

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales

Diferencias asociadas a la obesidad en los ritmos diarios de actividad locomotriz,
alimentación y algunas proteínas del metabolismo lipídico hepático, en el ratón
macho *Neotomodon alstoni*

Tesis individual

Como parte de los requisitos para obtener el grado de
Licenciado en Biología

Presenta
Hugo Asael Rodríguez Guadarrama

2016



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Biología

Diferencias asociadas a la obesidad en los ritmos diarios de actividad locomotriz,
alimentación y algunas proteínas del metabolismo lipídico hepático, en el ratón
macho *Neotomodon alstoni*

Tesis Individual

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Licenciado en Biología

Presenta:

Hugo Asael Rodríguez Guadarrama

Dirigido por:

Dr. Manuel Miranda Anaya

Sinodales

Dr. Manuel Miranda Anaya
Presidente

Firma

Dr. Marco Antonio Sánchez Ramos
Secretario

Firma

Dr. Moisés Pérez Mendoza
Vocal

Firma

Dr. Nicolás Ramos Lara
Suplente

Firma

Dr. Mauricio Díaz Muñoz
Suplente

Firma

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
2016
México

RESUMEN

El sistema de reloj circadiano en mamíferos regula y coordina los ritmos diarios de comportamientos múltiples y procesos fisiológicos, como la actividad de sueño-vigilia, la alimentación y la homeostasis metabólica de la energía. Una desregulación o desalineación interna entre la oscilación del marcapasos principal (núcleo supraquiasmático) y osciladores secundarios (tejidos periféricos) del sistema circadiano pueden llevar al desarrollo de la obesidad y el síndrome metabólico. El ratón de los volcanes *Neotomodon alstoni* en condiciones de cautiverio muestra obesidad en algunos ejemplares después de los 6 meses de edad sin la inducción por dietas hipercalóricas. El objetivo de este estudio fue determinar si el estado de obesidad en ratones machos muestra alteraciones en los ritmos diarios de actividad locomotriz y alimentación en fotoperiodos natural y artificial (Luz-Oscuridad 12:12), y el perfil diario de expresión de algunas proteínas del metabolismo lipídico en el hígado, como PPAR α , PPAR γ , PGC-1 α , CPT1 y SREBP-1c, las cuales se relacionan con la Proteína Reloj circadiana BMAL1. Los resultados indicaron que no existe una diferencia significativa entre ambos fotoperiodos en los ratones obesos. El perfil diario de actividad locomotriz de los obesos mostró una reducción (cerca de 80%) durante la noche y un aumento (más de 200%) durante el día, el cual se correlaciona con un aumento del consumo de alimento. En los obesos, existió una reducción del ritmo de expresión de BMAL1 (cerca de 30%), diferencias de amplitud de la expresión de PGC-1 α y una desalineación circadiana de los ritmos de expresión de PPAR α y SREBP-1c en el hígado, con respecto a ratones delgados. Sin embargo, no se encontraron diferencias en CPT1 y PPAR γ . En conclusión, se sugiere que existe una atenuación entre la función del sistema circadiano central y el hígado en los ratones obesos. Las desalineaciones circadianas de PPAR α (catabolismo de lípidos) y SREBP-1c (síntesis de lípidos) pueden deberse al desplazo del tiempo de alimentación y, en conjunto con la hipoactividad nocturna, pueden propiciar el estado de obesidad en *Neotomodon alstoni*.

Palabras clave: Desalineación circadiana, *Neotomodon alstoni*, metabolismo lipídico hepático, obesidad, ritmos diarios.

SUMMARY

The mammalian circadian clock (suprachiasmatic nucleus) regulates and coordinates the daily rhythms of multiple behavioral and physiological processes, such as sleep-wake activity, nutrition and metabolic energy homeostasis. Deregulation or internal misalignment between the main circadian pacemaker and secondary circadian oscillators (peripheral tissues) may be related to the development of obesity and metabolic syndrome. The mouse *Neotomodon alstoni* in captivity shows obesity in some individuals after 6 months of age, without induction by higher caloric diets. This study aimed to determine whether the state of obesity in male mice show alterations in the daily rhythms of locomotor activity and food in natural and artificial photoperiod (light-dark 12:12), and the daily profile of expression of some proteins involved in hepatic lipid metabolism as PPAR α , PPAR γ , PGC-1 α , CPT1 and SREBP-1c, which are also related to circadian clock protein, BMAL1. The results indicated no significant difference between photoperiods in obese mice. The daily locomotor activity profile of obese showed a reduction (about 80 %) overnight and an increase (more than 200 %) during the daytime, which correlates with an increase in food consumption. In obese, there was a reduction in the rate of expression of BMAL1 (about 30 %), amplitude differences in the expression of PGC-1 α and circadian misalignment of the rhythms of expression of PPAR α and SREBP-1c in the liver, compared to lean mice. However, no differences were found CPT1 and PPAR γ . In conclusion, it is suggested that there is attenuation between the role of the central circadian system and liver in obese mice. PPAR α circadian misalignment (lipid catabolism) and SREBP-1c (lipid synthesis) may be due to the shifted time of feeding and together with night hypoactivity, can lead the state of obesity in *Neotomodon alstoni*.

Key words: Circadian misalignment, daily rhythms, lipid metabolism in liver, *Neotomodon alstoni*, obesity.

DEDICATORIAS

Ésta tesis está dedica a mi querida familia.

A mis ambos padres, de los cuales me siento muy orgulloso de ser su hijo. A mi mamá Ma. del Carmen Guadarrama Elías, que siempre me apoyo con todo cariño y esfuerzo en mis estudios y mi salud a lo largo de mi vida. A mi papá Víctor Hugo Rodríguez Olvera, que siempre me enseñó a ver la vida como un reto y a luchar por mis sueños, y de quién me he inspirado para seguir estudiando y aprendiendo más cada día. A mi hermana Laura Edith Rodríguez Guadarrama, quién ha sido mi amiga de confianza y he compartido muchos momentos en los que reír y sonreír son los factores más importantes.

También, ésta tesis se la dedico a mi director de tesis, Manuel Miranda Anaya, quién es una persona con gran carisma y me dio la oportunidad de llevar a cabo este trabajo, además de brindarme su amistad y apoyo académico.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a parte del proyecto PAPIIT-UNAM IN212715 por el apoyo otorgado para realizar esta tesis.

A mi director, el Dr. Manuel Miranda Anaya, por dirigirme en el desarrollo de la tesis y enseñarme nuevos conocimientos en la materia de cronobiología.

A todos mis asesores por aceptar revisar mi tesis y sus comentarios al respecto, los cuales me ayudaron a fortalecer mi conocimiento y tener una mente más constructiva.

A mi compañero de laboratorio y asesor, el Dr. Moisés Mendoza Pérez, quién me ayudó a mejorar mi técnica en *Western Blot*, en la presentación de mis datos y discusión de resultados.

A mis profesores de la licenciatura en Biología, quienes me ayudaron a formarme como futuro biólogo a lo largo de toda esta carrera. En particular, al Doctor y Profesor Marco Antonio Sánchez Ramos, de quién aprendí mucho sobre temas en relación a la fisiología, comportamiento y evolución, y me inspiró a conocer esta línea de investigación.

A mis padres, a mi hermana y todo el resto de mi familia (primos, tíos y abuelos) que han hecho de mi vida una gran experiencia, llena de cultura, valores morales, responsabilidad y dedicación al estudio y al trabajo.

También, agradezco a mis compañeros y amigos de mi generación de la Licenciatura en Biología 2010, por los buenos momentos, y por compartir sus conocimientos y perspectivas acerca de la vida.

Contenido:

Antecedentes	1
- Capítulo I. Generalidades de los ritmos circadianos.....	1
- Capítulo II. Organización del sistema circadiano en vertebrados: Marcapasos principal y osciladores periféricos	3
- Capítulo III. Maquinaria molecular del reloj circadiano	5
- Capítulo IV. Metabolismo hepático de los lípidos	7
- Capítulo V. Vínculo entre el reloj circadiano y la homeostasis lipídica	14
- Capítulo VI. Desincronización del reloj interno	16
- Capítulo VII. La obesidad y el ratón de los volcanes <i>Neotomodon alstoni</i> como modelo	17
Hipótesis	20
Objetivos	20
Métodos	21
- Animales y mantenimiento.....	21
- Registro de ritmos de actividad locomotriz deambulatoria y de consumo de alimento	21
- Análisis de proteínas de hígado por Western Blot (W. B.).....	22
- Análisis estadísticos	24
Resultados	25
- Ritmos diarios de actividad locomotriz deambulatoria y de alimentación ..	25
- Ritmos de expresión de la Proteína Reloj BMAL1 y de las proteínas relacionadas al metabolismo lipídico en el hígado	31
- Relación de los ritmos de la actividad locomotriz, de alimentación y de la expresión de las proteínas en el hígado de <i>Neotomodon alstoni</i>	41
Discusión	44

- Ritmos diarios de actividad locomotriz deambulatoria y de alimentación ...44
- Ritmos de expresión de la Proteína Reloj BMAL1 y de las proteínas relacionadas al metabolismo lipídico en el hígado47
- Relación de los ritmos de la actividad locomotriz, de alimentación y de la expresión de las proteínas en el hígado de *Neotomodon alstoni*50

Conclusiones y perspectivas55

Bibliografía.....57

Índice de figuras:

Figura 1. Parámetros relacionados a un ritmo circadiano	2
Figura 2. Mecanismo molecular del reloj circadiano en mamíferos	6
Figura 3. Mecanismo molecular de las proteínas receptoras de proliferadoras de peroxisomas en el hígado: PPAR α y PPAR γ	9
Figura 4. Mecanismo molecular de la activación de la proteína SREBP-1c	11
Figura 5. Mecanismo molecular de la coactivación de PGC-1 α	13
Figura 6. Mecanismo molecular del reloj circadiano y algunas proteínas del metabolismo lipídico en el hígado	16
Figura 7. Ritmos diarios de actividad locomotriz deambulatoria y consumo de alimento en fotoperiodo natural	27
Figura 8. Ritmos diarios de actividad locomotriz deambulatoria y consumo de alimento en fotoperiodo artificial (LO 12:12).....	28
Figura 9. Área bajo la curva de la actividad locomotriz y consumo de alimento en 24 h	29
Figura 10. Actividad locomotriz y consumo de alimento total en fase diurna y nocturna	30
Figura 11. Ritmo diario de expresión de la Proteína Reloj BMAL1 en hígado	33
Figura 12. Ritmo de expresión de la proteína del catabolismo lipídico PGC-1 α en hígado	34
Figura 13. Ritmo de expresión de la proteína del catabolismo lipídico PPAR α en hígado	35
Figura 14. Ritmo de expresión de la proteína del catabolismo lipídico CPT1 en hígado	36

Figura 15. Ritmo de expresión de la proteína del metabolismo lipídico SREBP-1c en hígado	38
Figura 16. Ritmo de expresión de la proteína del metabolismo lipídico PPAR γ en hígado	39
Figura 17. Correlación de los perfiles diarios de la expresión de las proteínas PPAR α y PGC-1 α en ratones delgados	40
Figura 18. Correlación de los perfiles diarios de la expresión de las proteínas PPAR α y PGC-1 α en ratones obesos	41
Figura 19. Resumen de los ritmos diarios de la actividad locomotriz, alimentación y proteínas del metabolismo lipídico en hígado.....	42
Figura 20. El ratón macho de los volcanes <i>Neotomodon alstoni</i>	56

Índice de cuadros:

Cuadro 1. Análisis estadísticos de ANOVA de dos vías y t-student entre ratones delgados y obesos26

Cuadro 2. Análisis estadísticos de la expresión de las proteínas pico-valle de ratones delgados y obesos.....31

Cuadro 3. Análisis estadístico de ANOVA de dos vías entre ratones delgados y obesos.....32

Antecedentes

Capítulo I. Generalidades de los ritmos circadianos.

La mayoría de los sistemas vivos en sus hábitats están sujetos a las fluctuaciones de la luz solar y temperatura como una consecuencia de la rotación de la Tierra en un tiempo aproximado de 24 h. Por lo que un rango amplio y diverso de especies, desde bacterias hasta seres humanos, presentan cambios rítmicos asociados a un oscilador biológico endógeno muy conservado a través de la evolución (Kuhlman et al. 2007). Este oscilador funciona como reloj y representa una ventaja adaptativa ante los cambios periódicos del ambiente, facilitando la anticipación y la regulación de los procesos fisiológicos o biológicos en el tiempo, que van desde la fotosíntesis en plantas hasta el ciclo de sueño-vigilia en mamíferos (Takahashi et al. 2008a; Mohawk et al. 2012). Los ritmos biológicos más estudiados son los ritmos circadianos (Latín: *circa* = “cerca a”; *dies* = “día”) y hasta la fecha pueden ser analizados como un sistema integral que inicia con mecanismos oscilatorios moleculares en la expresión de genes hasta respuestas fisiológicas y conductuales circadianas (Mohawk et al. 2012; Aguilar-Roblero et al. 2015).

En cronobiología, los principales parámetros cuantificados en un ritmo son los que se indican en la **Fig. 1**. El periodo de un ritmo es definido como la frecuencia ocurrida en un evento dentro de un mismo rango de tiempo o ciclo completo y, en este caso, el periodo del ritmo circadiano es cercano a las 24 h. La amplitud del ritmo se define como el cambio en la intensidad de la variable oscilatoria desde el valor más alto (llamado pico o acrofase) a su valor más bajo (llamado valle o batifase). La acrofase representa el máximo pico en el que un ritmo ocurre y puede variar de ciclo a ciclo. La fase del ritmo se refiere al tiempo en el que cualquier valor particular del ciclo ocurre, por ejemplo: la fase de inicio de actividad locomotriz o la fase de inicio del sueño del ciclo de sueño-vigilia de los animales. Por último, la diferencia de tiempo entre dos oscilaciones es conocido como una

relación de fase entre osciladores, por ejemplo: la relación que existe entre la fase de alimentación y el inicio de la actividad locomotriz (Aguilar-Roblero et al. 2015).

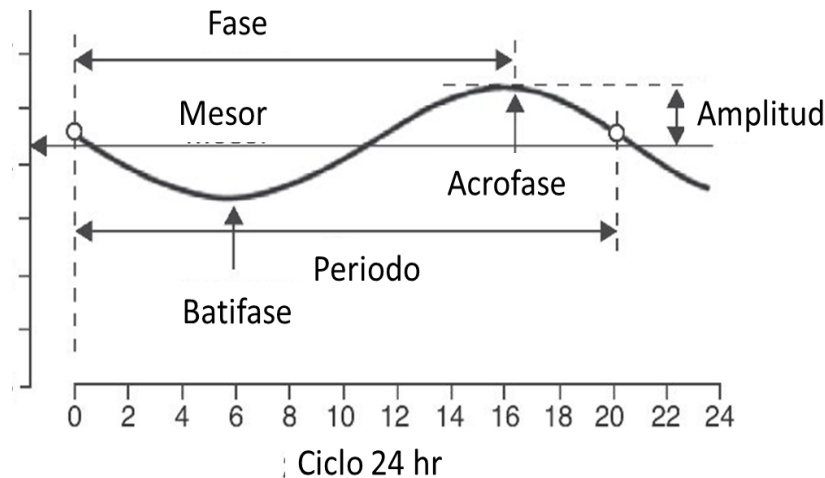


Figura 1. Parámetros relacionados a un ritmo circadiano. Figura modificada de (Vargas et al. 2012).

Los ritmos circadianos presentan tres características principales: 1) son producidos por procesos endógenos en los organismos, llamados relojes circadianos, y por lo tanto generan y controlan oscilaciones de procesos bioquímicos, fisiológicos y conductuales en ausencia de ciclos ambientales. 2) En condiciones naturales, los ritmos circadianos están alineados con los ciclos del medio ambiente, llamados 'dadores de tiempo' o *Zeitgebers* (ZT, por sus siglas en alemán), como luz-oscuridad, temperatura, disponibilidad de alimento y señales sociales o biológicas. Este proceso recibe el nombre de sincronización, y ambos ciclos, endógeno y externo, pueden tener periodos circadianos similares. 3) La regulación del reloj circadiano compensa los cambios de temperatura, de tal manera que el periodo endógeno del ritmo circadiano no es afectado por las diferentes temperaturas en el rango fisiológico, como suelen ocurrir en los procesos fisicoquímicos; así cada ciclo circadiano puede completarse sin cambios

drásticos de periodo. (Pittendrigh 1993; Lowrey y Takahashi 2011; Aguilar-Roblero et al. 2015).

La sensibilidad del reloj circadiano interno es variable a lo largo del ciclo diario y estacionalidad del ambiente, tanto en animales diurnos como nocturnos. Un desplazamiento de retraso o avance de fase de la oscilación circadiana, referido como una curva de respuesta de fase (PRC, por sus siglas en inglés), depende de las señales externas (fotoperiodo, disponibilidad de alimento, químicas, hormonales u otras señales biológicas) y es una respuesta adaptativa para ajustar nuevamente el reloj biológico a las condiciones biológicas o ambientales (Aschoff 1965; Kuhlman et al. 2007; Aguilar-Roblero et al. 2015). Es importante señalar además que la exposición a una señal externa inespecífica puede perturbar la respuesta biológica, como la conducta de actividad locomotriz, sin mostrar un efecto en la fase del ritmo. Tal efecto es un enmascaramiento, donde la señal ambiental mecánicamente actúa a través de vías sensoriales en un comportamiento específico del animal, independiente de alterar la fase del reloj biológico (Kuhlman et al. 2007).

Capítulo II. Organización del sistema circadiano en mamíferos: Marcapasos principal y osciladores periféricos.

En todos los modelos animales, el comportamiento circadiano puede ser analizado como el resultado de un sistema integrado de osciladores circadianos a través del cuerpo del organismo. Sin embargo, existe una jerarquía entre osciladores donde existen estructuras que tienen función de marcapasos circadiano, conocido como reloj dominante o maestro (Dibner et al. 2010). Las oscilaciones de este marcapasos son producidas en células autónomas que pueden responder diferencialmente a señales de su ambiente, pero debido a que existe un eficiente sistema de acoplamiento pueden sincronizarse entre ellas y controlar diferentes salidas fisiológicas, además de imponer periodo y fase a osciladores secundarios u otras funciones del organismo (Hoggenesch y Ueda 2011).

En mamíferos, el principal marcapasos circadiano es el núcleo supraquiasmático (SCN, por sus siglas en inglés) localizado en el hipotálamo, el cual regula ritmos conductuales, como la actividad locomotriz ambulatoria, y se sincroniza mediante información lumínica (fótica) transducida desde la retina. Las redes neuronales del SCN funcionan de manera conjunta, coherente, lábil y plástica, sincronizando y reforzando sus oscilaciones, de forma que pueda incrementar su robustez ante la presencia de perturbaciones genéticas o señales erráticas de luz (Yamaguchi et al. 2003; Welsh et al. 2010; Mohawk et al. 2012). Asimismo, las oscilaciones circadianas y los Genes Reloj, los cuales regulan el circuito molecular del sistema circadiano, existen en todas las células de órganos como hígado, riñón, corazón, páncreas, musculo esquelético, intestino y tejido adiposo (Green et al. 2008). Estos tejidos diferentes al SCN son conocidos en cronobiología como osciladores periféricos, y la fase del ciclo (acrofase) puede responder a temperatura y a señales químicas u hormonales del cuerpo, como por ejemplo, cambios en los niveles de glucocorticoides secretados por la corteza adrenal (Balsalobre 2000) o disponibilidad de alimento y energía (Dibner et al. 2010).

