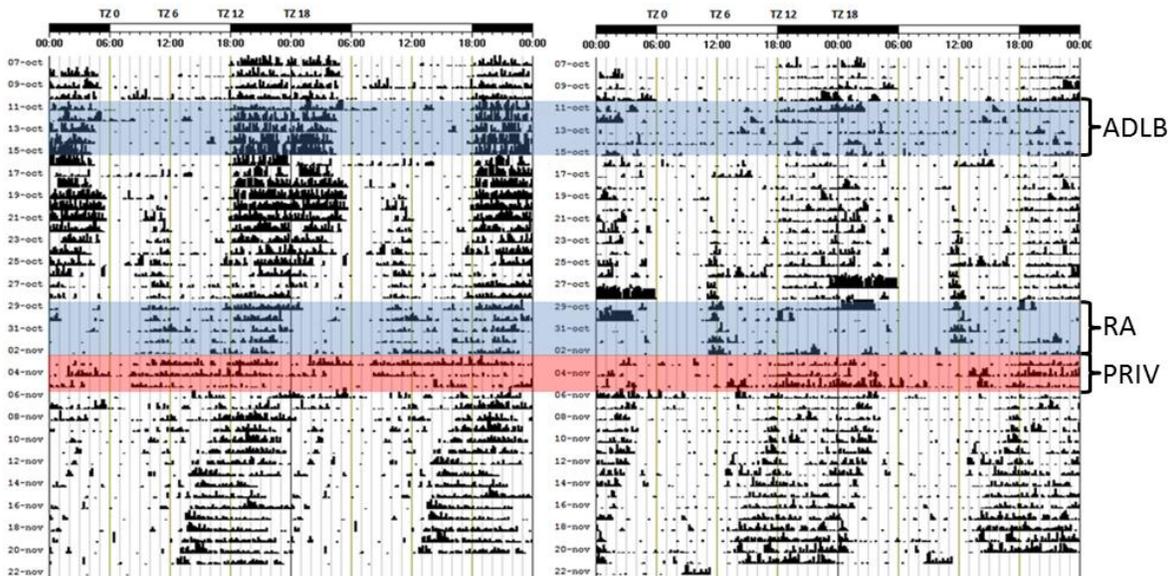


Figura 5. Actogramas para una ratona delgada (izquierda) y obesa (derecha) que muestran en corchetes del lado izquierdo, los días utilizados para generar las gráficas de actividad promedio de las diferentes condiciones del protocolo: *ad libitum* (11-15 de octubre), RA (29 de octubre al 2 de noviembre) y privación de alimento durante tres días en oscuridad constante (3-5 noviembre).

6.2.2 Curva promedio en condiciones de alimentación *ad libitum*

La Figura 6 muestra la curva obtenida por grupo, con el promedio de la actividad para cada 10 minutos, en condiciones de alimentación *ad libitum* y fotoperiodo 12:12 LO. En ambos grupos se puede observar que en condiciones control, la actividad durante la fotofase fue mínima, en comparación con la actividad registrada durante la escotofase. Lo anterior comprueba el hábito nocturno de esta especie. El intervalo en el que se presentara el pulso de alimento durante la siguiente condición del protocolo experimental (RA), está representado en la gráfica por el rectángulo de color gris (TZ5 – TZ10).

La amplitud que se registró en la actividad nocturna para el grupo de ratones delgados es mayor a la del grupo de ratones obesos. La amplitud en la actividad diurna, también mostró diferencias entre grupos pero de manera inversa ya que en el grupo de ratones obesos ésta fue mayor (1.4 ± 0.2 movimientos/10min) a lo registrado para el grupo de ratones delgados (0.6 ± 0.2 movimientos/10 min).

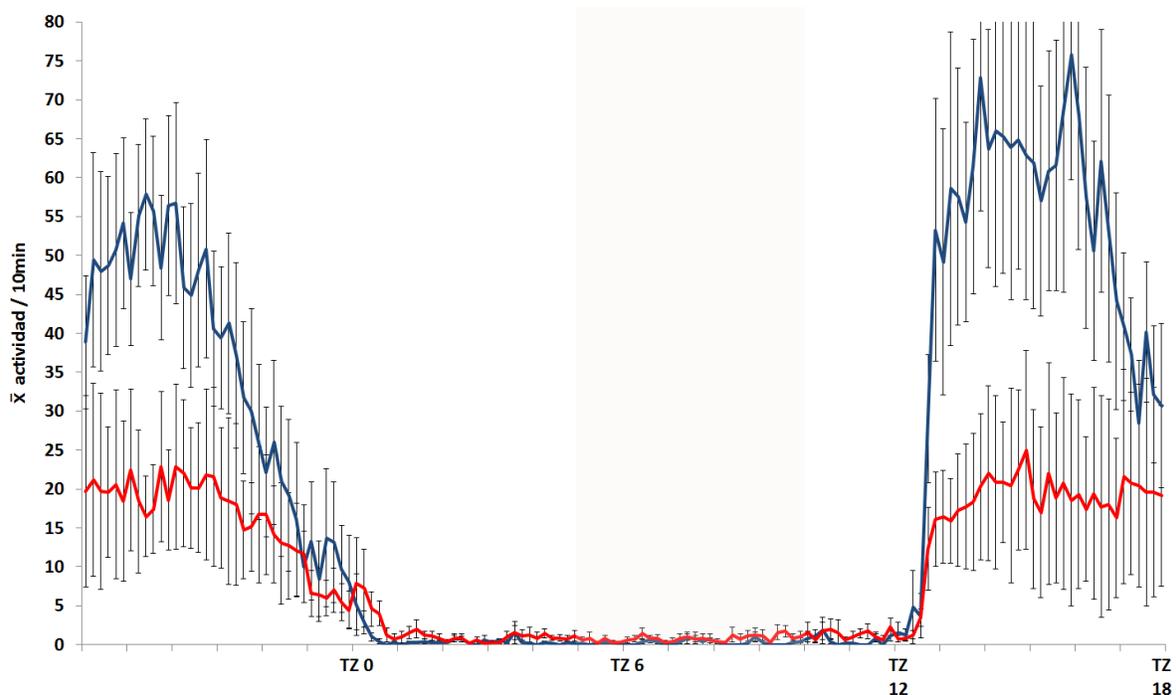


Figura 6. Curva promedio de actividad (\pm EEM) para siete ratones delgados (serie azul) y siete ratones obesos (serie roja) durante condiciones de alimentación *ad libitum*. Se aprecia una robusta sincronización de la actividad al ciclo luz-oscuridad en donde la mayor parte de ésta se lleva a cabo durante la escotofase. La actividad en ambos grupos es mínima, durante el intervalo donde posteriormente se presentara el pulso de alimento (rectángulo gris).

6.2.3 Curva promedio en condiciones de RA

En la Figura 7 se muestra la curva del promedio de la actividad obtenida para condiciones de RA y fotoperiodo 12:12 LO. El grupo de ratones delgados, mostró un aumento en la actividad desde 2 horas y media antes (TZ 2.5) del pulso de alimento, equivalente a la AAA. En el caso de los ratones obesos la actividad aumentó durante (TZ 6) y no antes de la presencia del alimento, de manera opuesta a su contraparte ratones delgados, en la que la actividad disminuyó a partir de la llegada del alimento.