El ciclo diario de alimentación se ha considerado como un ZT importante en el hígado, riñón, páncreas y corazón (Yamazaki 2000). No obstante, a pesar de la influencia de señales externas, el SCN tiene el papel de mantener el control interno, ya que sus vías de salida neuroendocrina sirven principalmente como vías de sincronización de fases entre los tejidos periféricos (Dibner et al. 2010; Mohawk et al. 2012). El marcapasos central responde a los sincronizadores ambientales, como la luz, e integra los cambios de fase más rápidamente que los relojes periféricos, los cuales no integran señales fóticas; y aunque la abolición de la función del SCN no impide la expresión de los ritmos circadianos a nivel del tejido periférico, si puede causar desincronización interna (Yoo et al. 2004). No obstante, el SCN también puede recibir vías de entrada no fóticas, como señales humorales (receptores de andrógenos) (Iwahana et al. 2008) y vías indirectas de disponibilidad de alimento e información metabólica (Saderi et al. 2013). De esta manera, la organización del sistema circadiano requiere de la combinación de la inervación autónoma del marcapasos principal hacia los osciladores periféricos y

viceversa, con la ayuda de señales endocrinas y locales y de la temperatura, dando así una comunicación constante entre los osciladores periféricos y el marcapasos central, que permitirá el correcto acoplamiento de las funciones fisiológicas y metabólicas diarias del organismo (Mohawk et al. 2012).

Capítulo III. Maquinaria molecular del reloj circadiano en mamíferos.

El mecanismo del reloj circadiano de mamíferos es autónomo y una oscilación circadiana surge de una autorregulación por retroalimentación negativa de una red transcripcional/traducciona de por lo menos diez genes y sus proteínas (**Fig. 2**) (Kramer y Merrow 2013). Algunos de estos son activadores: los genes de ciclos circadianos de actividad locomotriz (*clock*, por sus siglas en inglés) y proteína 1 tipo ARNT de músculo y cerebro (*bmal1*, por sus siglas en inglés) cuyas proteínas CLOCK-BMAL1 dimerizan en el citoplasma mediante procesos de fosforilación para translocarse al núcleo y regulan positivamente la expresión de otros genes, como periodo 1 y 2 (*per1* y *per2*, por sus siglas en inglés) y criptocromo 1 y 2 (*cry1* y *cry2*, por sus siglas en inglés) a través del enlace a elementos específicos de ADN y cajas E de las secuencias promotoras. Cuando las proteínas PER y CRY se acumulan en el citoplasma, se dimerizan y translocan al núcleo de la célula, reprimiendo así la transcripción de los genes *clock* y *bmal1*. La degradación de PER y CRY en el complejo del proteosoma 26S es requerida para terminar la fase de represión mediante la regulación por proteínas Skp1-Cullin-F-Box (SCF, por sus siglas en inglés) y quinasas activadas por adenosín monofosfato (AMPK, por sus siglas en inglés), con el fin de llevar a cabo un nuevo ciclo de transcripción. En este circuito molecular se encuentran los genes *rev-erb's* alfa y beta y los receptores huérfanos relacionados a ácido retinoico alfa y beta (*ror's*, por sus siglas en inglés), que al traducirse causan oscilación de antifase de BMAL1 al impedir la expresión del gen *bmal1* (Lowrey y Takahashi 2004; Mohawk et al. 2012; Kramer y Merrow 2013). Además, esta interacción de los Genes Reloj es modulada por diversos factores como: modificaciones postranscripcionales, donde participan los microRNAs, y/o postraduccionales, que incluyen procesos de

fosforilación-desfosforilación, acetilación, metilación y ubiquitinación, de tal forma que el asa completa del reloj molecular tiene una duración de cerca de las 24 horas del día (Lowrey y Takahashi 2011).

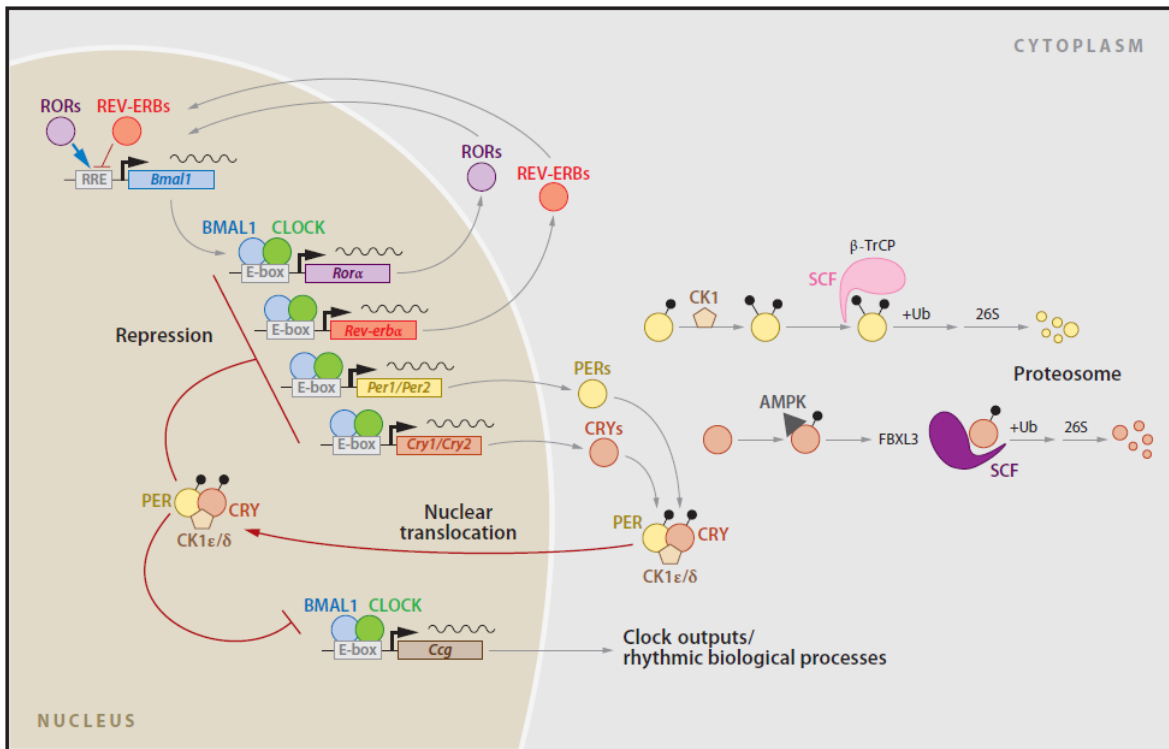


Figura 2. Mecanismo molecular del reloj circadiano en mamíferos. BMAL1 (*brain and muscle ARNT-like protein 1*), CLOCK (*circadian locomotor output cycles kaput*), PER (*period*), CRY (*cryptochrome*), ROR (*retinoid-related orphan receptor*), REV-ERBs, SCF (*skp1-cullin-F-box*), AMPK (*adenosine monophosphate-activated protein kinase*), FBXL3 (*F-box and leucine-rich repeat protein 3*), CK1 (*casein kinase 1*), β-TrCP (*beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin*) y CCG (*clock-controlled genes*; Mohawk et al. 2012).

Por otro lado, los relojes circadianos en general ejercen un amplio control sobre varios procesos fisiológicos a través de la regulación de los llamados Genes Controlados por el Reloj (CCG, por sus siglas en inglés), que son genes regulados de manera circadiana por algunas de las proteínas del asa de regulación del reloj circadiano (*bmal1*, *clock* y *rev-erba*). Un ejemplo es el control sobre procesos

metabólicos como la regulación de la glucosa y la lipogénesis, donde los Genes Reloj actúan como 'engranajes' para el movimiento rítmico de familias de genes metabólicos, los cuales poseen su propia fase para funciones y tejidos específicos. Este control circadiano del metabolismo ocurre tanto a nivel del SCN como a nivel de tejidos periféricos (Green et al. 2008; Lamia et al. 2008; Le Martelot et al. 2009; Mohawk et al. 2012; Chen y Yang 2014).

Capítulo IV. Metabolismo hepático de los lípidos

El hígado es un órgano esencial en el metabolismo de los ácidos grasos y su regulación en el organismo: por un lado, la esterificación de ácidos grasos en triacilglicéridos y su transporte en lipoproteínas principalmente para su almacenamiento en el tejido adiposo; y por otro lado, cuando hay niveles altos de ácidos grasos, la vía oxidativa lleva a la producción de energía en el hígado y secreción de cuerpos cetónicos que sirven como fuente energética principalmente para el cerebro, músculo, corazón y riñones (Lemberger et al. 1996).

De los genes y proteínas involucrados en la regulación lipídica, los Receptores Activados por Proliferadores de Peroxisoma (PPARs, por sus siglas en inglés) juegan un papel muy importante. Este grupo de proteínas pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares de factores de transcripción y forman heterodímeros con el receptor X retinoide (RXR, por sus siglas en inglés; Lemberger et al. 1996). Se conocen tres isoformas en vertebrados: PPAR α , PPAR β/δ y PPAR γ , los cuales se heterodimerizan con RXR y se enlazan a elementos en respuesta a PPAR (PPRE, por sus siglas en inglés) en la región regulatoria de genes blancos, que funcionan en diversos procesos tales como metabolismo de lípidos, adipogénesis, sensibilidad a insulina, respuesta inmune, diferenciación y crecimiento celular (Chen y Yang 2014). La activación de los PPARs está dada por sus ligandos: los ácidos grasos y los eicosanoides (moléculas lipídicas originadas de la oxidación de ácidos grasos de 20 carbonos) circulantes en la célula (Gervois et al. 2000; Sandoval et al. 2009).

El PPAR α es un factor involucrado en el catabolismo de lípidos y regula la transcripción de enzimas implicadas en la conversión de ácidos grasos a ésteres acil-coenzima A y su entrada en la mitocondria y en el peroxisoma. Este receptor es activado por ácidos grasos saturados e insaturados y por los eicosanoides leucotrieno B₄ y ácidos hidroxieicosatetraenoicos (8-HETE, por sus siglas en inglés). El PPAR α también regula la expresión de lipoproteínas lipasas, encargadas de la hidrólisis de triacilglicéridos transportados por quilomicrones y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, por sus siglas en inglés). Es principalmente expresado en tejidos que presentan altas tasas de β -oxidación durante el estrés del ayuno, tales como hígado, riñón, corazón y músculo; y su activación puede prevenir y disminuir la fuente de lípidos hepáticos (esteatosis hepática) y su inflamación. Sin embargo, también puede participar en otras vías metabólicas que incluye gluconeogénesis, biotransformación, metabolismo del colesterol y regulación de genes pro-inflamatorios (Gervois et al. 2000; Stienstra et al. 2007; Varga et al. 2011).

En el hígado, cuando las reservas de glucógeno son significativamente reducidas en el hígado durante el ayuno, el PPAR α regula a nivel transcripcional varias acil-coenzimas sintetasas (ACS, por sus siglas en inglés) que permiten activar a los ácidos grasos en acil-CoA tioésteres para la β -oxidación peroxisomal. El flujo de ácidos grasos de cadenas largas y medianas también se realiza dentro de la mitocondria pero es controlado por un sistema de transporte facilitado dependiente de carnitina, cuyo componente crucial es la proteína transferasa I de palmitoil carnitina (CPT1, por sus siglas en inglés), el cual también es blanco de PPAR α (Bennett y Santani 2013; **Fig. 3**). Adicionalmente, PPAR α puede regular la expresión de varios genes envueltos en la lipogénesis y colesterogénesis en el hígado, como: la Proteína de Enlace a Elementos Regulatorios de Esteroles 1c (SREBP-1c por sus siglas en inglés), la ácidos grasos sintetasa (FAS, por sus siglas en inglés); y la hidroximetilglutaril-coenzima A reductasa (HMG-CoA R, por sus siglas en inglés; Gibbons et al. 2002).

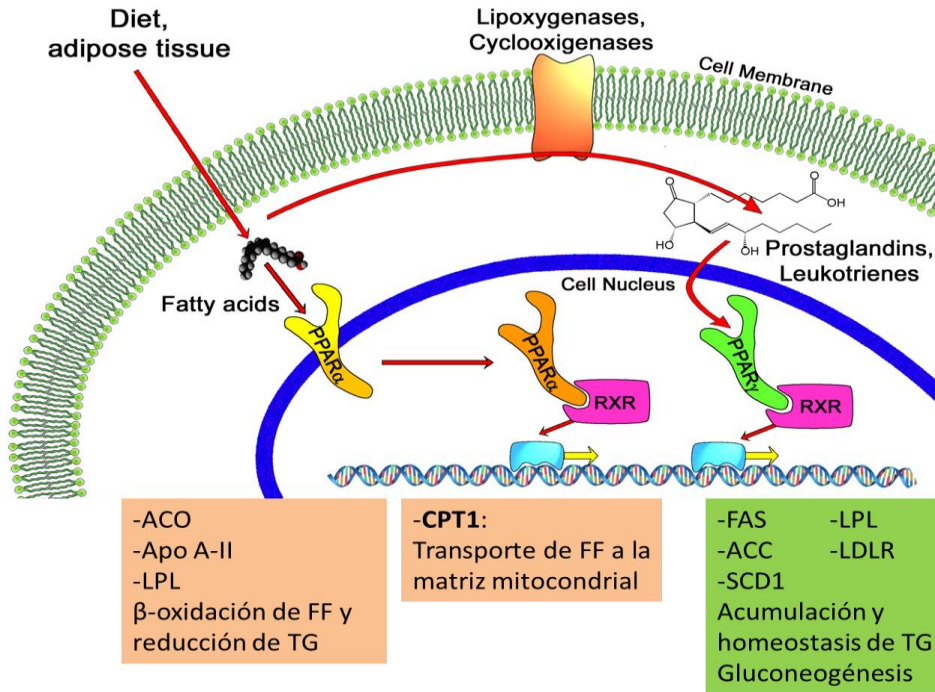


Figura 3. Mecanismo molecular de las proteínas receptoras de proliferadoras de peroxisomas en el hígado: PPAR α y PPAR γ . Las proteínas CPT1 (*Carnitine Palmitoyl Transferase I*), ACO (*Acyl-CoA Oxidase*), APO A-II (*Apolipoprotein A-II*), LPL (*Lipoprotein Lipase*) son objetivos de PPAR α ; mientras que FAS (*Fatty Acids Synthase*), ACC (*Acetyl-CoA Carboxylase*), LDLR (*Low-Density Lipoprotein Receptor*) y SCD1 (*Stearoyl-CoA Desaturase 1*) son blancos de PPAR γ . FF (*Fatty Acids*), TG (*Triacylglycerids*). Figura modificada de Somoza, M, 2006.

El PPAR γ es considerado el regulador maestro de la adipogénesis y es mayormente expresado en el tejido adiposo, aunque existen niveles moderados en otros tejidos, como músculo esquelético, páncreas, linfocitos, colon, pulmones e hígado. Al menos dos isoformas de PPAR γ son conocidas: PPAR γ 1, expresado en un bajo nivel en tejidos no adiposos, y PPAR γ 2, el cual es específico de tejido adiposo (Stienstra et al. 2007); aunque ha sido detectado en el hígado durante el desarrollo temprano en ratón (Abbott 2009). Los ácidos grasos no saturados, los eicosanoides como desoxiprostaglandinas J12 (15D-PGJ2, por sus siglas en inglés), 15-HETE y componentes de lipoproteínas de baja densidad oxidadas

(oxLDLs, por sus siglas en inglés) sirven de agonistas endógenos para la activación de PPAR γ y sus genes blanco participan en la diferenciación de adipocitos, en el almacenamiento de lípidos y metabolismo de la glucosa (Lemberger et al. 1996; Lehrke y Lazar 2005; Stienstra et al. 2007). En el hígado, PPAR γ está implicado en la homeóstasis de triacilglicéridos y, aunque puede contribuir a la esteatosis hepática, regula la expresión de genes lipogénicos como FAS, acetil-coenzima A carboxilasa (ACC, por sus siglas en inglés) y estearoil-coenzima A desaturasa (SCD1, por sus siglas en inglés), que participan en la síntesis de ácidos grasos y su esterificación, y receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDLR, por sus siglas en inglés; **Fig. 3**). Este último, puede proteger a otros tejidos de la acumulación de triacilglicéridos y de la resistencia de insulina, ya que mejora la captura de lípidos circulantes del plasma en el hígado. Además, PPAR γ participa en la regulación de la expresión de genes proinflamatorios. (Gavrilova et al. 2003; Stienstra et al. 2007; Varga et al. 2011).

La producción de ácidos grasos y de colesterol en el hígado está determinada por las actividades de ACC y la HMG-CoA R, respectivamente. A corto plazo, la regulación ocurre por un mecanismo dependiente de AMP; pero a largo plazo, los cambios coordinados en la cantidad de enzimas son facilitados por el control de la expresión de genes en un mecanismo que implica a las Proteínas de Enlace a Elementos Regulatorios de Esteroles (SREBPs, por sus siglas en inglés; Gibbons et al. 2002). Los SREBPs pertenecen a la familia de factores de transcripción de enlace a membrana bHLH-LZ y se encuentran ancladas al retículo endoplasmático en un complejo (SCAP)-INSIG-SREBP, en el cual la proteína activadora de SREBP (SCAP, por sus siglas en inglés) y el gen 2 inducido por insulina (INSIG-2, por sus siglas en inglés) son reguladas por la disponibilidad de oxisterol (derivados oxidados de colesterol) y colesterol o insulina, respectivamente. (Shimomura et al. 1997; Eberlé et al. 2004; Le Martelot et al. 2009; **Fig. 4**).

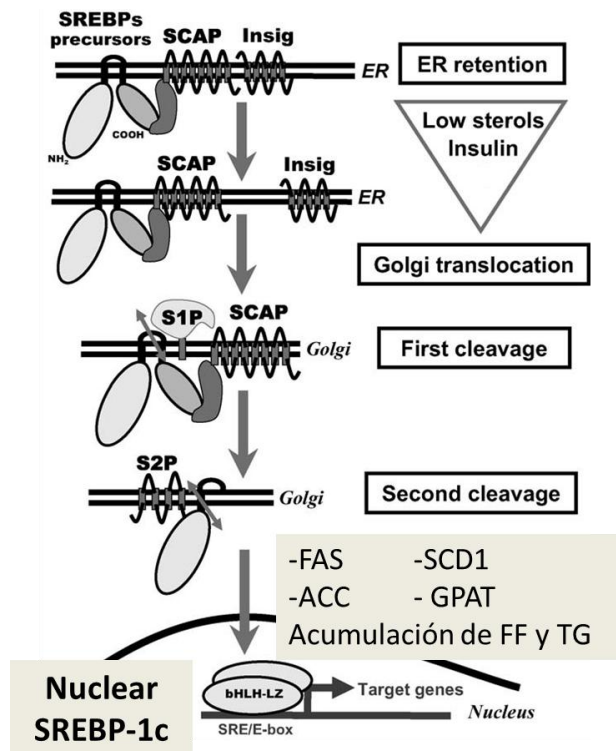


Figura 4. Mecanismo molecular de la activación de la proteína SREBP-1c. FAS (*Fatty Acids Synthase*), ACC (*Acetyl-CoA Carboxilase*), SCD1 (*Stearoyl-CoA Desaturase 1*) y GPAT (*Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase*) son blancos de SREBP-1c para la síntesis de ácidos grasos (FF) en el hígado y acumulación de triacilglicéridos (TG) para su exportación hacia otros tejidos. Modificada de (Eberlé et al. 2004).

Se conocen tres isoformas de estas proteínas en mamíferos: SREBP-1a, -1c y -2. La proteína SREBP-2 controla los genes relacionados en la síntesis de colesterol; mientras que SREBP-1c está implicado en la síntesis de ácidos grasos y triacilglicéridos, por medio de la transcripción de los genes que codifican para FAS, ACC, SCD1 y aciltransferasa de glicerol 3 fosfato (GPAT, por sus siglas en inglés), además de la glucoquinasa (GK, por sus siglas en inglés) implicada en la vía de la gluconeogénesis; y SREBP-1a participa en ambas vías (Horton et al. 2002). SREBP-1c es predominantemente expresada en el hígado, tejido adiposo blanco, músculo esquelético, glándula adrenal y cerebro; y, a diferencia de las otras isoformas, su actividad lipogénica es modulada por la insulina al liberar el

complejo SCAP-SREBP-1c por inhibición de la proteína INSIG-2 y por fosforilación de vesículas COPII para su transporte y maduración al Golgi (Eberlé et al. 2004; Yellaturu et al. 2009). La regulación transcripcional del gen *Srebp-1c* en el hígado, también está dada por la insulina y por el receptor alfa X de hígado (LXR α , por sus siglas en inglés), el cual es activado por oxiesteroles (Dif et al. 2006). Por otra parte, la regulación transcripcional de las proteínas INSIG-1/2 está dada por PPAR γ , el cual puede a su vez regular el procesamiento de SREBP y acoplar la sensibilidad de insulina con la regulación de la homeostasis lipídica (Kast-Woelbern et al. 2004).

Otro factor importante en la regulación de la energía en el metabolismo es la Proteína Coactivadora alfa de PPAR γ (PGC-1 α , por sus siglas en inglés). Este pertenece a los coactivadores de la familia de PGC-1, los cuales tienen actividades enzimáticas para modificar la cromatina, reclutar la RNA polimerasa II; además de interactuar con un amplio rango de factores de transcripción involucrados en termogénesis adaptativa, biogénesis mitocondrial, metabolismo de ácidos grasos y glucosa (como los PPARs), modificaciones en el músculo esquelético y desarrollo del corazón (Lin et al. 2005). La expresión de PGC-1 α se da principalmente en tejidos con abundantes mitocondrias y metabolismo oxidativo alto, como tejido adiposo pardo, corazón y músculo esquelético, pero su expresión es baja en el tejido adiposo blanco (Puigserver et al. 1998). En el hígado, el ayuno produce un robusto incremento de PGC-1 α por activación de glucagón, catecolaminas vía estimulación de AMP cíclico (cAMP, por sus siglas en inglés) y del factor de transcripción de enlace a elementos de respuesta a cAMP (CREB, por sus siglas en inglés), AMPK y proteína de sirtuina (SirT1), donde estimula: la gluconeogénesis hepática, con la coactivación de HNF-4 α , el receptor de glucocorticoide y FOXO1 para la transcripción de fosfoenolpiruvato carboxil quinasa (PEPCK, por sus siglas en inglés) y glucosa-6-fosfatasa; y la β -oxidación de los ácidos grasos por coactivación del receptor nuclear PPAR α (Yoon et al. 2001; **Fig. 5**).

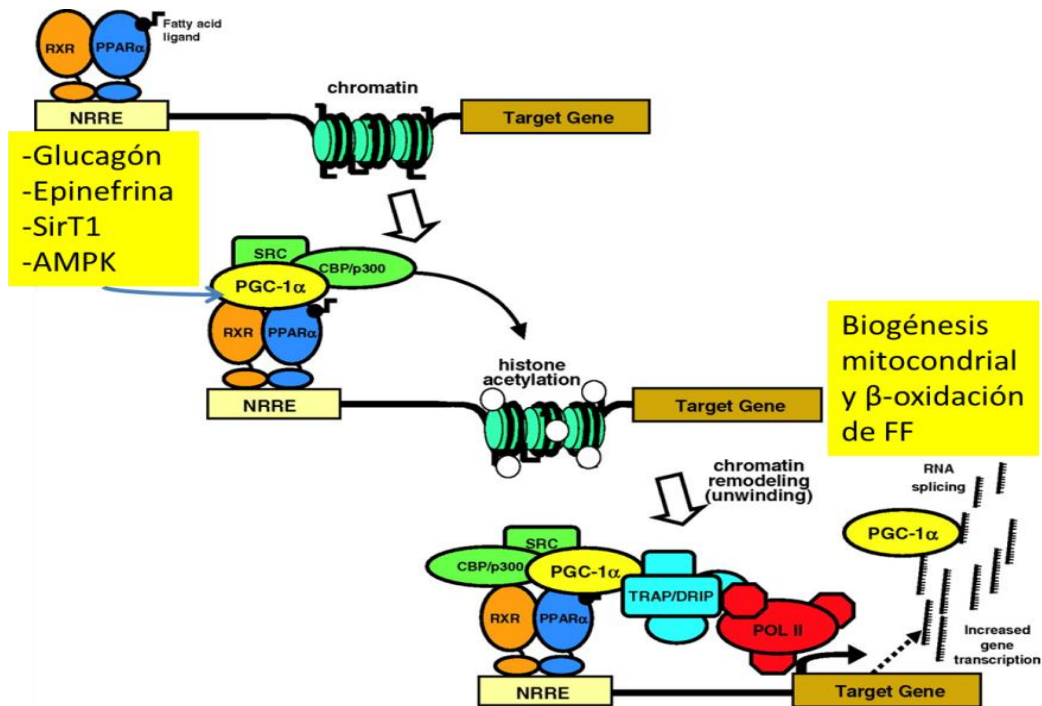


Figura 5. Mecanismo molecular de la coactivación de PGC-1 α . La vía de señalización del glucagón, epinefrina, SirT1 y AMPK activa al complejo de la proteína PGC-1 α para la transcripción de genes involucrados en la oxidación de los ácidos grasos (FF) en el hígado. Figura modificada de (Finck y Kelly, 2007).

Se ha especulado que hay un estrecho vínculo entre la función de PGC-1 α , la sensibilidad a insulina y el estado nutricional. La sobreexpresión de PGC-1 α está relacionada con una salida de glucosa hepática alta por gluconeogénesis, una hiperglucemia durante el ayuno y resistencia de insulina hepática, lo cual es característico de modelos de ratones con diabetes Tipo I y II (Koo et al. 2004). Sin embargo, también la sobreexpresión de esta proteína puede proveer una fuente de energía a otros tejidos en situaciones de estrés, como al músculo esquelético (Liang et al. 2009). Por otra parte, las deficiencias de PGC-1 α y PGC-1 β , las cuales tienen funciones no redundantes, puede llevar al desarrollo de la esteatosis hepática en ratón, debido a la combinación de una reducida capacidad de respiración mitocondrial y a un incremento de la expresión de los genes lipogénicos (Leone et al. 2005; Sonoda et al. 2007).

Capítulo V. Vínculo entre el reloj circadiano y la homeostasis lipídica.

La expresión de PPAR α tiene un ritmo diurno en el hígado, corazón, riñón y, en menor grado, en el SCN de ratón. Se ha demostrado que uno de los genes blanco de las proteínas CLOCK-BMAL-1 es el gen de *ppara* a través de la unión de su promotor rico en cajas E (**Fig. 6**). Esta proteína presenta una fuerte expresión circadiana controlada por los Genes Reloj más que los niveles de insulina y glucocorticoides, los cuales también pueden activar a este receptor nuclear (Oishi et al. 2005). Por tanto, los animales con los genes *bmal1* o *clock* suprimidos, muestran una amplitud reducida de ARN mensajero (mRNA, por sus siglas en inglés) de PPAR α en el hígado y una abolición de su oscilación circadiana. Recíprocamente, los ratones mutantes que no expresan PPAR α en tejido hepático muestran alteraciones en la oscilación de BMAL1, el cual posee elementos en respuesta a PPAR α (PPRE) en su promotor génico (Canaple et al. 2006). Así, la importancia del ritmo de expresión de PPAR α recae en el requerimiento de la oxidación de ácidos grasos durante el ayuno, donde se requiere el manejo de la fuente de energía para solventar los procesos fisiológicos diarios, así como evitar una acumulación excesiva de ácidos grasos en el hígado (Chen y Yang 2014).

Notablemente, otro receptor huérfano nuclear alfa (el gen *rev-erba*), es un gen blanco de PPAR γ por enlace a su promotor de elemento en respuesta DR-2 (Rev-DR2) (Fontaine et al. 2003). Sin embargo, todavía no hay evidencia clara que muestre que PPAR γ se manifieste de manera circadiana por la vía de la Proteína Reloj REV-ERB α , aunque existen otros factores relacionados a PPAR γ que juegan papeles importantes en el ritmo circadiano (Chen y Yang 2014).

La proteína PGC-1 α es rítmica y confiere un enlace entre el reloj circadiano con la expresión de *bmal1*, *clock* y *rev-erba* a través de la coactivación de la familia de receptores nucleares huérfanos ROR (**Fig. 6**). PGC-1 α es crítico para respuestas adaptativas al estado nutricional y metabólico, y se ha visto que su pico de expresión de la proteína durante la fase de noche temprana en hepatocitos primarios de ratón coincide con la acumulación de RNAm de *bmal1*, lo que deja claro su papel en el circuito del reloj. Sin embargo, la abundancia relativa de REV-

ERB α y la familia de ROR puede implicar un mecanismo de retroalimentación negativa para la función de PGC-1 α (Liu et al. 2007; Mohawk et al. 2012).

Además de la influencia de la actividad de realimentación a nivel transcripcional de *srebp-1c*, la regulación a nivel postraducciona de SREBP-1c es también propiciada por REV-ERB α , el cual inhibe la transcripción del gen *insig-2* y, por tanto, permite la activación funcional del complejo SCAP-SREBP-1c para la expresión de genes lipogénicos (Eberlé et al. 2004). Aunque en algunos estudios se ha visto que en ratones con *rev-erba*^{-/-} o *bmal-1*^{-/-} se puede restaurar la expresión de genes blanco de SREBP-1 mediante un ciclo de alimentación rítmico impuesto. No obstante, la presencia de la maquinaria molecular del reloj sigue siendo un factor importante en la sincronización del tiempo de la activación SREBP-1c para llevar a cabo un correcto acoplamiento del metabolismo lipídico en el hígado (Le Martelot et al. 2009; Gilardi et al. 2014; **Fig. 6**).

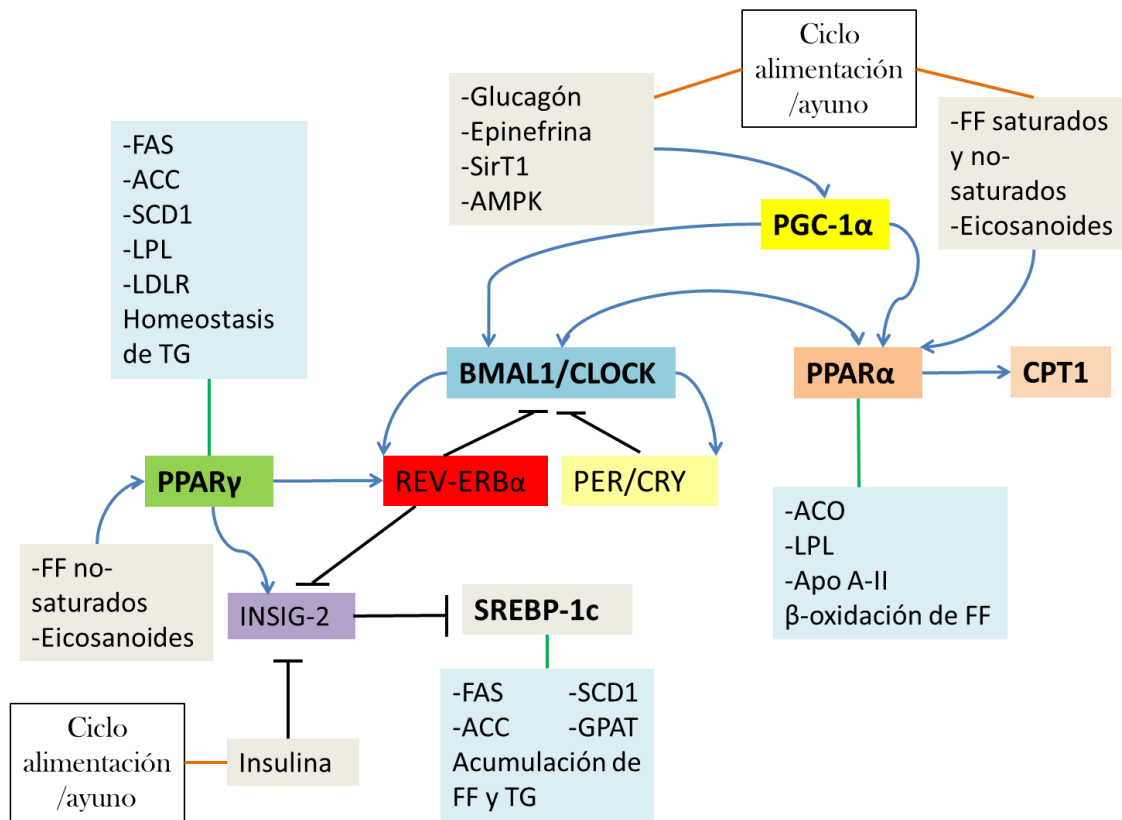


Figura 6. Mecanismo molecular del reloj circadiano y algunas proteínas del metabolismo lipídico en el hígado. Flechas azules (activación), líneas negras (inhibición). FF (*Fatty Acids*), TG (*Triglycerids*), FAS (*Fatty Acids Synthase*), ACO (*Acyl-CoA Oxidase*); ACC (*Acetil-CoA Carboxylase*), LPL (*Lipoprotein Lipase*), LDLR (*Low-Density Lipoprotein Receptor*), Apo A-II (*Apolipoprotein A-II*), SCD1 (*Stearoyl-CoA Desaturase 1*) y GPAT (*Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase*), FF (*Fatty Acids*) y TG (*Triglycerids*).

Capítulo VI. Desincronización interna del reloj circadiano

Los cambios en la frecuencia de los ZT afectan el periodo y/o la fase en la actividad del reloj circadiano, y tienen como consecuencia cambios internos, que afectan la señalización del marcapasos central y la integración de información en los osciladores periféricos. Tales conflictos llevan a una desincronización interna o cronodisrupción que a largo plazo puede vincularse con consecuencias fisiológicas vinculadas a enfermedades (Aguilar-Roblero et al. 2015). La cronodisrupción

puede tener un origen genético, como en el caso de los desórdenes de sueño en humanos; pero también puede inducirse mediante la alteración en los ciclos de alimentación y de exposición a la luz, en forma de ritmos alterados de hormonas metabólicas y reguladores del apetito, como la insulina, la grelina y la leptina (Takahashi et al. 2008b; Reid y Zee 2009; Goel et al. 2009).

La cronodisrupción puede contribuir a las manifestaciones del síndrome metabólico y complicaciones que aparecen con el desarrollo de la obesidad, como dislipidemia, intolerancia a glucosa, disfunción endotelial, hipertensión y diabetes mellitus Tipo 2. (Gómez-Abellán et al. 2012). Por ejemplo, se ha observado que ratones machos de la cepa C57BL/6J con el gen homocigoto *clock* mutado tienen una mayor actividad locomotriz durante el día y un cambio del patrón de actividad en la fase oscura, con un ritmo diurno de alimentación comparado con el ratón control. Esto está vinculado al desalineamiento entre el ciclo de alimentación y el reloj central SCN. Además, estos animales se vuelven hiperfágicos y obesos después de las seis semanas de edad, y presentan hiperleptinemia, hiperlipidemia, esteatosis hepática, hiperglucemia e hipoinsulinemia después de los seis meses de edad (Turek et al. 2005). Por otro lado, también se ha visto que una dieta alta en grasas en el ratón C57BL/6J lleva a cambios en el periodo del ritmo de actividad locomotriz y alteraciones en la expresión y ciclo de Genes Reloj circadianos, receptores nucleares y CCG implicados en la regulación energética en el hipotálamo, hígado y tejido adiposo (Kohsaka et al. 2007).

Capítulo VII. El ratón de los volcanes (*Neotomodon alstoni*) como modelo de obesidad.

La obesidad se caracteriza por un desbalance crónico entre el consumo de alimento y el gasto energético, y es un problema de salud de gran importancia e incidencia en el mundo industrializado (Rosenbaum et al. 1997). Para comprender mejor sobre los mecanismos genéticos, fisiológicos y metabólicos que son afectados por la condición de la obesidad, se han implementado varios enfoques y

modelos experimentales (Tschöp y Heiman 2002; Kennedy et al. 2010). Por ejemplo, existen modelos monogénicos y poligénicos: los primeros son los más conocidos y se caracterizan por mostrar las deficiencias metabólicas causadas por la delección de un gen, como ratones con defecto en la señalización de leptina (gen de leptina *ob/ob* o receptor de leptina *db/db*). Sin embargo, estos modelos son insuficientes para explicar la obesidad en humanos y los modelos poligénicos, los cuales involucran factores múltiples, pueden ser mucho más relevantes, como los ratones obesos de Nueva Zelanda, el ratón de Tsumara Suzuki, el Kuo Kond y el ratón M16, los cuales muestran hiperfagia, reducido gasto de energía y diabetes (Kanasaki y Koya 2011). También, la obesidad inducida por dieta alta en grasas o hipercalórica en ratones permite observar anormalidades similares al síndrome metabólico en humanos, sin impactar negativamente otros sistemas fisiológicos no relacionados, como suele ocurrir en modelos con delecciones genéticas (Liu et al. 2003; Kanasaki y Koya 2011). De esta manera, los modelos animales deben, en primer lugar, ofrecer la mayor diversidad de síntomas para enriquecer el conocimiento de los mecanismos fisiológicos asociados a ella, así como el potencial para desarrollar tratamientos clínicos (Smale et al. 2005; Mathes et al. 2011).

El ratón de los volcanes (*Neotomodon alstoni*) es una especie endémica del eje neovolcánico transversal de la región central de México y se ha introducido desde 1994 como organismo experimental (Granados 1994). Diversos estudios se han llevado a cabo en este nuevo modelo biológico, tanto conductuales como fisiológicos: cuidado parental, niveles de testosterona, regulación de hormonas en el hipotálamo durante el ayuno, ritmos circadianos y metabolismo dependiente del sexo (Luis et al. 2009; Fuentes-Granados et al. 2010; Carmona-Alcocer et al. 2012; Báez-Ruiz et al. 2014). A diferencia de los modelos tradicionales, en donde la obesidad es inducida por dietas hipercalóricas o alteraciones génicas, en el ratón *Neotomodon alstoni* se ha observado que una parte de la población de machos (cerca del 50%) que son mantenidos y criados en cautiverio y alimentados con una dieta estándar para roedor (Rodent Lab Chow 5001, Purina Inc.) incrementan su peso corporal hasta presentar un fenotipo de obesidad, pasados

de los seis meses de nacimiento, con características fisiológicas y conductuales análogas al estado de obesidad en humanos (Carmona-Alcocer et al. 2012; Fuentes-Granados et al. 2012; Báez-Ruiz et al. 2014; Luna-Illades et al. 2014).