Al retirar el alimento (TZ 10) ambos grupos presentan un segundo brote de actividad, que en la caso de los ratones delgados fue de mayor amplitud que la AAA y en el caso de los obesos fue de menor amplitud a la actividad registrada durante el pulso de alimento. En el grupo de ratones obesos, la mayor amplitud en el ritmo de actividad se registró durante la escotofase (TZ13.5), aunque el pico de

actividad que presentaron durante el pulso de alimento, tiene una magnitud similar. En el grupo de ratones delgados, la amplitud que se registró antes (AAA) y durante el pulso de alimento, es menor a lo registrada en el pico de actividad nocturna.

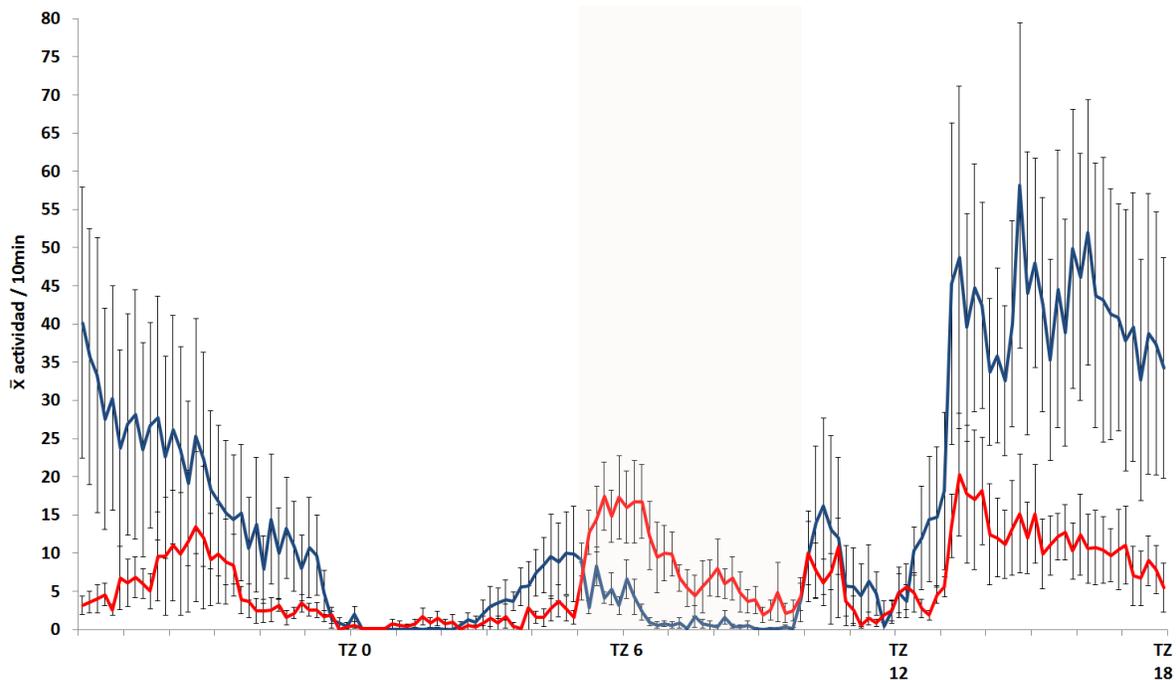


Figura 7. Curva promedio de actividad (\pm EEM) para siete ratones delgados (serie azul) y siete ratones obesos (serie roja) durante condiciones de RA. Se observa un nuevo componente en la actividad diaria asociado al pulso de alimento. En el caso de las ratonas delgadas este componente inició hasta 2.5 horas antes del pulso y disminuyó hasta un segundo brote de actividad que presentaron ambos grupos al retirar el alimento. En el grupo de obesas la actividad aumentó durante el horario de acceso al alimento representado por el rectángulo gris.

6.2.4 Curva promedio en libre curso y ayuno

En la curva de la Figura 8, en condiciones de oscuridad constante y privación de alimento, se observó que en el grupo de ratones delgados el componente de actividad que se presentó previo al pulso de alimento (TZ2-TZ5) o AAA, persistió y se presentó con una mayor amplitud a la registrada en condiciones de RA.

En el caso de los obesos, este componente en la actividad fue similar en fase al registrado en condiciones de RA y de menor amplitud respecto al de ratones delgados en ayuno. El grueso de la actividad para los ratones obesos

durante el día subjetivo, sucedió principalmente en donde previamente se presentaba el pulso de alimento (TZ5-TZ10), al igual que lo registrado en condiciones de RA.

En ambos grupos se conservó el brote de actividad asociado al final del pulso de alimento con pico en TZ11. En los ratones delgados este brote presentó la misma amplitud que en condiciones de RA; en el grupo de ratones obesos la amplitud es menor al que presentaban previamente en RA.

La curva obtenida durante el ayuno tiene una distribución similar a la obtenida para ambos grupos en condiciones de RA en LO 12:12, pero en el grupo de los ratones delgados la amplitud de la actividad durante el día subjetivo aumentó hasta casi igualar a la de la noche subjetiva.

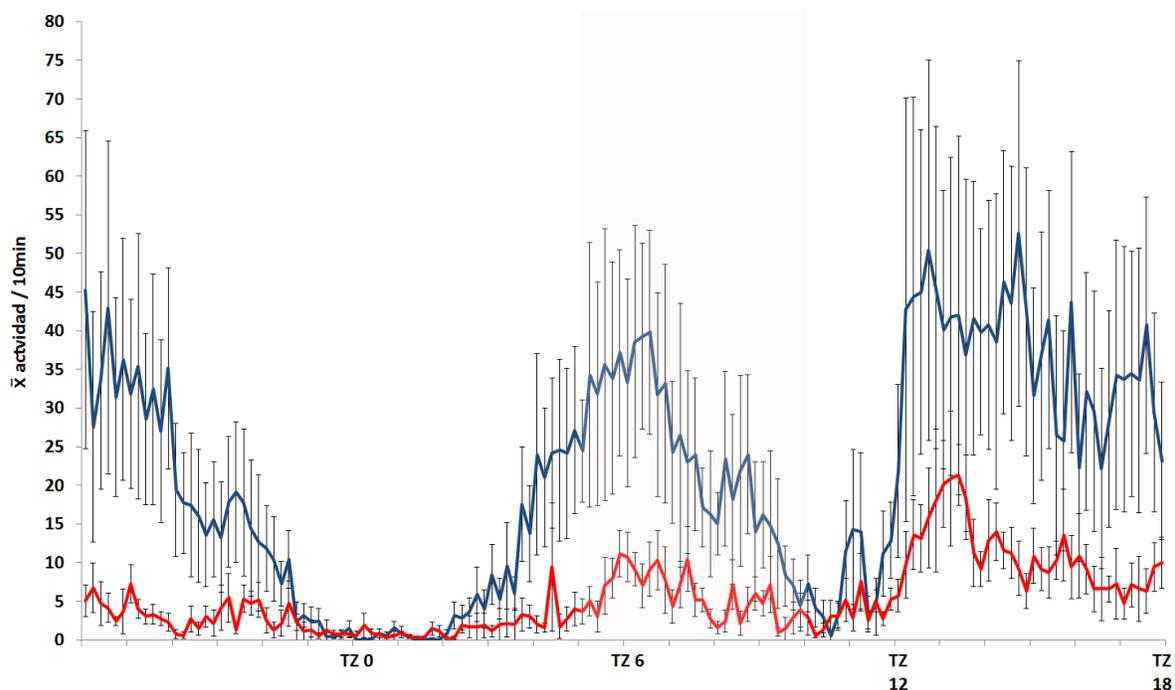


Figura 8. Curva promedio de actividad (\pm EEM) para siete ratones delgados (serie azul) y siete ratones obesos (serie roja) en condiciones de oscuridad constante y privación de alimento por 60 h. Se muestra claramente cómo el componente de actividad asociado al pulso de alimento (AAA) se persiste durante los tres ciclos de privación de alimento.