Los ratones obesos machos muestran perfiles de actividad locomotriz y nivel sanguíneo diario de hormonas relacionadas al síndrome metabólico diferentes al de los ratones delgados. Los obesos presentan altas concentraciones de leptina (273%) en un perfil diario, insulina (150%) al comienzo de la fase nocturna y niveles altos de triacilglicéridos (149%) en la mitad de la noche. Estos resultados sugieren fuertemente que existe una posible resistencia del receptor de leptina e insulina y que la obesidad puede estar afectando el metabolismo y fisiología del ratón macho *Neotomodon alstoni* (Carmona-Alcocer et al. 2012; Fuentes-Granados et al. 2012).

Objetivo general

Determinar si en ratones obesos machos (*Neotomodon alstoni*) existe un estado interno de desincronización o desalineación circadiana relacionada con los patrones conductuales diarios de actividad locomotriz y de alimentación, así como de oscilación de proteínas del metabolismo lipídico hepático.

Objetivos particulares

Caracterizar en un perfil diario las diferencias entre ratones machos delgados y obesos en:

1. El ritmo circadiano de la actividad locomotriz y consumo de alimento en condición de fotoperiodo natural y artificial.
2. El ritmo de la expresión de la Proteína Reloj (BMAL1) y proteínas del metabolismo lipídico (PPAR α , PPAR γ , SREBP-1c, PGC-1 α y CPT-1) en el hígado.

Hipótesis

- Si existe un estado de desincronización circadiana interna en los ratones obesos (*N. alstoni*), entonces el perfil diario de actividad locomotriz y de actividad alimentaria serán distintas con respecto a los ratones delgados.
- Si existe una desregulación hepática en el metabolismo lipídico de ratones obesos, habrá un desalineamiento en la fase o diferencias de amplitud de la expresión diaria de la Proteína Reloj BMAL1 y el ciclo diario de la expresión de proteínas del metabolismo lipídico (PPAR α , PPAR γ , SREBP-1c, PGC-1 α y CPT1).

Métodos

Animales y mantenimiento

En este estudio se usaron animales adultos machos de entre 6 y 9 meses de edad, nacidos de padres silvestres distintos en el bioterio de la Facultad de Ciencias, y por observación ética representado por la secretaría académica de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Los animales fueron mantenidos individualmente en jaulas plástico-metálicas (30 x 20 x 13cm) con agua y alimento (Rodent Lab Chow 5001, Purina Inc.) *ad libitum*, en una habitación con ventilación y temperatura (18-23 °C) controladas y fotoperiodos de luz natural y luz-oscuridad artificial (LO) 12:12, dentro de las instalaciones de la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación (UMDI) de la Facultad de Ciencias, UNAM. Los animales fueron separados en dos grupos por peso corporal y de acuerdo al porcentaje de tejido adiposo epididimal, como en un estudio anterior (Vázquez-Martínez et al. 2015), delgados (n=18) con $46 \pm$ desviación estándar (d.e.) 5 g y obesos (n = 16) con $64 \pm$ d.e. 5 g.

Registro de ritmos de actividad locomotriz deambulatoria y de consumo de alimento.

El ritmo de actividad locomotriz en las 24 h fue explorado automáticamente y en forma individual en la deambulación libre dentro de la jaula, mediante sensores infrarrojos acoplados a un sistema de captura controlado por computadora. Ambos grupos de animales, delgados y obesos, fueron observados en primera instancia con fotoperiodo y termoperiodo (entre 18 y 24 ° C) naturales en el interior de una habitación durante siete días (del 8 de febrero a 15 de febrero del 2015). Luego fueron aclimatados en temperatura de 24 °C en fotoperiodo artificial LO 12:12 con lámparas fluorescentes de 250 lx durante tres días para después tomar el registro de actividad locomotriz durante siete días. El tiempo de ZT 0 a ZT 12, comprendió

la fase de luz o fotofase (Turek et al. 2005). Los datos fueron digitalizados por el programa ACTIBIO (diseñado por la Facultad de Psicología y la Facultad de Ciencias, UNAM) y los promedios obtenidos a través del software ACTIVIEW (Minimitter, Co, Inc., versión 1.2, 1998, USA) para analizarlos en el programa Microsoft Excel 2010.

La cuantificación del alimento ingerido (peso inicial menos peso final) se hizo en bloques de cada tres horas durante las 24 h en fotoperiodos natural y LO 12:12, mediante el método de croquetas ensartadas en brocheta usado en estudios previos (Luna-Illades et al. 2014), durante dos días consecutivos, similar al estudio realizado por (Turek et al. 2005). Para cuantificar el consumo del alimento en la noche se usó luz roja tenue (2 lx) de ambiente. Se analizó consumo total de alimento y consumo relativo de alimento (gramos de alimento consumido/gramos de peso corporal) en las 24 h.

Análisis de proteínas de hígado por *Western Blot* (W.B.)

1. Los animales delgados y obesos fueron sacrificados sin exceder los 9 meses de edad y se colectaron muestras de hígados de 3 a 4 ratones por grupo y a distintos tiempos (ZT: 04, 09, 13, 18 y 23). Esto con el fin de obtener entre 4 y 5 horas de diferencia, las cuales influyen el efecto de la transición a oscuridad (ZT 13), la fase de media noche (ZT 18), previa al amanecer (ZT 23), y dos horas de la fotofase temprana y tardía (ZT 04 y ZT 09). Los tejidos de hígado fueron congelados en hielo seco inmediatamente después del sacrificio por decapitación, para después ser homogeneizados en una mezcla de inhibidores de proteasas libres de EDTA (ThermoFisher Scientific): AEBSF, aprotinina, bestatina, E-64, leupeptina y pepstatina para inhibición de proteasas de serina, cisteína, ácido aspártico y aminopeptidasas; y buffer para inmunoprecipitación RIPA.
2. La concentración de proteína fue determinada por el método de Bradford (Bradford 1976), la cual fue de 50 µg para todas las proteínas a medir para

la corrida de *Western Blot*. Las muestras fueron tratadas con agentes reductores (reactivo de Laemmli 2x) en proporción 1:1 y ambos grupos (delgados y obesos) fueron colocados para un mismo gel, de modo que se procesaran bajo las mismas condiciones. Se separaron por peso molecular mediante electroforesis en geles de acrilamida al 10% para proteínas BMAL-1 (69 kDa), SREBP-1 forma madura (68 kDa), y PGC-1 α (90 kDa); y en geles de acrilamida de 7.5% para proteínas PPAR α (55 kDa), PPAR γ (58 kDa) y CPT-1 (90-94 kDa) a 120 V, 3 mA, durante 2.5 h, aproximadamente, con Buffer de Corrida Tris básico 12.4 mM, Glicina 96 mM y SDS 1.74 mM. Por lo anterior, los geles de 7.5% permiten una mayor expansión del gel en el rango de 40 a 100 kDa, donde se encuentran las proteínas de interés.

3. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa con un buffer de Tris 100 mM, glicina 192 mM y 20% de metanol durante 35 min a 23 V. Después de la técnica de transferencia, se realizó el bloqueo de sitios de unión no específicos con leche al 5% en TBS-Tween-20 % (TBST) por 2 horas a temperatura ambiente. Las membranas fueron incubadas toda la noche (máximo 18 h) con anticuerpos primarios diluidos en proporción 1:1000 específicos para BMAL1 (abcam 3350, rabbit polyclonal), SREBP-1 (santa cruz-367, rabbit polyclonal) en su forma madura (68kDa) y PGC-1 α (sc-13067, rabbit polyclonal). Por otra parte, PPAR α (santa cruz-1985, goat polyclonal), PPAR γ (abcam 19481, rabbit polyclonal) 1:2000 y CPT-1 (santa cruz-20514, goat polyclonal) fueron incubados solo 2 h a temperatura ambiente. Para la comparación de la expresión relativa en todas las proteínas se utilizó gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GADPH, por sus siglas en inglés; abcam 9485, rabbit polyclonal) 1:5000, como control de carga constitutivo.
4. Las membranas fueron lavadas con TBST (3 veces por 5 minutos) e incubadas por 2 h con el anticuerpo secundario (anti-rabbit para BMAL1, SREBP-1, PGC-1 α , PPAR γ y GAPDH; y anti- goat, para PPAR α y CPT-1) a temperatura ambiente. Las proteínas fueron detectadas añadiendo buffer

para fosfatasa alcalina Tris 100 mM pH 9.5 y reactivos correspondientes para revelación (BioRad).

5. La reacción de color fue detenida con lavado en agua destilada y las membranas con las bandas teñidas fueron escaneadas inmediatamente para la cuantificación en imagen (formato TIFF y en escala de grises de 8 bits).
6. Las bandas fueron normalizadas de acuerdo a la señal correspondiente a la banda del constitutivo (GADPH) y el análisis de densitometría fue hecho con el programa de procesamiento de imagen digital Image J (versión 1.49m, 2014, USA).

Análisis estadísticos

Se usó el programa ACTIVIEW para el análisis de datos de actividad locomotriz (promedio de actividad en relación al ZT). Los datos de perfiles diarios de actividad locomotriz y consumo de alimento (gramos) fueron graficados en Excel y analizados mediante ANOVA de dos vías y Bonferroni Post-hoc test para la comparación entre grupos: delgados y obesos. También, se realizó la comparación entre área bajo la curva del perfil diario de actividad locomotriz, el consumo total de alimento y consumo relativo de alimento mediante una prueba de t-student.

Los datos obtenidos de la cuantificación de proteínas fueron analizados mediante el programa GraphPad Prisma (versión 5.00, 2007, USA) para determinar diferencias cuantitativas en la oscilación acrofase-batifase (pico-valle) donde se utilizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis; y ANOVA de dos vías con Bonferroni Post-hoc test para determinar diferencias cuantitativas entre grupos, delgados y obesos, a lo largo de los cinco ZTs de muestreo. Posteriormente, los datos de proteínas fueron ajustados a una curva cosenoidal mediante análisis de Cosinor (programa COSANA: versión 3.1, 1997, ICB/USP, Brasil.) para la determinación de acrofase, mesor, amplitud y porcentaje de ritmicidad (%R).

También, se realizó un coeficiente de correlación de Spearman para la expresión de las proteínas PGC-1 α y PPAR α . El nivel de significancia para todos los análisis fue de $P < 0.05$.

Resultados

Ritmos diarios de actividad locomotriz deambulatoria y de alimentación:

En fotoperiodo natural, los ratones delgados mostraron un patrón de dos picos de actividad locomotriz deambulatoria en la fase nocturna, que marca la transición del comienzo del anochecer y del amanecer; y una actividad locomotriz casi nula durante la fase diurna. En el mismo fotoperiodo, los ratones obesos presentaron una amplitud de la actividad locomotriz nocturna significativamente menor (de 19 a 24 h y de 2 a 5 h) y un incremento en su actividad locomotriz diurna (diferencia no significativa), con respecto a los delgados (**Fig. 7A**); así, como un sobreconsumo de alimento muy significativo antes de la hora del amanecer (7 h; **Cuadro 1; Fig. 7B**). El perfil diario de la actividad locomotriz de ratones delgados presentó el mismo patrón en fotoperiodo artificial LO 12:12 que el fotoperiodo natural. En fotoperiodo artificial, los ratones obesos mostraron una amplitud de la actividad locomotriz nocturna disminuida (ZT 12-22) y un incremento en su actividad locomotriz diurna (diferencia no significativa), con respecto a los delgados (**Cuadro 1; Fig. 8A**). Similarmente, los obesos presentaron sobreconsumo de alimento antes y después del inicio de la fase oscura (ZT 12 y ZT 15; **Cuadro 1; Fig. 8B**).

Cuadro 1. Análisis estadísticos de ANOVA de dos vías y t-student entre ratones delgados y obesos. El ANOVA de dos vías fue seguido de Bonferroni Post-hoc test, donde su valor de P fue tomado como último nivel de significancia. *, P<0.05; no significativo (N.S.).

Condición	Característica	Resultados	Bonferroni Pos-hoc test	
F. Natural	Actividad locomotriz diaria	interacción F (143,1440)= 3.67, P< 0.0001;	19-24 h, 2-5 h, P< 0.001	***
		tiempo F (143,1440)= 6.53, P< 0.0001;		
		entre grupos F (1,1440)= 359.8, P< 0.0001		
	Consumo de alimento diario	interacción F (7,48)= 1.98, P= 0.077;	7 h, P< 0.01	**
		tiempo F (7,48)= 19.6, P< 0.0001;		
		entre grupos F (1,48)= 6.7, P= 0.0127		
	Área bajo la curva	t= 2.184, g.l.= 10, P= 0.0184		*
	Consumo total alimento	t= 1.703, g.l.= 8, P= 0.127		N.S.
	Consumo relativo de alimento	t= 0.4073, g.l.= 8, P= 0.6945		N.S.
	Actividad locomotriz diurna	t= 2.787, g.l.= 10, P= 0.0192		*
Actividad locomotriz nocturna	t=2.916, g.l.= 10, P= 0.0154		*	
Consumo de alimento diurno	t= 0.032, g.l.= 8, P= 0.975		N.S.	
Consumo de alimento nocturno	t= 1.780, g.l.= 8, P= 0.112		N.S.	
F. Artificial	Actividad locomotriz diaria	interacción F (143,1440)= 5.15, P< 0.0001;	ZT 12-22, P< 0.001	***
		tiempo F (143,1440)= 12.15, P< 0.0001;		
		entre grupos F (1,1440)= 560.22, P< 0.0001		
	Consumo de alimento diario	interacción F (7,48)= 1.47, P= 0.1998;	ZT 12 y 15, P< 0.05	*
		tiempo F (7,48)= 16.92, P< 0.0001;		
		entre grupos F (1,48)= 8.34, P= 0.0058		
	Área bajo la curva	t= 4.099, g.l.= 10, P= 0.0021		**
	Consumo total de alimento	t= 2.647, g.l.= 10, P= 0.0244		*
	Consumo relativo de alimento	t= 0.6387, g.l.= 10, P= 0.5374		N.S.
	Actividad locomotriz diurna	t= 1,639, g.l.= 10, P= 0.1323		N.S.
Actividad locomotriz nocturna	t= 4.223, g.l.= 10, P= 0.0018		**	
Consumo de alimento diurno	t= 2.63, g.l.= 10, P= 0.0252		*	
Consumo de alimento nocturno	t= 1.573, g.l.= 8, P= 0.154		N.S.	

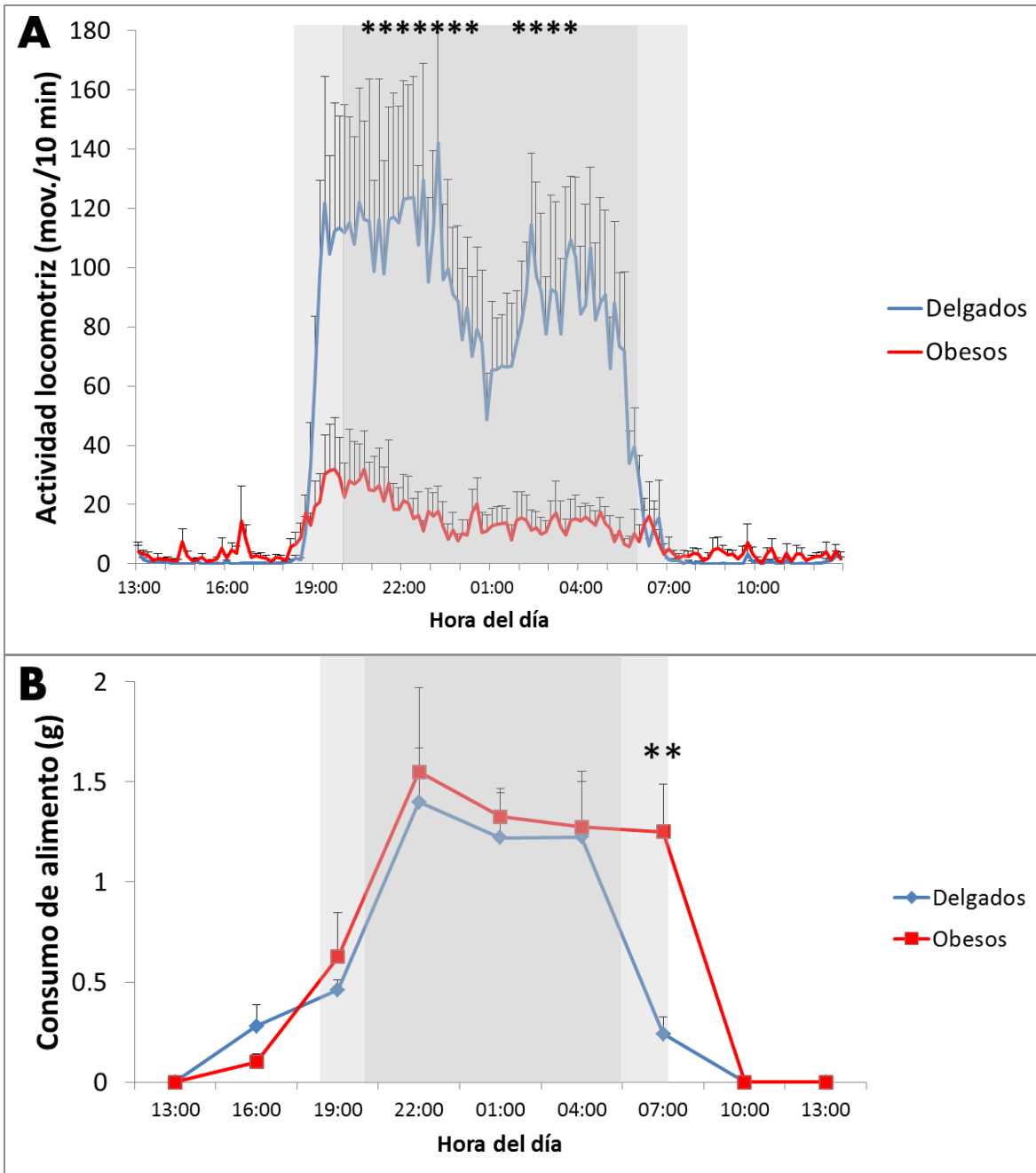


Figura 7. Ritmos diarios de actividad locomotriz deambulatoria (**A**, n= 6/grupo) y consumo de alimento (**B**, n= 4/grupo) en fotoperiodo natural. Ratones delgados (rombos y línea azul) y obesos (cuadrados y línea roja). La franja gris representa la fase de oscuridad y la franja gris tenue representa el aumento o disminución gradual de la oscuridad. Los valores representan las medias \pm errores estándares. Diferencia significativa entre grupos (Bonferroni Post-hoc test), * P< 0.05, ** P< 0.01.

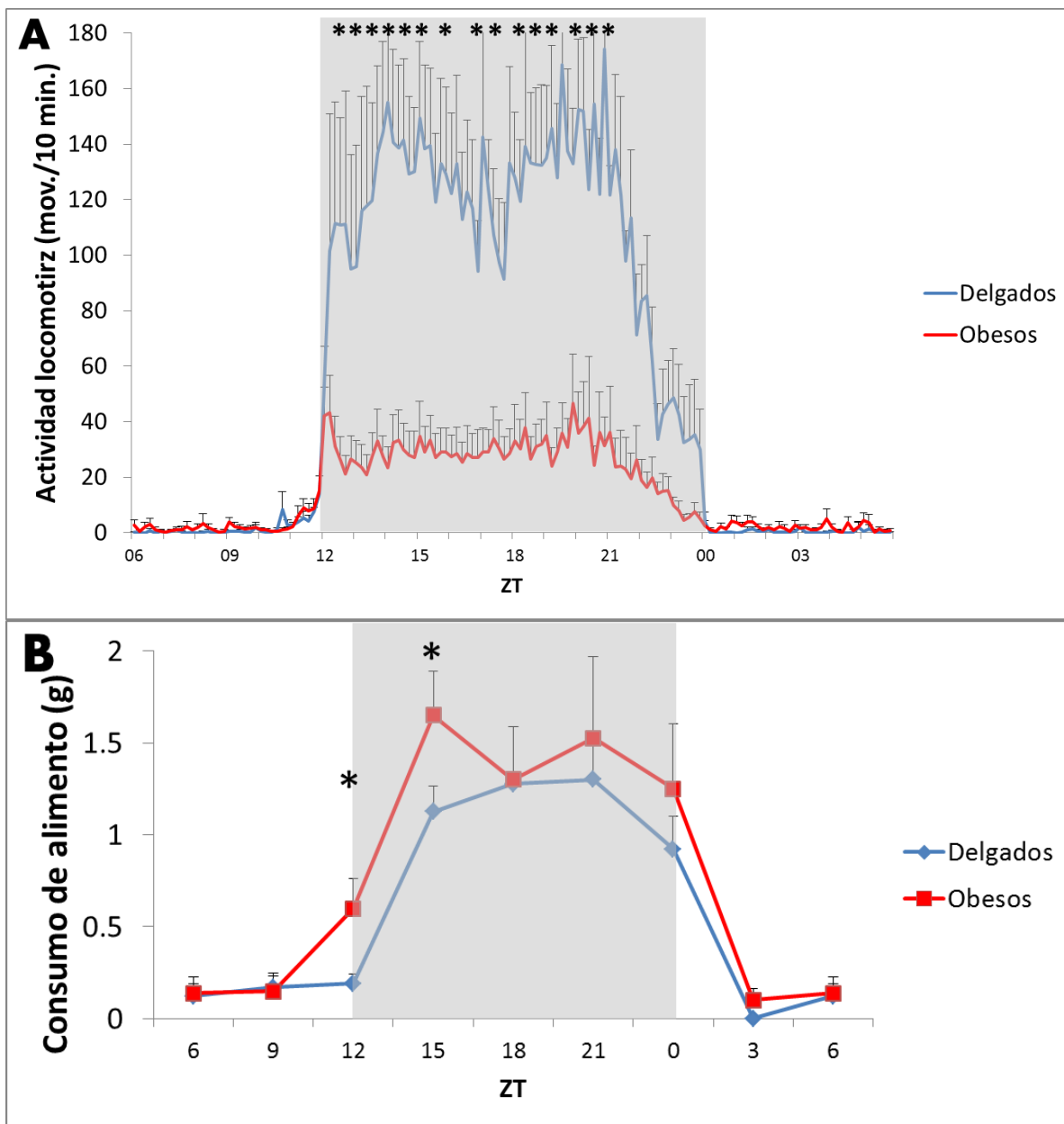


Figura 8. Ritmos diarios de actividad locomotriz deambulatoria (**A**, n= 6/grupo) y consumo de alimento (**B**, n= 4/grupo) en fotoperiodo artificial (LO 12:12). Ratones delgados (rombos y línea azul) y obesos (cuadrados y línea roja). La franja gris representa la fase de oscuridad. Los valores representan las medias \pm errores estándares. Diferencia significativa entre grupos (Bonferroni Pos-hoc test), *P< 0.05.

Por otra parte, el área bajo la curva de la actividad locomotriz fue mayor en delgados que en obesos, tanto en fotoperiodo natural como en artificial (**Cuadro 1; Fig. 9A**). El consumo total de alimento en las 24 h no mostró diferencia significativa entre grupos en el fotoperiodo natural pero si en el fotoperiodo artificial, con un consumo de alimento mayor en obesos que en delgados (**Cuadro 1; Fig. 9B**). El consumo relativo de alimento (g de alimento consumido/g de peso corporal) mostró una reducción en animales obesos (diferencia no significativa) en ambos fotoperiodos (**Cuadro 1; Fig. 9C**).

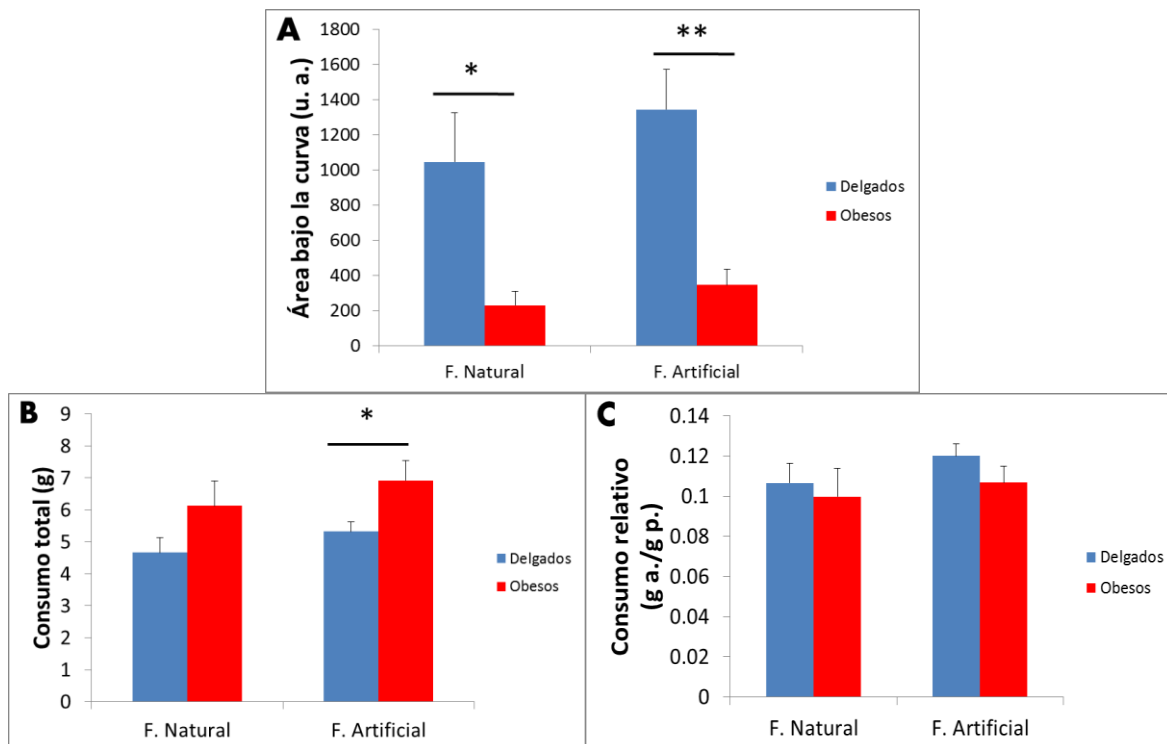


Figura 9. Área bajo la curva de la actividad locomotriz (**A**) y consumo de alimento en 24 h: Total (**B**) y consumo relativo (gramos de alimento consumido por gramos de peso corporal del ratón; **C**). Ratones delgados (barras azules) y ratones obesos (barras rojas), n=6/grupo. Los valores representan las medias \pm errores estándares. Diferencia significativa entre grupos (t-student), * P<0.05, **P<0.01.

Los ratones delgados mostraron una diferencia en la actividad locomotriz total diurna entre fotoperiodos ($t= 2.356$, g.l.= 10, $P=0.0402$). Los ratones obesos mostraron un porcentaje más alto en la actividad locomotriz total en la fase diurna, siendo cerca de 600% en luz natural y más de 200% en luz artificial (diferencia no significativa; **Cuadro 1; Fig. 10A**), con respecto a los delgados. En la actividad locomotriz total nocturna, los obesos mostraron una disminución cerca del 80%, tanto en luz natural como en luz artificial (**Cuadro 1; Fig. 10B**), comparada a los delgados. El consumo de alimento total diurno solo fue mayormente significativo en obesos que en delgados en el fotoperiodo artificial, pero no en el fotoperiodo natural (**Cuadro 1; Fig. 10C**). No existieron diferencias entre fotoperiodos o grupos en el consumo de alimento total nocturno, aunque se observó una tendencia mayor en obesos que en delgados (**Cuadro 1; Fig. 10D**).

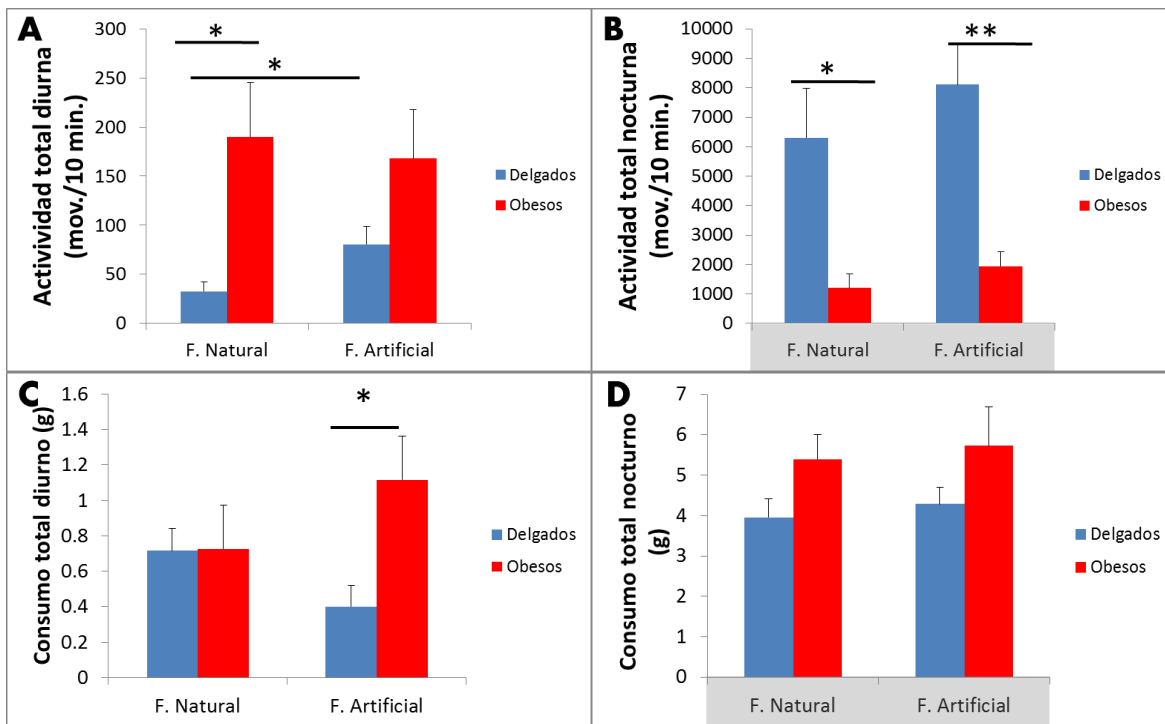


Figura 10. Actividad locomotriz y consumo de alimento total en fase diurna (**A** y **C**) y nocturna (**B** y **D**). Ratones delgados (barras azules) y obesos (barras rojas). Valores representan las medias \pm error estándares. Diferencia significativa entre grupos (t-student), * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Ritmos de expresión de la Proteína Reloj BMAL1 y de las proteínas relacionadas al metabolismo lipídico en el hígado:

Proteína Reloj BMAL1:

La expresión relativa de la Proteína Reloj BMAL1 en hígado de ratones delgados presentó un pico-valle (acrofase-batifase) muy significativo (**Cuadro 2**) con un alto porcentaje de ritmicidad (91.8%), amplitud de la oscilación $0.3 \pm \text{d.e. } 0.03$ y acrofase en ZT $1 \pm \text{d.e. } 0.2$ (comienzo de la fase de luz), de acuerdo al análisis de Cosinor ($P < 0.0001$). También, el BMAL1 de ratones obesos mostró un pico-valle significativo (**Cuadro 2**), con un porcentaje bajo de ritmicidad (60.3%), amplitud de la oscilación $0.1 \pm \text{d.e. } 0.05$ y acrofase en ZT $2 \pm \text{d.e. } 1.1$, de acuerdo al análisis de Cosinor ($P = 0.039$). No se observó un desplazamiento de fase pero si una menor amplitud de oscilación diaria de BMAL1 en ratones obesos, además de una mayor intensidad en la expresión de BMAL1 en ZT 13 con respecto a delgados (**Cuadro 3; Fig. 11**).

Cuadro 2. Análisis estadísticos de la expresión de las proteínas pico-valle de ratones delgados y obesos. Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (K.W). *, $P < 0.05$; no significativo (N.S.).

Proteína	Delgados		Obesos	
Bmal1	K.W.= 26.33, $P < 0.0001$	***	K.W.= 22.67, $P = 0.0001$	***
PGC-1 α	K.W.= 14.81, $P = 0.0051$	**	K.W.= 13.67, $P = 0.0084$	**
PPAR α	K.W.= 21.06, $P = 0.00039$	***	K.W.= 13.67, $P = 0.0084$	**
CPT1	K.W.= 8.386, $P = 0.0789$	N.S.	K.W.= 15.39, $P = 0.004$	**
SREBP-1c	K.W.= 14.74, $P = 0.0053$	**	K.W.= 15.44, $P = 0.0039$	**
PPAR γ	K.W.= 25.76, $P < 0.0001$	***	K.W.= 22.35, $P = 0.0002$	***

Cuadro 3. Análisis estadístico de ANOVA de dos vías entre ratones delgados y obesos.

La probabilidad de Bonferroni-Pos hoc test fue tomado como último nivel de significancia.

*, P<0.05; no significativo (N.S.).

Proteína	Resultados	Bonferroni Pos-hoc test	
Bmal1	interacción F (4,70)= 3.22, P= 0.0174;	ZT 13, P< 0.05	*
	tiempo F (4,70)= 25.5, P<0.0001;		
	entre grupos F (1,70)= 0.28, P= 0.596		
PGC-1α	interacción F (4,24)= 12.29, P<0.0001;	ZT 23, P< 0.05; ZT 4, P< 0.01; ZT 13, P< 0.001	*; **, ***
	tiempo F (4,24)= 46.73, P<0.0001;		
	entre grupos F (1,249)= 7.15, P= 0.0368		
PPARα	interacción F (4,50)= 5.97, P= 0.0005;	ZT 13, P< 0.05, ZT 18, P< 0.01	*; **
	tiempo (4,50)= 12.08, P<0.0001;		
	entre grupos F (1,50)= 8.38, P=0.0056		
CPT1	interacción F (4,30)= 2.68, P= 0.071;	Todos, P> 0.05	N.S.
	tiempo F (4,30)= 12.76, P<0.0001;		
	entre grupos F (1,30)= 0.07, P= 0.8004		
SREBP-1c	interacción F (4,30)= 8.68, P<0.0001;	ZT 9, P< 0.05; ZT 4, ZT13, P< 0.01	*; **
	tiempo F (4,30)= 38.81, P<0.0001;		
	entre grupos F (1,30)= 0.86, P= 0.3607		
PPARγ	interacción F (4,60)= 0.27, P= 0.8938;	Todos, P> 0.05	N.S.
	tiempo F (4,60)= 70.59, P<0.0001;		
	entre grupos F (1,60)= 6.01, P=0.0172		

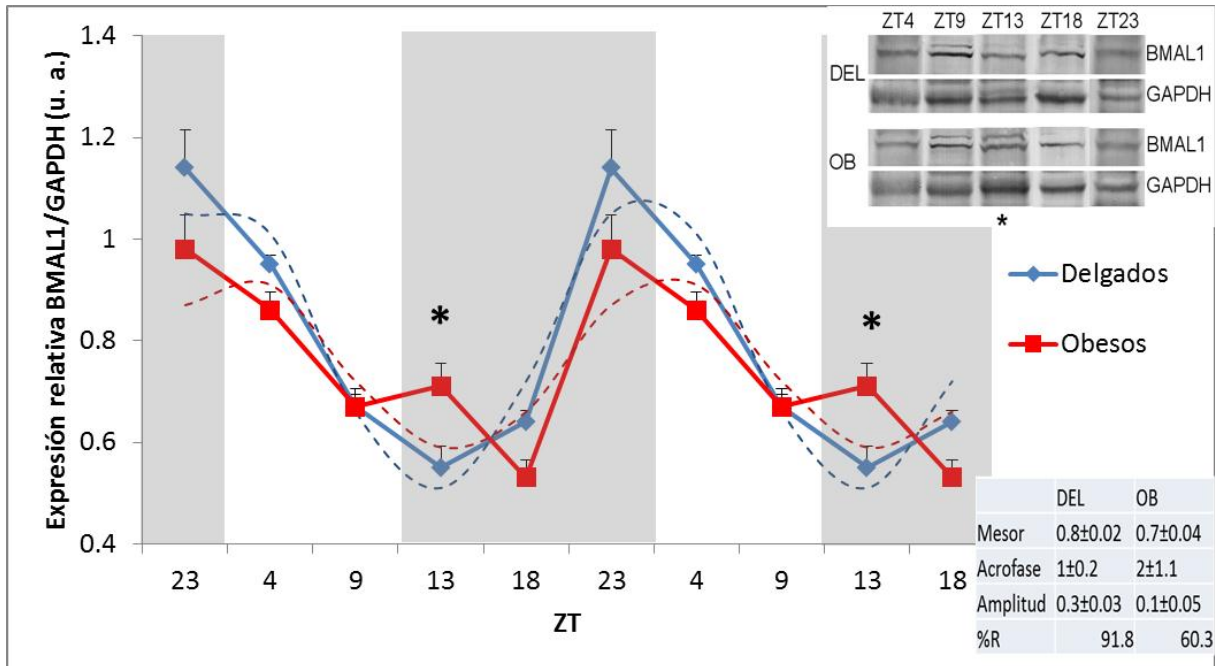


Figura 11. Ritmo diario de expresión de la Proteína Reloj BMAL1 en hígado. Ratones delgados (rombos y línea azul) y ratones obesos (cuadrados y línea roja). Franja gris representa la fase de oscuridad. Valores representan las medias \pm errores estándares, $n=3-4$ / grupo y ZT. Diferencia significativa (Bonferroni Post-hoc test), $*P<0.05$. Parte superior derecha: bandas de *Western Blot* de BMAL1 con su control de carga GAPDH. Parte inferior derecha: ajustes de Cosinor para delgados (DEL, línea azul punteada) y para obesos (OB, línea roja punteada), valores representan medias \pm desviaciones estándares.