6.3 Gráficas de barras

Con el fin de evaluar las posibles diferencias en cada una de las fases del protocolo, se compararon los datos correspondientes a los segmentos de tiempo que se muestran como ejemplo en la Figura 9, que corresponde al promedio de la actividad entre ratones delgados y obesos para intervalos específicos: las 2 horas previas (Fig. 10a; TZ3-TZ5), las dos primeras horas del acceso al alimento durante la restricción de alimento (Fig. 10b; TZ5-TZ7) y las dos horas posteriores al retiro del alimento (Fig. 10c; TZ10-TZ12).

Se comparó en cada gráfica las tres distintas fases del protocolo experimental: *ad libitum* (Adlib) como situación control. Luego en la fase donde ocurre la restricción de alimento (RA) ya instalada, y finalmente en la fase de 60 h de Privación de alimento en total oscuridad. Existen diferencias estadísticamente significativas entre todas las comparaciones excepto en la correspondiente a las dos horas posteriores al pulso de alimento, durante la RA.

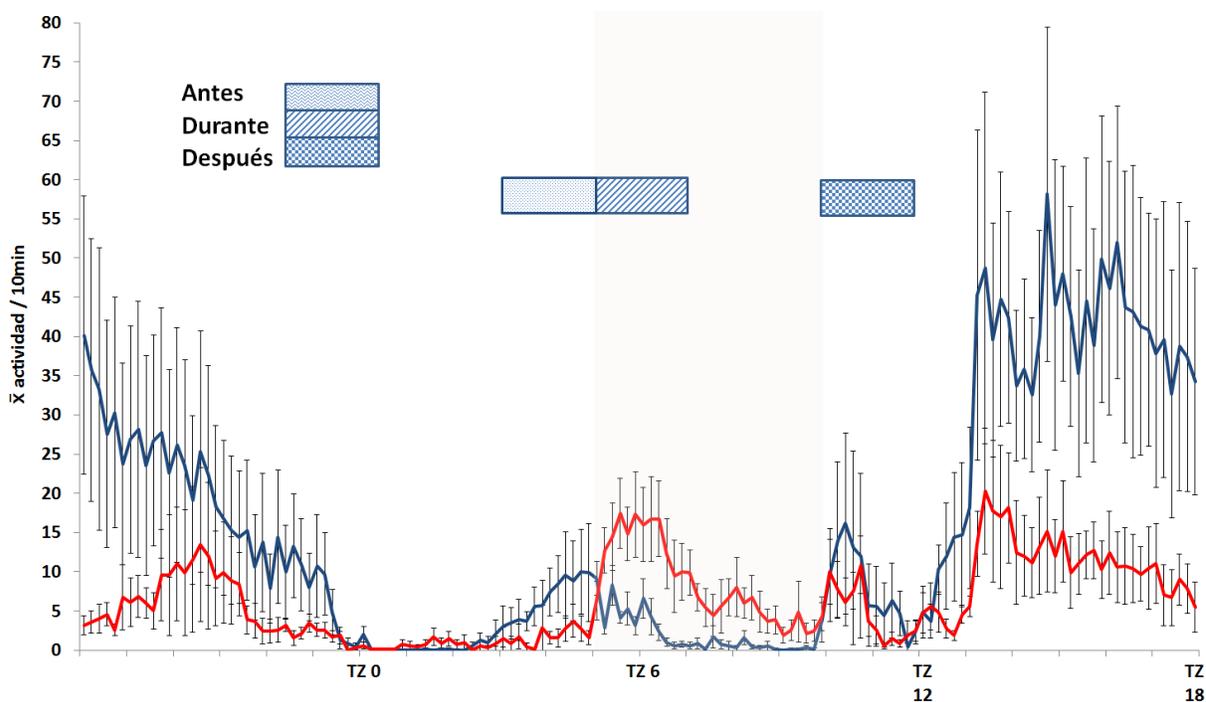


Figura 9. Gráfica de la actividad promedio por grupos, que ilustra los segmentos del registro utilizados para generar las gráficas de barra de actividad promedio (Figura 10) previa, durante y después del pulso de alimento.