Proteína PGC-1 α :

La expresión relativa de la proteína PGC-1 α de los delgados presentó diferencias en pico-valle (**Cuadro 2**), con una ritmicidad de 76%, amplitud de oscilación $0.5 \pm$ d.e. 0.1 y acrofase en ZT $7 \pm$ d.e. 0.4 (segunda mitad del tiempo de luz), según el análisis de Cosinor ($P= 0.007$). La proteína de PGC-1 α en obesos mostró diferencia en pico-valle (**Cuadro 2**), con porcentaje de 80.2%, amplitud de oscilación de 0.3 ± 0.07 y acrofase en ZT $9.2 \pm$ d.e. 0.4 (segunda mitad del tiempo de luz), según el análisis de Cosinor ($P= 0.003$). Los obesos presentaron diferencias de intensidad en tres puntos temporales con respecto a los delgados:

en ZT 4 tuvo menor intensidad y en los ZT 13 y ZT 23 mostró mayor intensidad (**Cuadro 3; Fig. 12**).

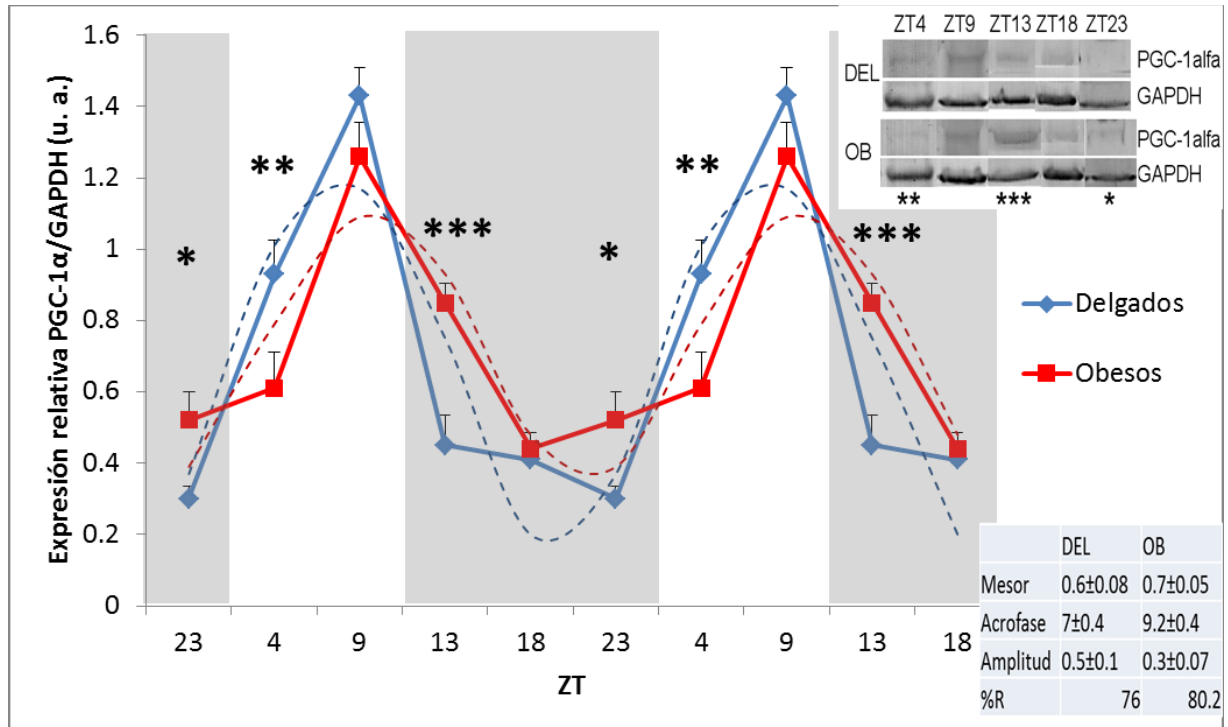


Figura 12. Ritmo de expresión de la proteína del catabolismo lipídico PGC-1α en hígado.

Ratones delgados (rombos y línea azul) y ratones obesos (cuadrados y línea roja). Valores representan las medias ± errores estándares, n= 3-4/ grupo y ZT. Diferencia significativa (Bonferroni Post-hoc test), *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001. Parte superior derecha: bandas de *Western Blot* de PGC-1α con su control de carga GAPDH. Parte inferior derecha: ajustes de Cosinor para delgados (DEL, línea azul punteada) y para obesos (OB, línea roja punteada), valores representan medias ± desviaciones estándares.

Proteína PPARα:

La expresión relativa de la proteína del catabolismo lipídico PPARα mostró diferencias en pico-valle (**Cuadro 2**) con un porcentaje de ritmicidad de 71.7%, amplitud de oscilación 0.6 ± d.e. 0.1 y acrofase en ZT 9.3 ± d.e. 0.5 (segunda mitad de la fase de luz), según el análisis COSINOR (P= 0.012). También, los

obesos mostraron diferencias en pico-valor (**Cuadro 2**), con 79.7% de ritmicidad, amplitud de oscilación de $0.4 \pm \text{d.e. } 0.09$ y acrofase en ZT $12.4 \pm \text{d.e. } 0.4$ (comienzo de la fase nocturna), según el análisis Cosinor ($P= 0.004$). Se observó un retraso de fase de PPAR α en obesos con diferencias en la intensidad de expresión de la proteína, con mayor intensidad en ZT 13 y ZT 18 en comparación con delgados (**Cuadro 3; Fig. 13**).

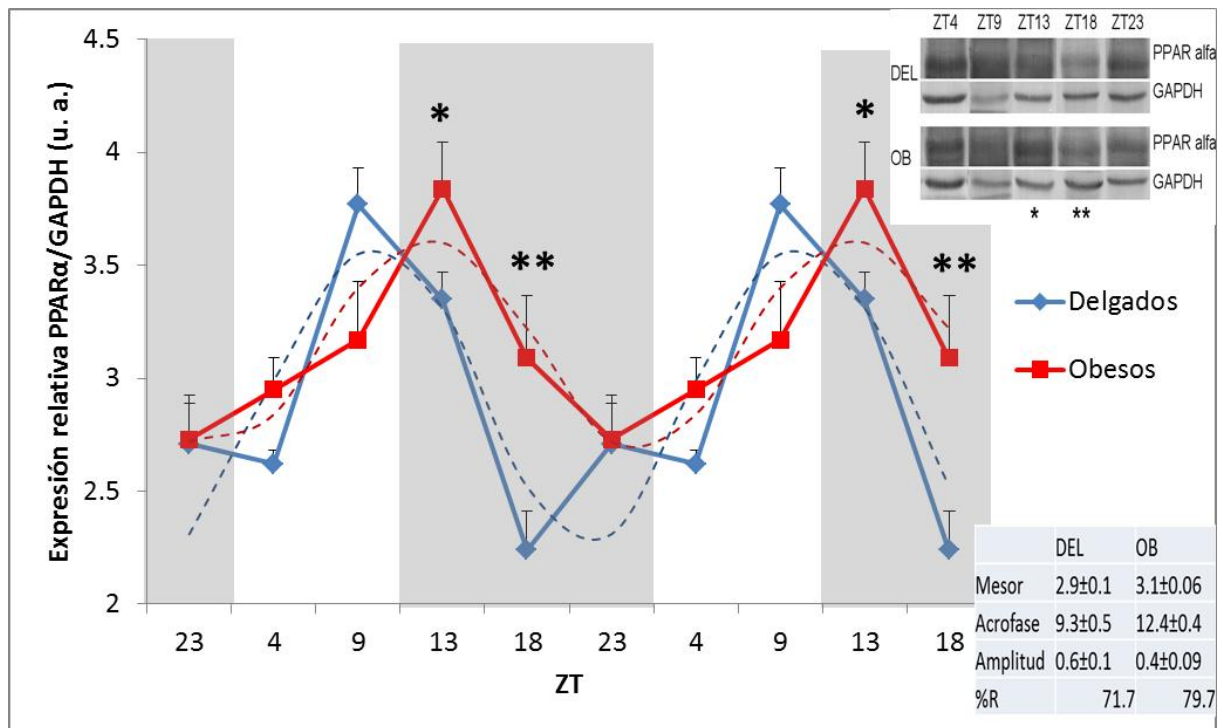


Figura 13. Ritmo de expresión de la proteína del catabolismo lipídico PPAR α en hígado. Ratones delgados (rombos y línea azul) y ratones obesos (cuadrados y línea roja). Valores representan las medias \pm errores estándares, $n= 3-4/$ grupo y ZT. Diferencia significativa (Bonferroni Pos-hoc test), $*P<0.05$, $P<0.01$. Parte superior derecha: bandas de *Western Blot* de PPAR α con su control de carga GAPDH. Parte inferior derecha: ajustes de Cosinor para delgados (DEL, línea azul punteada) y para obesos (OB, línea roja punteada), valores representan medias \pm desviaciones estándares.

Proteína CPT1:

La ritmicidad de expresión relativa de la proteína CPT1 no mostró diferencias en pico-valle (**Cuadro 2**), pero tuvo un ajuste de Cosinor significativo ($P= 0.025$) con una ritmicidad de 69.9%, amplitud de oscilación $0.2 \pm \text{d.e. } 0.06$ y acrofase en ZT $15.2 \pm \text{d.e. } 1$ (después del inicio de la fase oscura). Por otro lado, los obesos mostraron diferencias en pico-valle (**Cuadro 2**), con ajuste Cosinor significativo ($P= 0.036$): 61.3% de ritmicidad, amplitud de oscilación de $0.3 \pm \text{d.e. } 0.09$ y acrofase en ZT $13.5 \pm \text{d.e. } 1$. No existieron diferencias significativas de intensidad de la señal de CPT1 en ambos grupos; sin embargo los obesos tuvieron una baja intensidad de la proteína en ZT 23 con respecto a los delgados (**Cuadro 3; Fig. 14**).

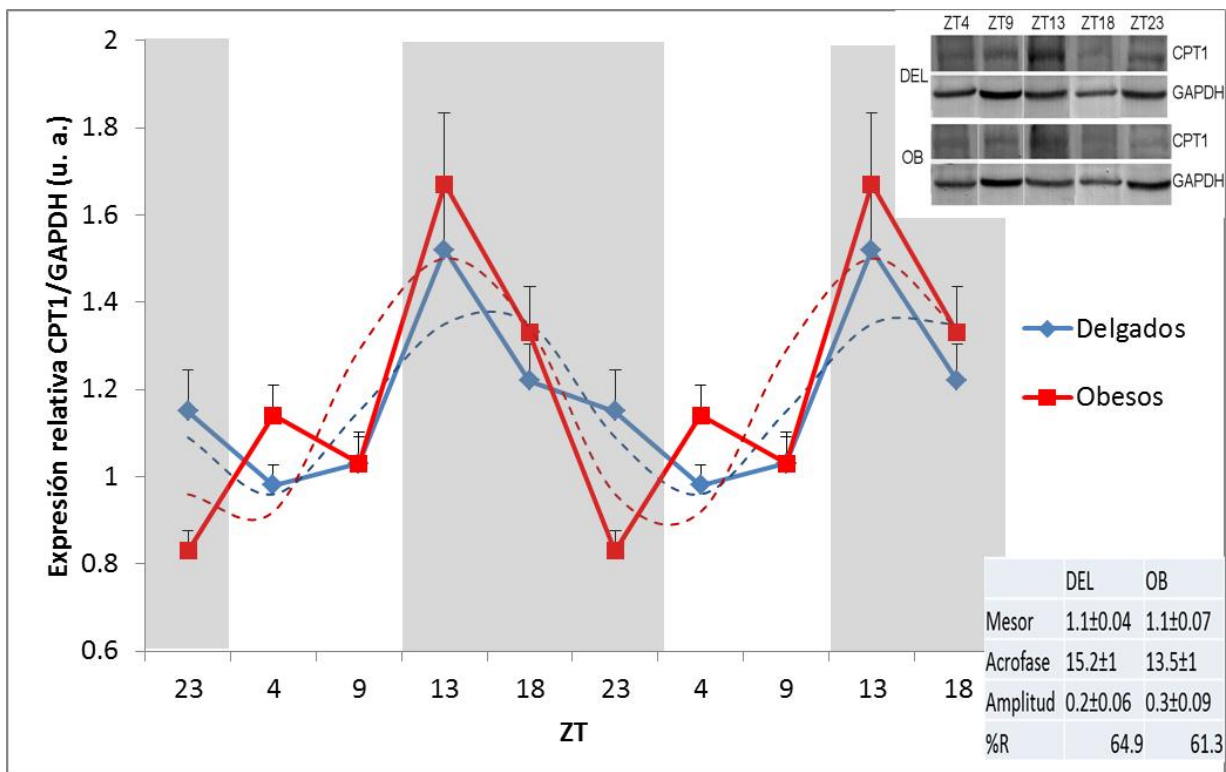


Figura 14. Ritmo de expresión de la proteína del catabolismo lipídico CPT1 en hígado.

Ratones delgados (rombos y línea azul) y ratones obesos (cuadrados y línea roja).

Valores representan las medias \pm errores estándares, $n= 3-4/$ grupo y ZT. Parte superior derecha: bandas de *Western Blot* de CPT1 con su control de carga GAPDH. Parte inferior

derecha: ajustes de Cosinor para delgados (DEL, línea azul punteada) y para obesos (OB, línea roja punteada), valores representan medias \pm desviaciones estándares.

Proteína SREBP-1c:

La expresión relativa de la proteína lipogénica SREBP-1c presentó diferencias en pico-valle (**Cuadro 2**), pero no en el ajuste de Cosinor ($P= 0.084$) con 50.7% de porcentaje de ritmicidad, amplitud de oscilación de $0.3 \pm$ d.e. 0.1 y acrofase en ZT $1.4 \pm$ d.e. 1.2 (inicio de la fase de luz). Similarmente, los obesos mostraron diferencias en la expresión de la proteína pico-valle (**Cuadro 2**), pero no en el ajuste de Cosinor ($P= 0.129$), con un porcentaje de ritmicidad de 44.3%, amplitud de oscilación de $0.2 \pm$ d.e. 0.1 y acrofase en ZT $20 \pm$ d.e. 1.3 (segunda mitad de la fase de oscuridad). No obstante, se observó un avance de fase de SREBP-1c en obesos y diferencias en la intensidad de la proteína, siendo menor en los ZT 4 y ZT 9 y mayor en el ZT 13 con referencia a los delgados (**Cuadro 3; Fig. 15**).

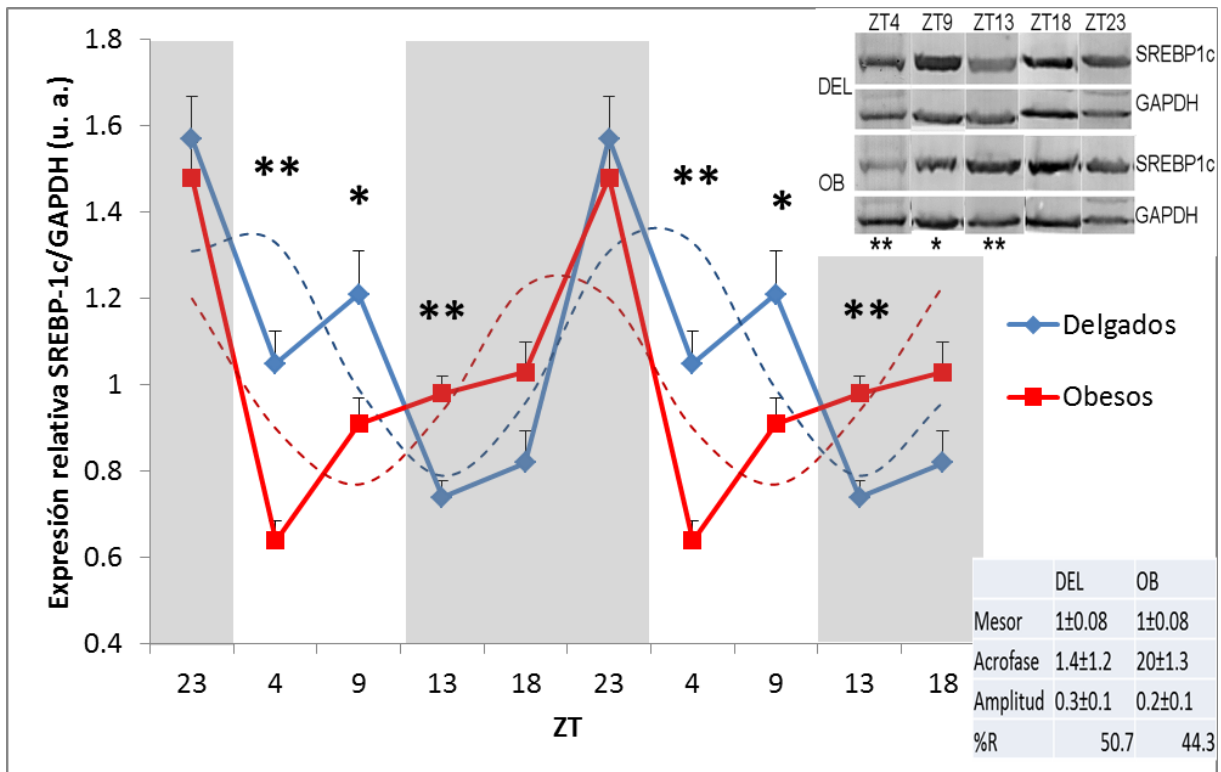


Figura 15. Ritmo de expresión de la proteína del metabolismo lipídico SREBP-1c en hígado. Ratones delgados (rombos y línea azul) y ratones obesos (cuadrados y línea roja). Valores representan las medias \pm errores estándares, $n= 3-4/$ grupo y ZT. Diferencia significativa (Bonferroni Pos-hoc test), * $P<0.05$, $P<0.01$. Parte superior derecha: bandas de *Western Blot* de SREBP-1c con su control de carga GAPDH. Parte inferior derecha: ajustes de Cosinor para delgados (DEL, línea azul punteada) y para obesos (OB, línea roja punteada), valores representan medias \pm desviaciones estándares.

Proteína PPAR γ :

La expresión relativa de la proteína lipogénica PPAR γ en hígado mostró diferencias en pico-valle (**Cuadro 2**), pero no en el ajuste de Cosinor ($P= 0.327$), con un bajo porcentaje de ritmicidad (27.3%), amplitud de oscilación de $0.2 \pm$ d.e. 0.1 y acrofase en $ZT 4.5 \pm$ d.e. 2.1 (primera mitad de la fase de luz). De igual manera, los obesos presentaron diferencias en pico-valle (**Cuadro 2**), pero no en el ajuste de Cosinor ($P= 0.326$), con un bajo porcentaje de ritmicidad (27.4%). La proteína PPAR γ

no mostró diferencia entre grupos, aunque existió una baja intensidad de la proteína en todos los puntos de ZTs (**Cuadro 3; Fig. 16**).