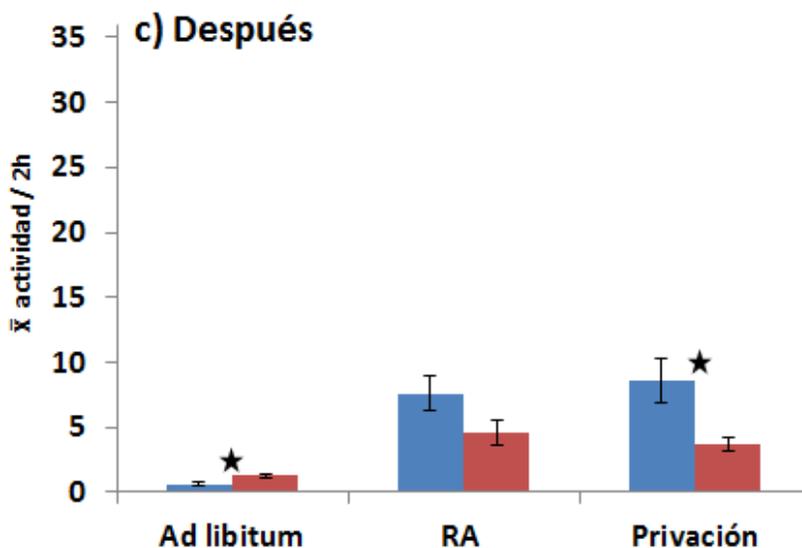
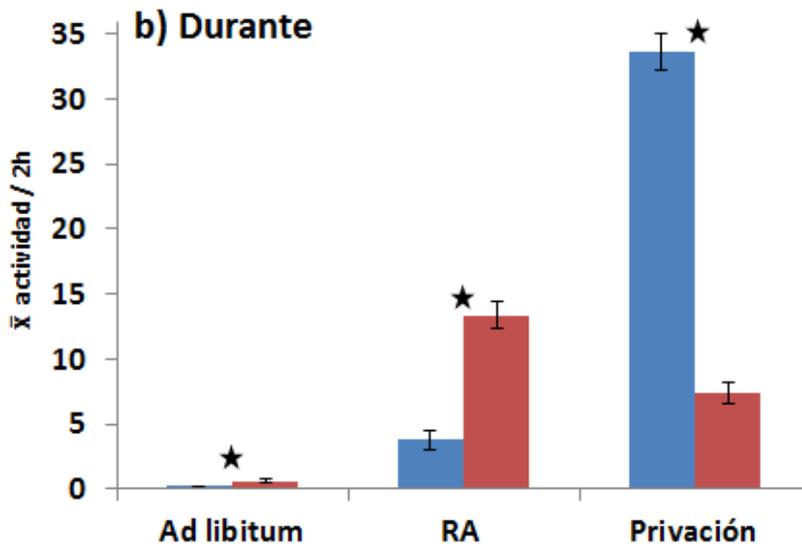
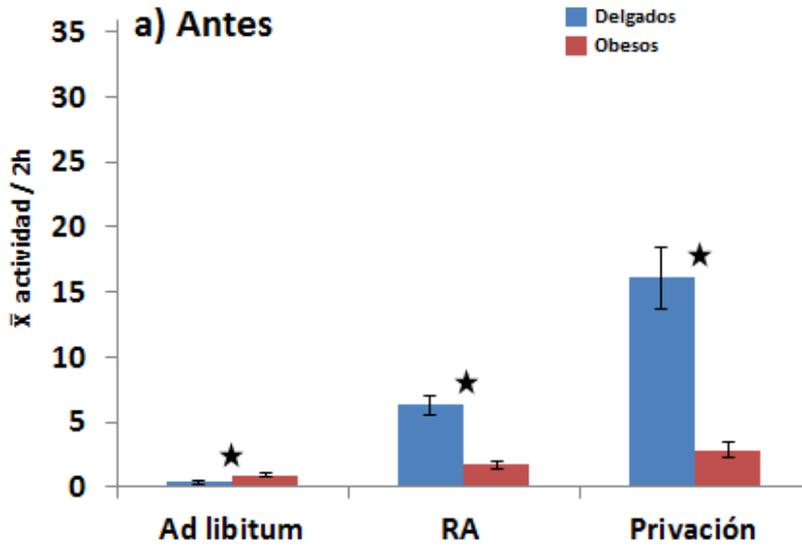


Figura 10. Actividad promedio para ratones delgados (barras azules) y obesos (barras rojas):

a) dos horas antes de la presencia del alimento

b) durante las dos primeras horas de la presencia del alimento

c) dos horas después del retiro del alimento, para ratones delgados (barras claras) y obesos (barras oscuras).

Se comparan en cada una de ellas las condiciones de alimentación *Ad libitum*, restricción (RA) y privación. La estrella indica diferencias estadísticas ($p < 0.05$). Es importante notar que la actividad antes de la llegada del alimento en condiciones de RA es mayor en delgados (a), pero durante la exposición al alimento, es mayor en obesos (b). La privación sigue reflejando diferencias entre grupos en las tres fases de la exposición al alimento.

6.4 Tablas de valores promedio y porcentaje de actividad

En la Tabla 1, se muestra el promedio por grupos de parámetros adicionales, evaluados mediante la curva de actividad promedio generada por el programa ACTIVIEW®, tanto en condiciones de alimentación *ad libitum* como durante la RA. Se comparan la actividad promedio durante cinco días completos, así como la observada solo durante la fotofase o escotofase. En la tabla 2 se compara el porcentaje por grupo, de la actividad registrada en la fotofase, escotofase y las dos horas previas al pulso en condiciones de alimentación *ad libitum* y RA.

Tabla 1. Valores promedio de actividad por cada 10 minutos, para cada grupo el asterisco indica diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) entre ratones delgados y obesos.

		Actividad Total	Fotofase	Escotofase
ADLIB	Delgadas	23.6 (± 3.6)*	0.5 (± 0.2)*	46.6 (± 7.2)**
	Obesas	5 (± 0.6)	1.4 (± 0.2)	8.7 (± 1.4)
RA	Delgadas	15.3 (± 6.1)	3.3 (± 1.2)	27.3 (± 11.3)*
	Obesas	6.4 (± 0.9)	4.7 (± 1.1)	8.0 (± 2.1)

En condiciones de alimentación *ad libitum*, la actividad total y nocturna es mayor en ratones delgados, en esta misma condición la actividad diurna en el grupo de ratones obesos es mayor. Durante la RA la única diferencia que se conserva entre grupos es en la actividad nocturna, que es mayor para el grupo de ratones delgados. En esta condición, el grupo delgados presenta una disminución en la actividad total y nocturna y un aumento en la actividad diurna (AAA). En el grupo obesos durante la RA, existe un aumento en la actividad total y la actividad diurna, pero a diferencia del grupo delgados este aumento en la actividad diurna se presenta durante el pulso de alimento.

La Tabla 2, muestra el porcentaje de la actividad total por grupo que fue registrada durante la escotofase y fotofase en las diferentes condiciones del protocolo experimental. Para la condición de RA se muestra adicionalmente el porcentaje de actividad para las dos horas previas al pulso de alimento (AAA).

Tabla 2. Porcentajes actividad por grupo en las diferentes condiciones del protocolo experimental.

	Actividad Total <i>Adlibitum</i>*	Escotofase	Fotofase	
Delgados	3081	98%	2%	
Obesos	1280	93%	7%	
	Actividad Total RA*	Escotofase	Fotofase	AAA (2h antes del pulso)
Delgados	2191	89%	11%	4%
Obesos	913	63%	37%	2%

*Total de movimientos promedio durante 24h.

La Tabla 2 muestra que el porcentaje de actividad registrado en el grupo de ratones delgados durante las dos horas previas al pulso de alimento, es mayor al que presentó el grupo de ratones obesos.

6.5 Consumo promedio de alimento

La Figura 11 muestra el promedio del consumo diario de alimento por grupo, tanto en condiciones *ad libitum* como durante la RA. Existe una diferencia estadísticamente significativa en la alimentación *ad libitum*; los ratones obesos en promedio consumieron diariamente 1.5 g más que los ratones delgados. Cabe resaltar que en condiciones de RA existe una tendencia hacia la disminución en el consumo de alimento por parte del grupo de ratones obesos, de manera inversa al consumo registrado en condiciones de alimentación *ad libitum*. Sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre grupos. En el grupo de obesos hay diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) en el consumo durante las diferentes condiciones del protocolo experimental.

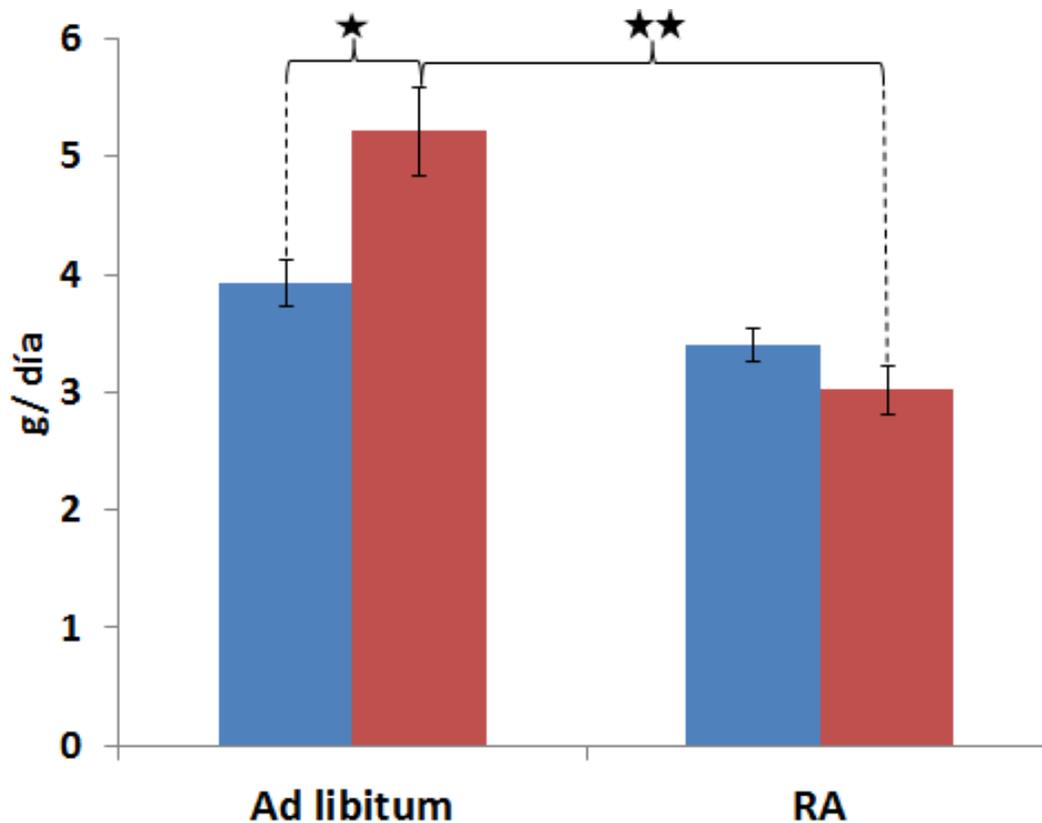


Figura 11. Consumo promedio de alimento por grupo en las diferentes condiciones del registro. Las barras azules corresponden a ratones delgados y las rojas a obesos. Existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre grupos durante condiciones de alimentación *ad libitum* y dentro del grupo de ratones obesos ($p < 0.01$) para las diferentes condiciones. Durante la RA, se observa una tendencia hacia un menor consumo de alimento por parte del grupo de ratones obesos, no hay diferencias entre grupos.

6.6 Variación del peso corporal

En la gráfica de la Figura 12, se muestra la variación del peso corporal por individuo durante las diferentes condiciones del protocolo. Se observó a lo largo del protocolo experimental, que el peso corporal para el grupo de ratones obesos presentó una mayor variación respecto al grupo delgados.

Al iniciar la introducción a la restricción de alimento, ambos grupos mostraron una tendencia hacia la pérdida de peso. En el grupo de ratones delgados, esta tendencia duró alrededor de 3 o 4 días. Pasado ese lapso de tiempo, el peso se estabilizó en este grupo. En el grupo de ratones obesos, la

tendencia hacia la reducción de peso tuvo una duración de hasta 13 días, antes de estabilizarse.

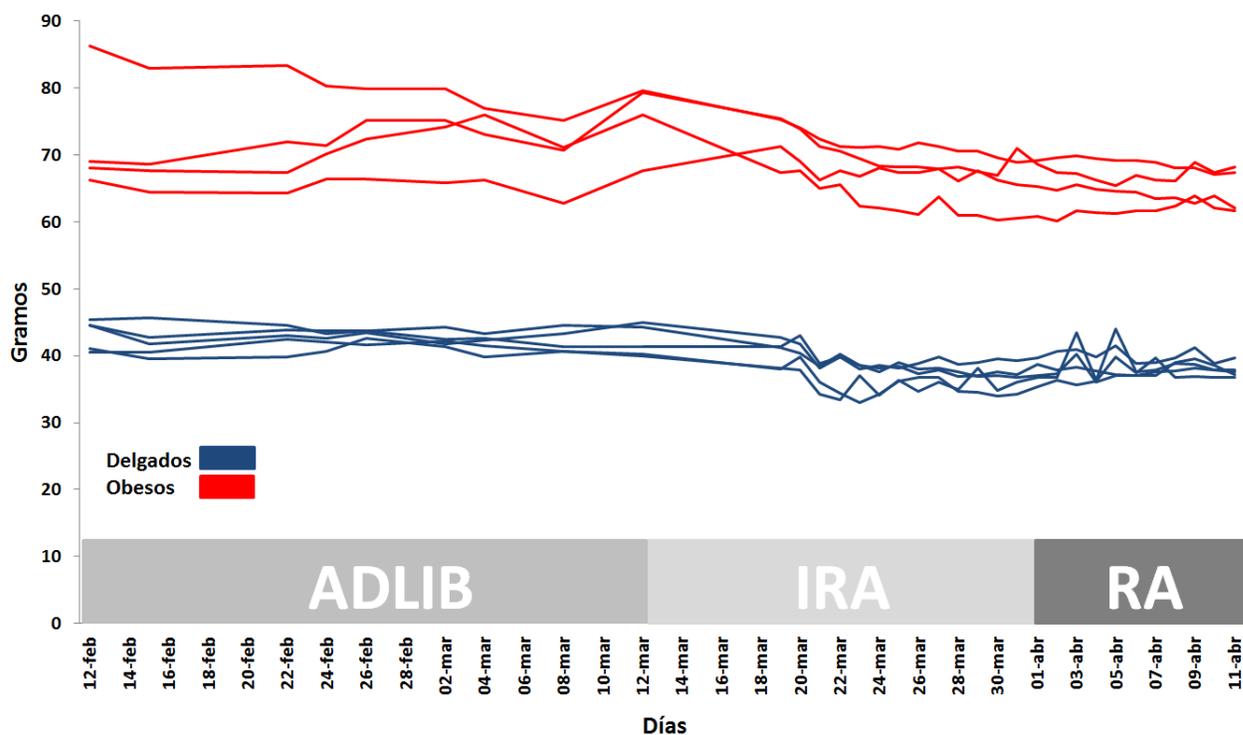


Figura 12. Pesos corporales de cinco ratones delgados (líneas azules) y cuatro obesos (líneas rojas), a lo largo del protocolo experimental. En ambos grupos existe pérdida de peso al iniciar la restricción, pero en los ratones obesos es mayor esta tendencia.

7. DISCUSIÓN

De acuerdo a lo observado en los actogramas y curvas promedio, los ratones obesos no expresan AAA. Esto puede estar relacionado con la mayor cantidad de reservas energéticas que presentan, ya que en estudios previos se indica que es necesario para la expresión de AAA una disminución en las reservas energéticas del animal hasta alcanzar un umbral crítico, en el cual el estado metabólico se ve comprometido (Mistlberger, 2011; Pendergast *et al.*, 2009); lo que implica la depleción de la mayor parte de reservas energéticas de recambio rápido (principalmente glucógeno y el inicio de la movilización de lípidos). Es posible que el protocolo de restricción de alimento a 5 horas diarias, no sea suficiente para

lograr que los ratones obesos de *N. alstoni* alcancen un estado metabólico comprometido a tal grado, que se exprese la AAA. Se podría evaluar los niveles de glucógeno hepático o de ácidos grasos circulantes.