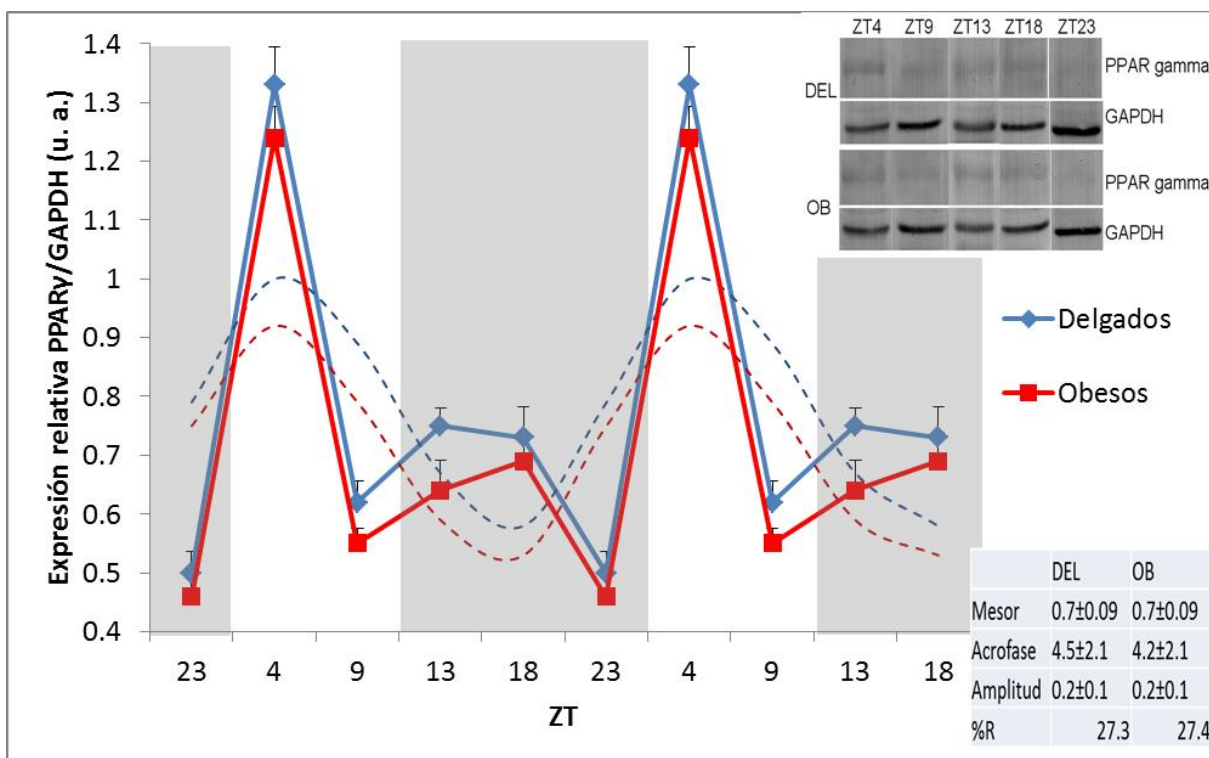


Figura 16. Ritmo de expresión de la proteína del metabolismo lipídico PPAR γ en hígado.

Ratones delgados (rombos y línea azul) y ratones obesos (cuadrados y línea roja). Valores representan las medias \pm errores estándares, $n= 3-4/$ grupo y ZT. Parte superior derecha: bandas de *Western Blot* de PPAR γ con su control de carga GAPDH. Parte inferior derecha: ajustes de Cosinor para delgados (DEL, línea azul punteada) y para obesos (OB, línea roja punteada), valores representan medias \pm desviaciones estándares

Correlación de la expresión de las proteínas PPAR α y PGC-1 α :

El coeficiente de correlación de Spearman mostró una correlación positiva y significativa ($r= 0.5880$, $P= 0.0064$) entre los perfiles diarios de expresión de las proteínas PPAR α y PGC-1 α en ratones delgados (**Fig.17**). Sin embargo, los ratones obesos no mostraron una correlación de Spearman significativa ($r= 0.03911$, $P= 0.87$) entre los perfiles de expresión de las proteínas PPAR α y PGC-1 α (**Fig.18**).

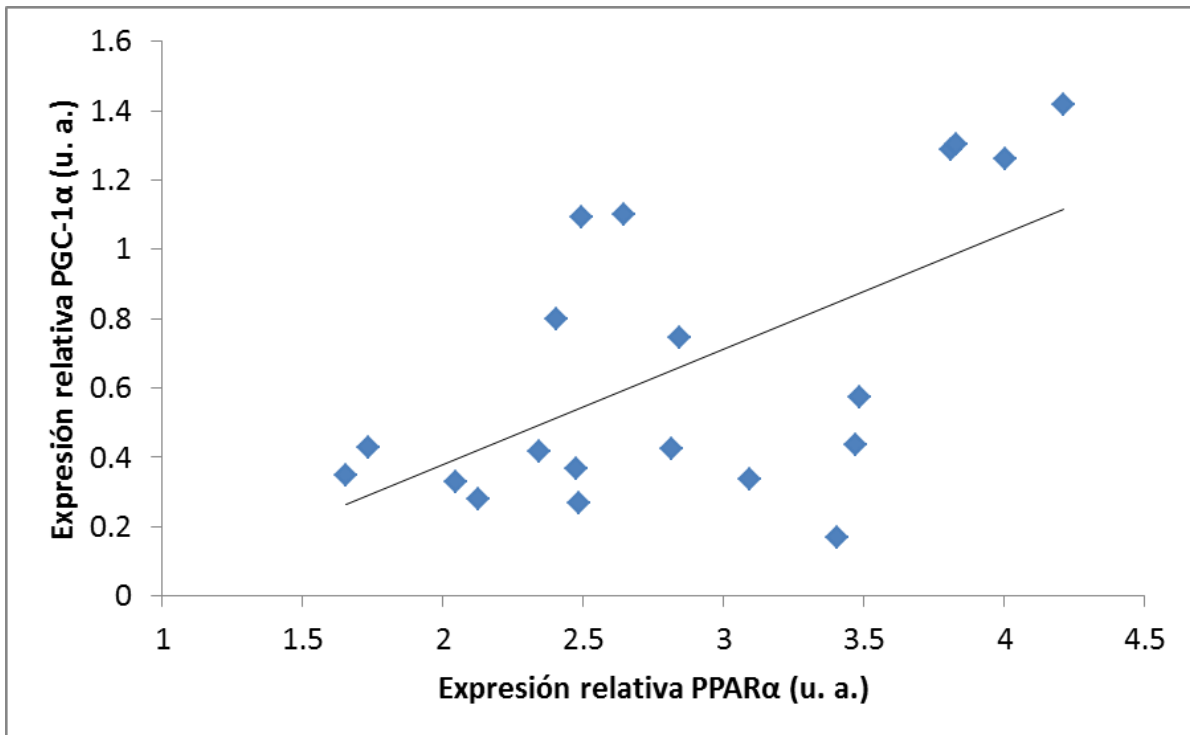


Figura 17. Correlación de los perfiles diarios de la expresión de las proteínas PPAR α y PGC-1 α en ratones delgados. $r= 0.5880$, $P= 0.0064$.

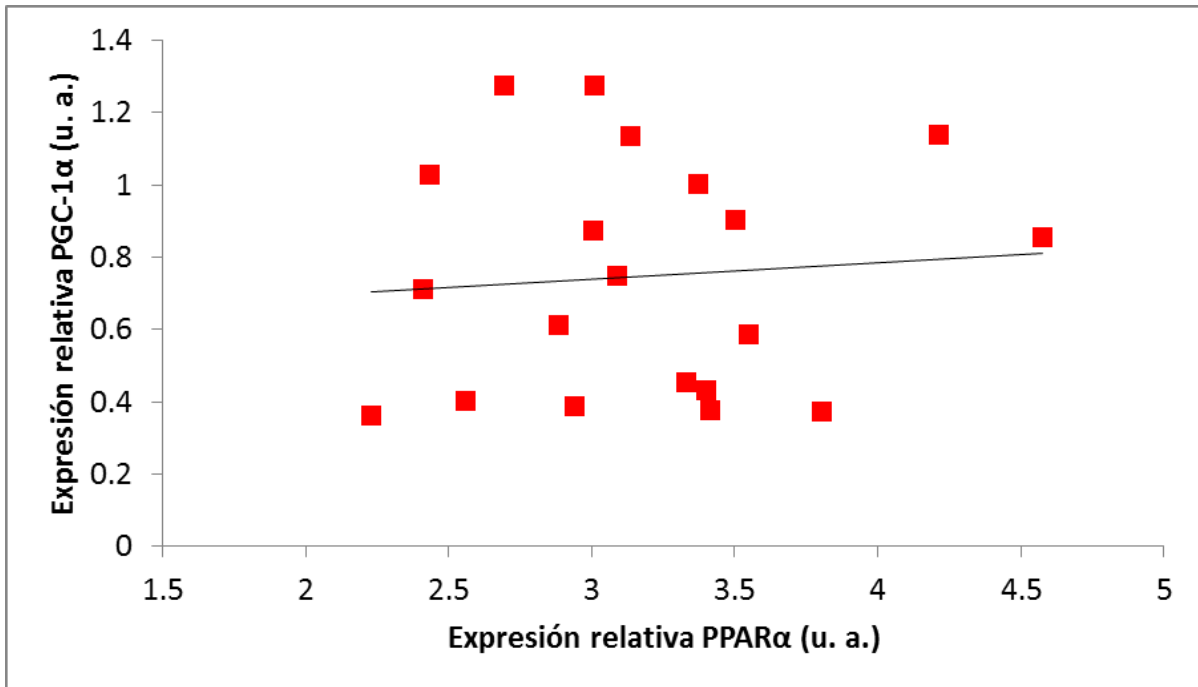


Figura 18. Correlación de los perfiles diarios de la expresión de las proteínas PPAR α y PGC-1 α en ratones obesos. $r = 0.03911$, $P = 0.87$.

Relación de los ritmos de la actividad locomotriz deambulatoria, de alimentación y de la expresión de las proteínas en el hígado de *Neotomodon alstoni*:

Se realizó la comparación de los parámetros medidos entre ratones delgados y obesos, que incluyeron la actividad locomotriz y la alimentación en fotoperiodo artificial LO 12:12 y las proteínas del metabolismo lipídico en el hígado (BMAL1, PGC-1 α , PPAR α , CPT1, SREBP-1c y PPAR γ); además de los ácidos grasos libres (FFA, por sus siglas en inglés) en plasma medidos en un estudio anterior (**Fig. 19**).

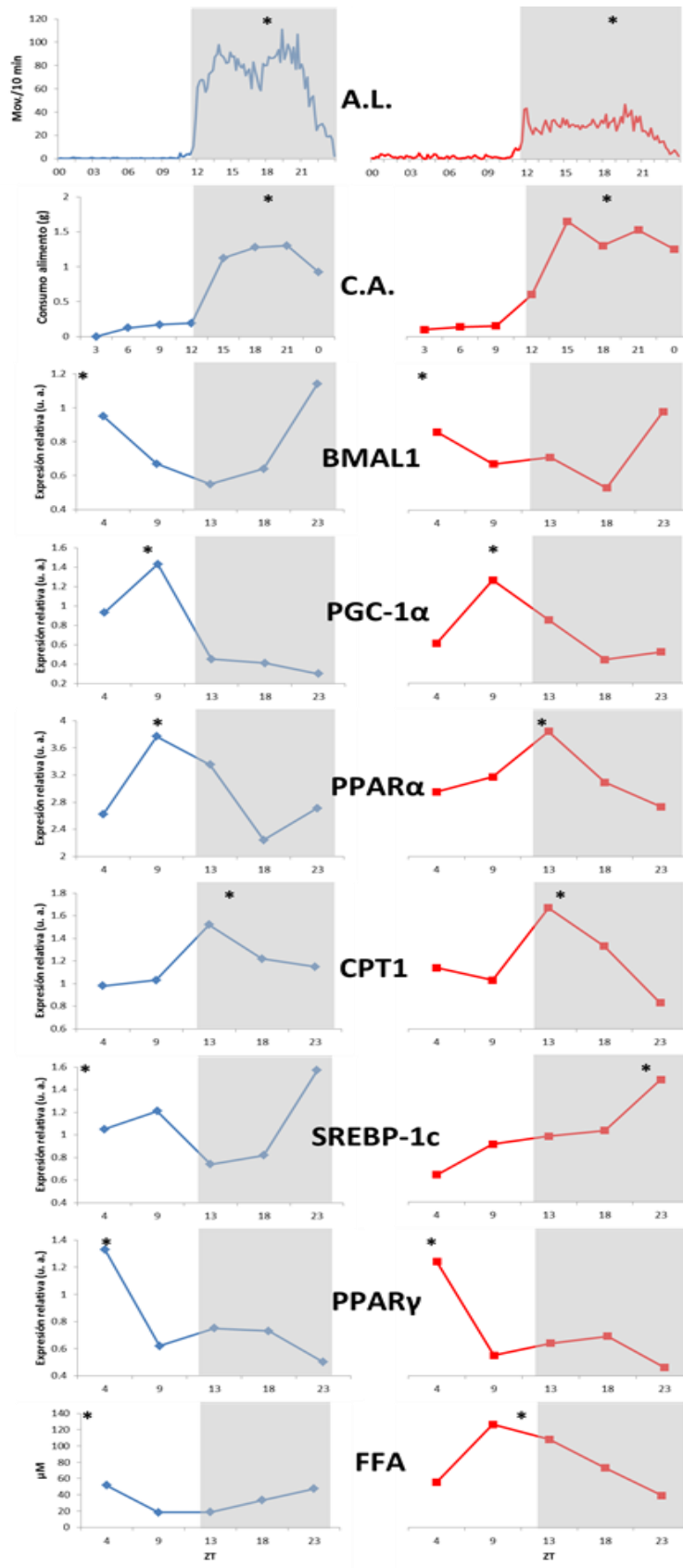


Figura 19. Resumen de los ritmos diarios de la actividad locomotriz (A.L.), alimentación (C.A.) y proteínas del metabolismo lipídico en hígado. Ratones delgados (rombos y línea azul) y obesos (cuadrados y línea roja). Los valores representan las medias. El * marca el punto de acrofase para cada parámetro. Fotoperiodo artificial (LO 12:12). La franja gris indica la fase de oscuridad.

Discusión

Ritmos diarios de actividad locomotriz deambulatoria y de alimentación:

Tanto en fotoperiodo natural como artificial existió un patrón bimodal (dos picos de actividad) en ratones delgados en oscuridad, uno relacionado con el inicio y otro con el final de la noche, el cual es consistente con la actividad regular en roedores nocturnos (Aschoff 1966). En condiciones naturales, estos dos picos de actividad están estrechamente relacionados con los estímulos del ambiente (tiempos del anochecer y del amanecer), aunque también son sostenidos por un sistema endógeno en ciclos LO artificial (Aschoff 1966; Roenneberg y Foster 1997). Sin embargo, en el fotoperiodo natural los ratones obesos no presentaron una actividad locomotriz bimodal clara ni respondieron a la transición gradual de la noche al día (amanecer) como en los delgados; y esto se correlacionó con un sobreconsumo de alimento. Por otra parte, en el fotoperiodo artificial los obesos mostraron un mejor patrón de descenso de actividad previo al encendido de la luz en comparación al fotoperiodo natural. Esto sugiere que la transducción de la luz vía células ganglionares de la retina hacia el SCN hipotalámico, la cual juega un papel importante en la fisiología y conducta circadiana (Do y Yau 2010), podría estar ligeramente afectado en ratones obesos en la fotosincronización durante el amanecer en condiciones de luz natural, y tal efecto es enmascarado en el fotoperiodo artificial.

Por otra parte, el porcentaje de la actividad locomotriz de la fase diurna en ratones obesos fue más alta en el fotoperiodo natural que el fotoperiodo artificial, aunque estos consumieron igual cantidad de alimento que los ratones delgados. Estas dos características conductuales pudieron deberse a las condiciones no controladas de luz en este fotoperiodo. Sin embargo, aunque no se conoce completamente la biología o ecología de la especie (*Neotomodon alstoni*) en condiciones naturales, la alimentación diurna en fotoperiodo natural mayor que en fotoperiodo artificial de los ratones delgados pudo deberse a la diferencia de longitud del periodo (medido

en una temporada de invierno con duración de 11 h de luz aproximadamente), y por tanto como una respuesta circanual que permanece en estos ratones de padres silvestres. Se sabe que existen cambios en la vía neuroendocrina dependientes de fotoperiodo en poblaciones naturales del ratón de pies blancos (*Peromyscus leucopus*; Heideman, 2004), una especie cercana al *Neotomodon alstoni*. También, la conducta de sobreconsumo de alimento se ha visto en la marmota de América (*Marmota monax*) y en topillos de la pradera mantenidos en fotoperiodo de invierno y con acceso al alimento *ad libitum* (Dark et al. 1983; Concannon et al. 2001). No obstante, el consumo total de alimento en ratones delgados en luz natural no tuvo diferencias entre fotoperiodos.

Por otro lado, a pesar de que los ratones obesos en general hayan tenido una actividad locomotriz disminuida durante la noche y aumentada durante el día, siguieron presentando una oscilación circadiana conductual, la cual sugiere que no exista una cronodisrupción severa en la función del sistema circadiano interno. En este aspecto *Neotomodon alstoni* obeso se comportó de manera similar a otros modelos de obesidad, como: los ratones C57BL/6J con vulnerabilidad genética a la obesidad inducida por dieta alta en grasas (HFD, por sus siglas en inglés; Collins et al. 2004), con actividad reducida en la noche y aumentada en el día, sin cambios significativos en la expresión de Genes Reloj en el SCN hipotalámico (Kohsaka et al. 2007); ratas con sobrepeso inducidas con HFD (Bravo et al. 2014); y como los ratones obesos con el gen *clock* mutante homocigoto, los cuales también presentaron actividad reducida en la noche y aumentada durante el día en condiciones LO 12:12 (Turek et al. 2005). Sin embargo, estos ratones obesos *clock*^{-/-} si presentaron una desalineación en el perfil de actividad locomotriz al comienzo de la fase oscura, mientras que los *N. alstoni* obesos no. Esto sugiere, al menos, que la obesidad en esta especie no presenta mutación homocigota en el gen *clock* en el SCN hipotalámico; sin embargo, futuras mediciones de Genes Reloj en este tejido son requeridas.

El sobreconsumo de alimento diurno de los obesos en fotoperiodo artificial también fue similar con los estudios en ratas obesas Zucker (Fukagawa et al.

1992), ratones *clock*^{-/-} (Turek et al. 2005) y ratones con HFD (Kohsaka et al. 2007); sin embargo, estos modelos presentaron una reducción en el consumo de alimento nocturno (es decir, un ciclo invertido de alimentación), mientras que los ratones obesos *N. alstoni* mantuvieron la alimentación nocturna de igual manera que los ratones delgados. Además, este sobreconsumo de los obesos pudo estar ligado a los altos niveles de leptina (hormona que regula la homeostasis energética y la inhibición del apetito) medidos en estudios previos (Carmona-Alcocer et al. 2012; Fuentes-Granados et al. 2012), en donde se sugiere que exista una resistencia del receptor de leptina. De igual manera, estudios preliminares han demostrado que en ratones macho obesos *N. alstoni* existe una menor respuesta de los receptores de leptina y de su efecto en la secreción de pro-opiomelanocortinas (POMC, por sus siglas en inglés) en el hipotálamo (datos no publicados), el cual es clave en la respuesta inhibitoria del apetito (Schellekens et al. 2012). Una alteración en la señalización de leptina en el hipotálamo puede causar desordenes en la cantidad y la arquitectura del sueño, y disminución en el ritmo de la actividad locomotriz (Laposky et al. 2008), tal como se observó en estos ratones obesos.

Por otra parte, los ratones obesos, a pesar del sobreconsumo total en un día en LO 12:12, tendieron a consumir menos alimento por gramo de peso corporal. Esto sugiere que los ratones obesos satisficieron más rápidamente las demandas energéticas que los delgados, debido a que hay un gasto de energía menor durante la fase oscura. Sin embargo, el ritmo de alimentación tiene un avance de fase, que junto con el aumento de actividad locomotriz diurna, sugiere una desalineación con respecto al ciclo de luz-oscuridad, facilitando la ganancia de pesos en estos ratones.