Otro factor que podría estar relacionado con la disminución en la AAA en el grupo de ratones obesos, es la reducción que mostraron en la actividad total diaria respecto al grupo de ratones delgados. Al disminuir la amplitud en la actividad nocturna diaria en los ratones obesos y además presentar brotes de actividad diurna, es más difícil distinguir un posible componente en la actividad locomotriz asociado al protocolo de restricción de alimento, esto se muestra en los actogramas de la Figura 13.

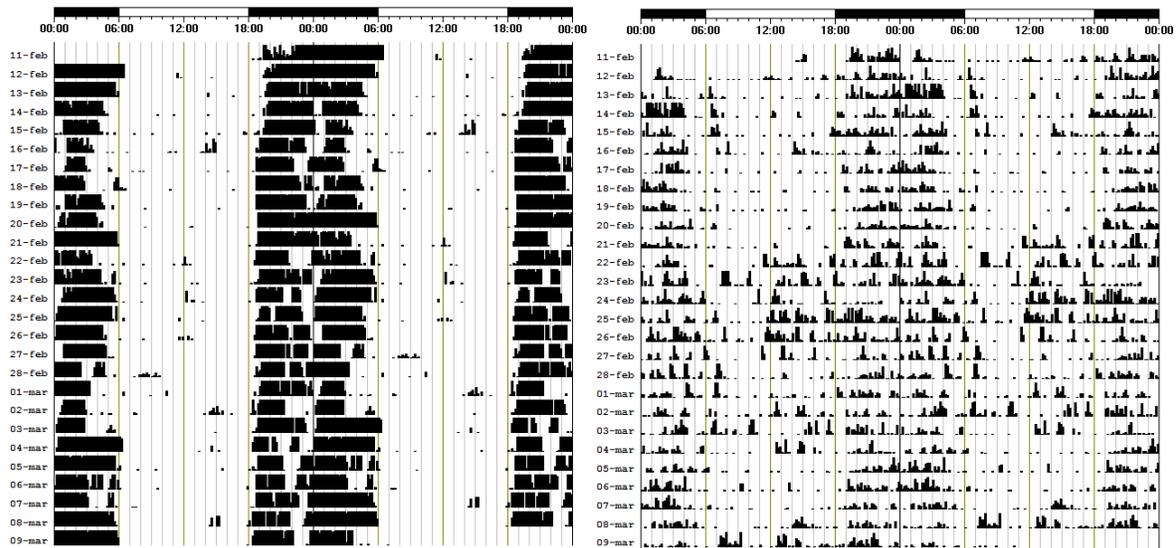


Figura 13. Ejemplos de actogramas obtenidos de un ratón delgado (izquierda) y ratón obeso (derecha) que muestran las diferencias en amplitud y distribución del ritmo de actividad locomotriz en condiciones de alimentación *ad libitum* y fotoperiodo 12:12 LO.

Al calcular el porcentaje de actividad que se registró para cada grupo durante las dos horas previas al pulso de alimento, se demostró que a pesar de la disminución en la actividad total para el grupo de ratones obesos, el porcentaje que muestran de AAA respecto a la actividad total en su grupo es menor (2%) que la que presentó el grupo de ratones delgados (4%).

Como se puede observar en la Figura 3, el grupo de ratones delgados muestra AAA apenas 48 horas después de haber iniciado la introducción a la RA,

lo que indica que el estrés metabólico por el ayuno ocurre de inmediato, esto puede reflejar una menor cantidad de reservas energéticas en el grupo de ratones delgados ya que en estudios previos (Carmona-Alcocer, 2012) se ha registrado que éstos presentan una menor cantidad de grasa visceral.

En los antecedentes se indica que en las ratas con obesidad inducida genéticamente, la ausencia de la expresión del gen que codifica para el receptor de la leptina, conduce a un aumento en la amplitud de la expresión de AAA a pesar de que los organismos cuentan con una gran cantidad de reservas energéticas (Mistlbelger y Marchant, 1999). Esta mutación es equivalente a un estado en el que se tiene hambre todo el tiempo, sin importar la cantidad de alimento consumido o de reservas energéticas con las que ya se cuente.

El grupo de ratones obesos en este trabajo de investigación, registró un mayor consumo de alimento en condiciones *ad libitum* y una reducción en la actividad total respecto al grupo de ratones delgados. Se ha propuesto que esto podría estar asociado con altos niveles plasmáticos de grelina y de su receptor hipotalámico GSHR (Báez Ruiz *et al.*, 2013), lo que indica que la acción de la grelina incrementa la actividad del NPY en el ARC; adicionalmente se ha observado que los ratones obesos presentan hiperleptinemia e hipertrigliceridemia (Carmona-Alcocer *et al.*, 2012; Fuentes-Granados, 2012) por lo que una posible disminución de la acción de la leptina como hormona anorexigénica podría ser debida a una falla en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, como consecuencia de la alta concentración de triacilglicéridos (Banks y Farrell, 2003; Banks *et al.*, 2004).

Por la naturaleza del mecanismo de señalización de la leptina a nivel neural, los altos niveles de triacilglicéridos y el desequilibrio redox ocasionados por la obesidad pueden afectar la función anorexigénica de esta hormona, lo que explicaría en parte la hiperfagia que presenta el grupo de ratones obesos (Cottrell y Mercer, 2012).

En cuanto a la falta de AAA registrada en los obesos de *N. alstoni*, nuestros resultados son más consistentes con el modelo de obesidad inducida por alimento (Persons *et al.*, 1993), en donde los animales obesos presentan una disminución en la AAA respecto a los animales delgados. Este comportamiento es opuesto al de las ratas Zucker con mutación para el receptor de leptina, ya que el grupo de ratones obesos de *N. alstoni* no mostró un aumento en la AAA, sino todo lo contrario: una disminución o ausencia total en comparación con el grupo de ratones delgados. Al momento no se tiene evidencia acerca de la funcionalidad del receptor a leptina en obesos de *N. alstoni*, sin embargo no parecen existir diferencias en la presencia del mismo en hipotálamo (Báez Ruiz *et al.*, 2013).

La hiperleptinemia en *N. alstoni* (Carmona-Alcocer *et al.*, 2012; Fuentes-Granados, 2011) se podría correlacionar con una disminución en la expresión de AAA. Esto podría indicar que la leptina sintetizada por los adipocitos es funcional pero adicionalmente a una posible alteración del transporte vía barrera hematoencefálica, la señal no se integraría adecuadamente en el hipotálamo, lo que es distinto a no presentar receptores funcionales como en el caso de la rata Zucker y la elevada expresión de AAA en éstas.

Al parecer la acción directa del estado nutricional (obesidad) y la leptina sobre los posibles osciladores periféricos, como mediador en la expresión de AAA, no se ve afectada por los factores antes mencionados (nivel triacilglicéridos y desequilibrio redox) y es por esto que es posible observar una disminución en la expresión de AAA, respecto al grupo de ratones delgados, sin embargo, para corroborar esta hipótesis sería necesario determinar el perfil de leptina durante el protocolo de restricción al alimento. Al respecto, en ratas se ha observado que existe una disminución importante en los niveles de leptina cuando se aplica un protocolo equivalente de RA (Martínez-Merlos *et al.*, 2004).

Es posible que tanto grelina como leptina, formen un asa de retroalimentación que regula la expresión de AAA. La parte positiva de esta asa puede estar conformada por la grelina, ya que ante un protocolo de RA se ha observado un aumento considerable en las concentraciones plasmáticas de esta hormona (Silver y Balsam, 2010) y a su vez los ratones que tienen una mutación para el receptor GSHR presentan una disminución en la expresión de AAA (LeSauter, 2009). La parte negativa del asa podría estar conformada por la leptina, ya que ante un protocolo de RA los niveles de leptina disminuyen drásticamente antes de que se lleve a cabo la expresión de AAA. Es por esto que en las ratas con la mutación para el receptor de leptina, muestran un aumento en la expresión de AAA, ya que no cuentan con el componente negativo de la posible asa de regulación para la expresión de AAA (Persons *et al.*, 1993) .

En el caso de los ratones obesos, además de la mayor cantidad energética consumida en relación a la gastada (hiperfagia y reducción en la actividad total), la coordinación respecto a los ritmos metabólicos y el patrón diario de alimentación puede estar alterada. Normalmente el horario de alimentación sincroniza los ritmos conductuales y metabólicos, asegurando una coordinación óptima entre estos dos. Si la función de sincronización al alimento falla, los ritmos metabólicos y de ingesta pueden estar no coordinados de manera óptima. Los resultados en este estudio muestran que ésto podría estar ocurriendo en los ratones obesos de *N. alstoni*, ya que este grupo mostró una disminución (al menos en la parte conductual) en la respuesta anticipatoria al horario restringido de alimentación.

No se descarta la posibilidad en la cual la obesidad espontánea que genera más de la mitad de la población de *N. alstoni* en cautiverio, al ser alimentado con una dieta estándar, pueda estar relacionada con la falta de coordinación entre la ingesta de alimento y los ritmos metabólicos, ya que en estudios previos (Arble *et al.*, 2009) se ha comprobado que provocando esta misma desincronización al someter ratones a alimentarse durante la fase de reposo (fotofase), se provoca una mayor ganancia de peso y desarrollo de obesidad a pesar de la misma cantidad y calidad de alimento consumido, que un grupo que fue alimentado

durante la fase habitual de actividad (escotofase), además de no presentarse diferencias en la actividad total entre estos grupos.

El efecto de la desincronización ingesta-metabólica en la expresión de AAA, podría comprobarse sometiendo a ratones de *N. alstoni* que presentan obesidad espontánea a un régimen de alimentación exclusivamente nocturna y después a un protocolo de RA. De manera opuesta un grupo de ratones delgados, se podría someter a un régimen de alimentación diurna y después a un protocolo de RA nocturno, en el cual se podría medir alguna otra variable que sea posible de distinguir del patrón nocturno diario de actividad (temperatura, actividad hormonal o secreción de enzimas gástricas) en forma de AAA, con lo cual si se presenta una disminución en la expresión de la misma se podría corroborar que los resultados obtenidos en este estudio en forma de una reducción de la AAA para el grupo de ratones obesos, está relacionado con la desincronización ingesta-metabólica.

Cabe resaltar que la sincronización entre el horario de alimentación y la actividad en los ratones obesos de este estudio, se pudo manifestar como la actividad registrada durante el pulso de alimento, aunque no en forma de actividad anticipatoria. Los ratones obesos presentan durante tres ciclos en condiciones de ayuno y oscuridad constante, un brote de actividad durante el tiempo que correspondía al pulso de alimento y además un segundo brote que coincide con el horario en que el alimento era retirado durante el protocolo de RA. La persistencia de estos componentes durante el ayuno, indica su naturaleza endógena. Lo anterior sugiere que de alguna manera el estado de obesidad en *N. alstoni*, inhibe la anticipación al alimento, pero la sincronización al mismo persiste y se manifiesta como la actividad registrada durante el pulso de alimento y al retirar el mismo. Esta posible manifestación del OSA, puede ser específica para la especie *N. alstoni*, ya que en estudios previos con ratas y ratones obesos sometidos a RA, no se ha registrado una respuesta similar a lo observado en este estudio.

8. CONCLUSIONES

Objetivo general

- A partir de los datos obtenidos podemos concluir que se muestran diferencias entre grupos en la expresión de AAA, siendo la principal la disminución en la amplitud presentada en el grupo de ratones obesos .

Objetivos particulares

- Durante la RA, la amplitud de la AAA es menor en el grupo de ratones obesos, durante el pulso de alimento la actividad locomotriz es menor para el grupo de ratones delgados.
- En ayuno, la actividad total en el grupo de ratones delgados es mayor a la que presentaban durante la RA, es notable un aumento en la amplitud de la AAA. La actividad total en el grupo obesos no difiere a la registrada durante la RA, cabe resaltar que la actividad que se presentaba durante y después del pulso en condiciones de RA persiste durante la privación de alimento.
- Durante condiciones de alimentación *ad libitum*, los ratones obesos consumen más alimento que los delgados. Durante la restricción los ratones obesos mostraron un menor consumo que el registrado para el grupo de ratones delgados.

REFERENCIAS

- Arble D. M., Bass J., Laposky A. D., Vitaterna M. H. y Turek F. W. (2009). "Circadian timing of food intake contributes to weightgain" *Obesity*. 17(11), pp.2100–2102.
- Bass J. y Takahashi J. S. (2010). "Circadian integration of metabolism and energetics" *Science*. 330(6009), pp.1349–1354.
- Banks W. A. y Farrell C. L. (2003). "Impaired transport of leptin across the blood-brain barrier in obesity is acquired and reversible" *American Journal of Physiology*. 285, pp.E10–E15.
- Banks W. A., Coon A. B., Robinson S. M., Moinuddin A., Shultz J. M., Nakaoke R. y Morley J. E. (2004). "Triglycerides induce leptin resistance at the blood-brain barrier" *Diabetes*. 53(5), pp.1253–1260.
- Báez-Ruiz A., Luna-Moreno D., Carmona-Castro A., Cárdenas-Vázquez R., Díaz-Muñoz M., Carmona-Alcocer V., Fuentes-Granados C. y Miranda-Anaya M. (2013). "Hypothalamic expression of anorexigenic and orexigenic hormone receptors in obese females *Neotomodon alstoni*: Effect of fasting" *Nutritional Neuroscience*. en prensa.
- Bernardis L. L., Luboshitsky R., Bellinger L. L. y McEwen G. (1982). "Nutritional studies in the weanling rat with normophagic hypothalamic obesity" *The Journal of nutrition*. 112(7), pp.1441–55.
- Carmona-Alcocer V., Fuentes-Granados C., Carmona-Castro A., Aguilar-González I., Cárdenas-Vázquez R. y Miranda-Anaya, M. (2012). "Obesity alters circadian behavior and metabolism in sex dependent manner in the volcano mouse *Neotomodon alstoni*" *Physiology & behavior*. 105(3), pp.727–733.

- Carmona-Alcocer V. (2012). *Variaciones en la capacidad de sincronización no paramétrica producidas por la obesidad, en el ritmo de actividad locomotriz en el ratón de los volcanes Neotomodon alstoni*. Tesis, Doctorado en Ciencias Biomédicas. UNAM. 112pp.
- Carneiro B. T. S. y Araujo J. F. (2009). “The food-entrainable oscillator: a network of interconnected brain structures entrained by humoral signals?” *Chronobiology international*. 26(7), pp.1273–1289.
- Challet E. y Mendoza J. (2010). “Metabolic and reward feeding synchronises the rhythmic brain” *Cell and tissue research*. 341(1), pp.1–11.
- Chávez Catalina B. (2005). Ratón de los volcanes. *Neotomodon alstoni*. En: *Los mamíferos silvestres de México*. Gerardo Ceballos y Gisselle Oliva. Fondo de Cultura Económica. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México.
- Comperatore C. A. y Stephan F. K. (1990). “Effects of vagotomy on entrainment of activity rhythms to food access” *Physiology & Behavior*. 47(4), pp.671–678.
- Cottrell E.C. y Mercer J.G. (2012) Leptin receptors. En: *Handbook of Experimental Pharmacology*. (209), pp.3-21.
- Davidson A.J., Cappendijk S.L. y Stephan F.K. (2000). “Feeding-entrained circadian rhythms are attenuated by lesions of the parabrachial region in rats” *American Journal of Physiology*. 278(5), pp.R1296–R1304.
- Dunlap J.C., Loros J.J. y DeCoursey P.J. (2004). *Chronobiology: Biological Timekeeping*. Sunderland, MA. Sinauer, 382pp.
- Feillet C., Ripperger J., Magnone M. C., Dulloo A., Albrecht U. y Challet E. (2006). “Lack of food anticipation in Per2 mutant mice” *Current biology*. 16(20), pp.2016–2022.

- Froy O. (2010). "Metabolism and circadian rhythms--implications for obesity" *Endocrine Reviews*. 31(1), pp.1–24.
- 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*. Tesis Maestría en Ciencias Biológicas. UNAM. 69pp.
- Green C. B., Takahashi J. S. y Bass J. (2008). "The meter of metabolism" *Cell*. 134(5), pp.728–42.
- Hall J. C. (1995). "Tripping along the trail to the molecular mechanisms of biological clocks" *Trends in Neurosciences*. 18(5), pp 230–240.
- Hastings M. H., Reddy A. B. y Maywood E. S. (2003). "A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease" *Nature reviews. Neuroscience*, 4(8), pp. 649–661.
- LeSauter J., Hoque N., Weintraub M., Pfaff D. W. y Silver R. (2009) "Stomach ghrelin-secreting cells as food-entrainable circadian clocks" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106(32), pp. 13582-13587.
- Martínez-Merlos M. T., Angeles-Castellanos M., Díaz-Muñoz M., Aguilar-Roblero R., Mendoza J. y Escobar C. (2004). "Dissociation between adipose tissue signals, behavior and the food-entrained oscillator" *The Journal of endocrinology*. 181(1), pp. 53–63.
- Mistlberger R. E. (2011). "Neurobiology of food anticipatory circadian rhythms" *Physiology & behavior*. 104(4), pp. 535-545.
- Mistlberger R. y Marchant E. (1999). "Enhanced food-anticipatory circadian rhythms in the genetically obese Zucker rat" *Physiology & behavior*. 66(2), pp.329–335.

- Morin L. P., Shivers K. Y., Blanchard J. H. y Muscat L. (2006). "Complex organization of mouse and rat suprachiasmatic nucleus" *Neuroscience*. 137(4), pp.1285–1297.
- Olaiz-Fernández G., Rivera-Dommarco J., Shamah-Levy T., Rojas R., Villalpando-Hernández S., Hernández-Avila M. y Sepúlveda-Amor J. (2006). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006*. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública.
- OMS (2011). Nota descriptiva No. 311 , Obesidad y sobrepeso En: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>, consultado el 22/11/2011.
- Pendergast J. S., Nakamura W., Friday R. C., Hatanaka F., Takumi T. y Yamazaki S. (2009). "Robust food anticipatory activity in BMAL1-deficient mice" *PLoS one*. 4(3): e4860.
- Persons J. E., Stephan F. K. y Bays M. E. (1993). "Diet-induced obesity attenuates anticipation of food access in rats" *Physiology & behavior*. 54(1), pp.55–64.
- Pittendrigh C. S. (1960). "Circadian rhythms and the circadian organization of living systems" *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 25, pp.159–184.
- Ralph M. R. (2001). Capítulo XVI, "Mammalian Clock Genetics", En: *Handbook of Behavioral Neurobiology*. vol 12, *Circadian Clocks*, J.S. Takahashi, F.W. Turek y R.Y. Moore, Kluwer Academic/Plenum, New York, pp. 433-447.
- Ramsey K. M., Marcheva B., Kohsaka A. y Bass J. (2007). "The clockwork of metabolism" *Annual Review of Nutrition*. 27, pp.219–240.
- Richter C. (1922). "A behavioristic study of the activity of the rat" *Comp. Psychol. Monogr.* 1:1–55.

- Silver R. y Balsam P. (2010). "Oscillators entrained by food and the emergence of anticipatory timing behaviors" *Sleep and Biological Rhythms*. 8(2), pp. 120–136.
- Shibata S., Tahara Y. y Hirao A. (2010). "The adjustment and manipulation of biological rhythms by light, nutrition, and abused drugs" *Advanced Drug Delivery Reviews*. 62(9-10), pp.918–927.
- Steinlechner S., Jacobmeier B., Scherbarth F., Dernbach H., Kruse F. y Albrecht U. (2002). "Robust circadian rhythmicity of Per1 and Per2 mutant mice in constant light, and dynamics of Per1 and Per2 gene expression under long and short photoperiods" *Journal of Biological Rhythms*. 17(3), pp.202–209.
- Stephan F. K. (2001). Capítulo VIII, "Food-entrainable oscillators in mammals", En: *Handbook of Behavioral Neurobiology*. vol 12, *Circadian Clocks*, J.S. Takahashi, F.W. Turek, y R.Y. Moore, Kluwer Academic/Plenum, New York, pp. 223-246.
- Stephan F. K. (2002). "The other circadian system: food as a Zeitgeber" *Journal of Biological Rhythms*. 17(4), pp.284–292.
- Willard L. Koukkari R. B. (2006). *Introducing Biological Rhythms: A Primer on the Temporal Organization of Life, with Implications for Health, Society, Reproduction, and the Natural Environment*. Sciences-New York College of Biological Sciences University of Minnesota St. Paul, MN, USA: Springer. 658pp.
- Yamazaki S., Numano R., Abe M., Hida A., Takahashi R., Ueda M., Block G.D., Sakaki Y., Menaker M. y Tei H. (2000). "Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats" *Science*. New York, N.Y., 288(5466), pp.682–685.