Ritmos de expresión de la Proteína Reloj BMAL1 y de las proteínas relacionadas al metabolismo lipídico en el hígado:

La obesidad aumenta la susceptibilidad genética de un individuo para desarrollar los trastornos que conducen al síndrome metabólico (diabetes tipo 2, enfermedad cardiovascular, hipertensión, hiperleptinemia, acumulación de triacilglicéridos en tejidos no adiposos, etc.). Esta condición depende, en gran medida, de la capacidad del hígado en el manejo del metabolismo lipídico y en amortiguar la carga lipogénica que le impone la falta de tejido adiposo funcional (Bastarrachea et al. 2005); además, del sistema circadiano en la regulación diaria del metabolismo energético (Kennaway et al. 2007; Green et al. 2008).

La Proteína Reloj BMAL1 hepática de los ratones delgados *N. alstoni* presentaron un ritmo diario de expresión similar en otros estudios (Yang et al. 2006; Kohsaka et al. 2007; Liu et al. 2007; Yang et al. 2009), con acrofase en el transición de la noche y el día. Por otro lado, el ritmo de expresión de BMAL1 de los ratones obesos no mostró desalineación con respecto a los delgados, tal y como se observó en ratas macho Wistar alimentadas durante la fase de luz (Salgado-Delgado et al. 2013), pero sí una baja y alterada oscilación circadiana, la cual no es tan significativa como la que se encontró en ratones C57BL/6J de Jackson Laboratory con HFD (Kohsaka et al. 2007). Sin embargo, esta alterada oscilación se debió al aumento de la intensidad de BMAL1 en el ZT 13 (tiempo de depresión o batifase de la oscilación de BMAL1 en ratones delgados), en la cual (Hsieh et al. 2010) han encontrado en ratones obesos inducidos por HFD durante 11 meses de la cepa C57BL/6 inespecífica un aumento de esta proteína en su punto de expresión más bajo, con respecto a ratones alimentados con dieta regular. También, los ratones obesos de este estudio tuvieron dos bandas conjuntas de la proteína BMAL1 en el ZT 13, las cuales pueden deberse a polimorfismos de la misma proteína. Estos polimorfismos de BMAL1 están asociados con susceptibilidad a hipertensión y diabetes tipo 2 en ratas (Woon et al. 2007).

Los ratones delgados *N. alstoni* presentaron ritmos de expresión de PGC-1 α (de manera similar a los estudios de Liang y Ward 2006; Yang et al. 2009) y PPAR α

(similarmenete a los estudios de Yang et al. 2006; Yang et al. 2009; Chen y Yang 2014) de manera conjunta previo al inicio de la fase oscura, considerado como el tiempo máximo de ayuno por el animal donde necesita iniciar con el proceso de oxidación de los ácidos grasos y activación de la gluconeogénesis para la obtención de energía, una vez terminada la fuente de glucógeno hepático. Sin embargo, las expresiones de estas proteínas, PGC-1 α y PPAR α , en ratones obesos no se correlacionaron de manera conjunta como en los delgados. Esto se debió a que los obesos mostraron menor intensidad en la fase de luz y mayor en la fase de la noche de PGC-1 α , y a un retraso de fase hacia la noche en PPAR α . Esta expresión de PPAR α no fue similar a los ratones con HFD (Kohsaka et al. 2007), los cuales muestran una amplitud mayor de la oscilación de esta proteína y no un desalineamiento como los ratones obesos *N. alstoni*. Por otro lado, la sobreexpresión de PGC-1 α puede provocar resistencia de insulina en el hígado, el aumento de la salida de glucosa hepática e hiperglucemia (Koo et al. 2004), lo cual puede ser consistente con una tendencia en el aumento de la glucosa sérica en el ZT 18 (mitad de la noche) medida en los estudios de (Carmona-Alcocer et al. 2012). En la misma vía del catabolismo de lípidos, se expresa la proteína de internalización de ácidos grasos a la mitocondria, CPT1, el cual es un gen blanco de PPAR α (Lemberger et al. 1996; Yoon et al. 2006) y de PGC-1 α , por coactivación del factor nuclear de hepatocito 4 alfa (HNF4a, por sus siglas en inglés) y la proteína de elementos en respuesta a AMP cíclico (CREB, por sus siglas en inglés; (Louet et al. 2002)). El CPT1 posee un ritmo de expresión entre la fase del día y la noche (Yang et al. 2009), lo cual ocurrió similarmente en el ritmo de expresión de CPT1 de los ratones delgados en este estudio. Sin embargo, existió una tendencia disminuida de la intensidad de CPT1 al final de la noche en ratones obesos, lo cual sugiere un desbalance en la β -oxidación de ácidos grasos en ese tiempo en comparación con ratones delgados.

Por otra parte, el ritmo de presencia de la proteína lipogénica (SREBP-1c) en ratones delgados al final de la fase de oscuridad fue similar con los estudios de (Le Martelot et al. 2009; Yoon et al. 2012; Gilardi et al. 2014), con una depresión

de la oscilación durante la transición de la fase del día y la fase de la noche, tiempo considerado como el ayuno para estos animales nocturnos. Sin embargo, los ratones obesos presentaron un avance de fase de la oscilación de SREBP-1c hacia el comienzo de la fase oscura, tal y como ocurre en ratones con HFD (Kohsaka et al. 2007), donde el tiempo de alimentación ocurre durante la fase diurna. Además, este avance de fase de la proteína coincide con los altos niveles de insulina, el cual es un activador del complejo INSIG-SREBP-1c (Eberlé et al. 2004), a principios de la fase nocturna medidos en el estudio de (Carmona-Alcocer et al. 2012). Por otro lado, la desalineación de SREBP-1c en los ratones obesos pudo deberse a cambios en el ciclo de alimentación y a la tendencia disminuida de la proteína BMAL1, la cual ejerce una alineación robusta diaria de la oscilación SREBP-1c (Gilardi et al. 2014).

Por otro lado, el ritmo de expresión de la proteína PPAR γ en hígado en ambos grupos, delgados y obesos, presentó baja ritmicidad y su pico de expresión fue durante la primera mitad de la fase del día, lo cual coincide con otros estudios en ratones de la cepa C57BL/6 inespecífica (Yang et al. 2006; Yang et al. 2009), pero no en ratones de la cepa C57BL/6J de Jackson Laboratory (Kohsaka et al. 2007). La expresión de PPAR γ hepática en ratones obesos no fue mayor que en ratones delgados, tal y cómo se ha visto en otros estudios en ratones obesos con esteatosis hepática db/db, ob/ob y 5-HT2cR (Memon et al. 2000) y ratones obesos con HFD (Kohsaka et al. 2007), ya que el papel de esta proteína es la regulación de la homeostasis de lípidos y genes lipogénicos al introducir ácidos grasos o triacilglicéridos plasmáticos al hígado mediante la expresión del receptor de LDL (LDLR), para prevenir efectos adversos de ácidos grasos libres en células y membranas; así como el transporte y la utilización de estos como fuente de energía, en sinergia con la proteína PPAR α (Gavrilova et al. 2003; Patsouris et al. 2006). Esto puede sugerir que no exista una esteatosis hepática severa en los ratones obesos de este estudio; sin embargo, se ha observado en un estudio anterior que existe esteatosis hepática en ratones silvestres *Neotomodon alstoni* mantenidos en condiciones de cautiverio, los cuales presentan obesidad y lipomas subcutáneos (Carmona-Castro 2006).

Relación de los ritmos de la actividad locomotriz, de alimentación y de la expresión de las proteínas en el hígado de *Neotomodon alstoni*:

El ritmo de actividad locomotriz coincidió perfectamente con el ritmo de alimentación de los ratones delgados, lo cual sugiere que el reloj del sistema circadiano central (núcleo supraquiasmático) se sincroniza al tiempo de LO 12:12 y puede imponer periodo y fase al oscilador periférico hepático, BMAL1 (Kohsaka et al. 2007; Mohawk et al. 2012). También, se sugiere que la oscilación de BMAL1 hepática de los delgados está siendo regulada por la expresión de las proteínas PGC-1 α y PPAR α , tal y como se ha visto en la literatura (Canaple et al. 2006; Liu et al. 2007); y viceversa, la proteína BMAL1 puede regular la oscilación de PPAR α , a través de la unión a su promotor de cajas E en el gen *ppara* (Canaple et al. 2006). De la misma forma, la oscilación de CPT1 fue seguida de la oscilación de PPAR α y PGC-1 α , las cuales se sabe que actúan sinérgicamente para la activación del metabolismo lipídico y la gluconeogénesis (Vega et al. 2000). Esta oscilación de CPT1, entre la fase de luz y la fase de oscuridad, se correlacionó adecuadamente con el inicio de la actividad locomotriz nocturna, en la cual se necesita energía y se sugiere que se obtiene a través de la oxidación de los ácidos grasos en el hígado. Por otro lado, la proteína SREBP-1c fue expresada hacia el final de la fase de oscuridad e inicio de la fase de luz, donde la alimentación ha cesado en estos ratones delgados, y se requiere de la síntesis de triacilglicéridos para su almacenaje y transporte hacia el tejido adiposo. De la misma manera, fue expresado PPAR γ hepática para mantener la homeostasis de los ácidos grasos libres y triacilglicéridos circulantes en los ratones delgados. También, se ha visto que SREBP-1c puede activar a la proteína PPAR γ , pero no a PPAR α , a través de la producción de ligandos endógenos en el tejido adiposo (Kim et al. 1998), lo cual sugiere una correlación con la oscilación de PPAR γ precedida de la oscilación de SREBP-1c en el hígado en estos ratones delgados.

Por otra parte, la actividad locomotriz de los ratones obesos fue aumentada en el día y atenuada en la noche, con un consumo de alimento mayor antes y al inicio de la fase de oscuridad con respecto a los delgados, lo cual coincide con otros

estudios con perturbaciones en el sistema circadiano (Fukagawa et al. 1992; Turek et al. 2005; Kohsaka et al. 2007; Salgado-Delgado et al. 2013; Bravo et al. 2014). Esto sugiere que esta desregulación en el comportamiento circadiano en este ratón nocturno conlleva a un desgaste energético menor por la hipoactividad que, en conjunto con el sobreconsumo de alimento, facilita en gran medida el desarrollo de la obesidad, tal y como sucede en seres humanos cuando presentan desincronización en ciclos de actividad-sueño y alimentación (Rosenbaum et al. 1997). La alteración de la actividad locomotriz y de alimentación de ratones obesos sugiere que el reloj del marcapasos principal está desalineado al ciclo del fotoperiodo artificial LO 12:12; sin embargo, esto requiere de una medición del ritmo diario de expresión la Proteína Reloj BMAL1 en el SCN hipotalámico, ya que (Kohsaka et al. 2007) no observó modificación de los Genes Reloj en el hipotálamo medio-basal de ratones obesos inducidos con HFD. Además, la proteína BMAL1 hepática de los obesos presentó una oscilación similar a la de los ratones delgados, lo cual sugiere que no exista una alteración en la oscilación del sistema circadiano central de ratones obesos, el cual impone fase y periodo a los osciladores periféricos (Hogenesch y Ueda, 2011; Mohawk et al., 2012). Por otro lado, las proteínas PGC-1 α y CPT1 presentaron una disminución en los puntos de ZT 4 y ZT 23, respectivamente, lo cual se supone una falta de señalización de AMPK o glucagón. La señalización de la leptina provoca un aumento de AMPK, el cual permite la activación de PGC-1 α y CPT1 para la oxidación de los ácidos grasos y la disminución de la expresión de Malonil CoA (involucrado en la síntesis de lípidos; revisado en (Bastarrachea et al. 2005). Sin embargo, los niveles altos de leptina a lo largo del día medidos en ratones obesos machos en el estudio de (Carmona-Alcocer et al. 2012), sugieren una resistencia al receptor de leptina, por lo tanto una interrupción en la señal de AMPK para la activación de PGC-1 α y CPT1. También, se sabe que la expresión de estas dos proteínas está dada por la vía de AMP cíclico (segundo mensajero) a través de la activación por glucagón (Louet et al. 2002), la cual puede estar interrumpida en estos ratones obesos. Además, el estado redox intracelular de NAD⁺/NADH (sensible al metabolismo de glucosa) puede activar a la proteína desacetilasa Sirt1, el cual a la vez interactúa

en sitios específicos de lisina de la proteína PGC-1 α para activarla de una manera dependiente de NAD⁺ (Rodgers et al. 2005; Li 2013). De esta forma, se sugiere que las diferencias de las intensidades de la proteína PGC-1 α estén alteradas en los ratones obesos, similarmente como sucede en ratas macho Wistar con obesidad inducida por actividad locomotriz y alimentación forzadas (Salgado-Delgado et al. 2013). Por otro parte, el aumento de PGC-1 α en el ZT 13, la cual también juega un papel importante en la expresión de Genes de Reloj (Liu et al. 2007), está correlacionada con el aumento de BMAL1 en los obesos en el ZT 13, considerando que el tiempo de transcripción y traducción de esta proteína que contiene 626 aminoácidos puede ser de unos cuantos minutos (Lodish et al. 2000). Por otra parte la desalineación de PPAR α (retraso de fase) de los ratones obesos hacia la fase de la noche estuvo correlacionada al aumento de los ácidos grasos libres (FFA) entre la fase del día y la fase de noche, los cuales se sabe que algunos de ellos pueden funcionar como ligandos para la activación de PPARs (Varga et al. 2011), aunque también puede ser activado por los niveles de glucocorticoides (Lemberger et al. 1996). La presencia de la proteína PPAR α en el ZT 13, también se correlacionó al aumento de BMAL1 en el ZT 13 en los ratones obesos, en el cual se sabe que PPAR α puede interactuar en los elementos en respuesta a PPAR localizados en el promotor del gen *bmal1* (PPRE; Canaple et al. 2006; Chen y Yang 2014). Aunque, también BMAL1 puede activar la transcripción del gen *ppara* a través de la unión a su promotor de cajas E (Canaple et al. 2006), lo cual se relaciona con la presencia de la proteína PPAR α aumentada en el ZT 18 de los ratones obesos. También, la proteína SREBP-1c presentó un desalineamiento (avance de fase) hacia al comienzo de la fase nocturna en los ratones obesos, lo cual se correlaciona con el sobreconsumo de alimento y altos niveles de insulina (medidos en ratones obesos machos en el estudio de Carmona-Alcocer et al. 2012), previo a la fase de oscuridad. La activación de SREBP-1c está dado por la actividad de realimentación (consumo de alimento después de una pausa de haber comido) y por niveles de insulina para la síntesis de ácidos grasos y triacilglicéridos en el hígado (Eberlé et al. 2004; Le Martelot et al. 2009). Cabe mencionar que, a pesar de que existiera resistencia a

insulina en el hígado, SREBP-1c puede seguir activándose en presencia del sustrato del receptor de insulina (IRS-1, por sus siglas en inglés) y por diferencias de sensibilidad específicas de tejido, permitiendo la expresión de genes lipogénicos, síntesis de ácidos grasos y acumulación de triacilglicéridos hepáticos (Shimomura et al. 1997; Browning y Horton 2004; Eberlé et al. 2004). También, la presencia aumentada de SREBP-1c de los obesos durante la fase inicial de la noche puede ser la responsable de la producción de triacilglicéridos circulantes en el ZT 18 (medidos en ratones obesos machos en el estudio de Carmona-Alcocer et al. 2012), los cuales son exportados a través de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, por sus siglas en inglés) hacia otros tejidos para su uso o almacenaje en el tejido adiposo, pero su aumento en el plasma es relacionado a la resistencia de insulina (revisado en Swift 2012). Por otro lado, de acuerdo al trabajo (Kim et al. 1998), donde SREBP-1c puede activar a la PPAR γ a través de la producción de ligandos endógenos, la oscilación de PPAR γ hepática de los ratones obesos no fue afectada por la oscilación desalineada de SREBP-1c. A pesar de que la oscilación de la proteína PPAR γ de los ratones obesos no fue diferente de los ratones delgados, en el cual se ha encontrado en niveles elevados en esteatosis hepática de modelos de ratones obesos (Memon et al. 2000; Gavrilova et al. 2003), se sabe que el hígado graso puede establecerse por sobreexpresión de SREBP-1c y la proteína de enlace a elementos en respuesta a carbohidratos (ChREBP, por sus siglas en inglés), que en acción sinérgica pueden convertir el exceso de glucosa en ácidos grasos e iniciar el depósito de triacilglicéridos en el hígado (Horton et al. 2002; Browning y Horton 2004). Además, no está completamente definido si la deposición de triacilglicéridos es provocado por PPAR γ y su expresión es incrementada en esteatosis hepática en los seres humanos (Browning y Horton 2004). Por un lado, cabe mencionar que la acumulación de triacilglicéridos hepáticos resulta de los ácidos grasos libres en plasma (FFA) provenientes de los adipocitos cuando existe resistencia a insulina, por lo tanto la tasa de recepción FFA hepáticos es sobrerregulada y es proporcional a la concentración de FFA en plasma, en el cual SREBP-1c se sobreexpresa para la síntesis y acumulación de triacilglicéridos ante la falta de un

tejido adiposo funcional (Browning y Horton 2004; Bastarrachea et al. 2005; Swift 2012). Esto está relacionado a los aumentos de FFA en la parte de la fase del día y parte de la fase de la noche. Además, se sabe que el aumento de la expresión de la proteína PPAR γ puede participar en la regulación de la toma de lípidos séricos por el hígado y proteger a otros tejidos no adiposos de la acumulación de ácidos grasos (Gavrilova et al. 2003). Sin embargo, en este estudio los ratones obesos no mostraron diferencias en la presencia de PPAR γ , por lo que se sugiere una respuesta menor en la toma de FFA y por ende, una mayor circulación de estos en el plasma. Por otro lado, se ha visto que la condición de esteatosis hepática en ratones C57BL/6J alimentados con una dieta aterogénica (Research Diets, New Brunswick, NJ) afecta el estado redox y algunos factores del metabolismo pero no la expresión en amplitud y fase de Genes Reloj en el hígado (Ando et al. 2009), en contraparte con otros modelos de en roedores con obesidad inducida con alimentación forzada en la fase diurna (Salgado-Delgado et al. 2013) u obesidad inducida por dieta alta en grasas (Kohsaka et al. 2007; Froy 2010; Hsieh et al. 2010; Kennedy et al. 2010; Wang et al. 2013), los cuales presentan alteración en los Genes de Reloj. Esto sugiere que el mecanismo molecular del reloj en estos ratones (*Neotomodon alstoni*) esté protegido contra el daño ocasionado por la obesidad y esteatosis hepática, ya que la oscilación de BMAL1 persiste de forma similar a los ratones delgados.

Conclusiones y perspectivas

Los resultados sugieren que la obesidad en los ratones machos *N. alstoni* está asociada a una desregulación de la actividad locomotriz y a un aumento en el consumo de alimento diurno, lo cual sugiere una alteración en el sistema molecular del reloj central. Esto requiere futuros análisis en el perfil diario de la proteína BMAL1 y/u otras Proteínas Reloj en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo. También, varios estudios han demostrado que la ingesta de alimento durante la fase de descanso induce disociación de los procesos rítmicos en el hígado independientemente del ritmo del núcleo supraquiasmático (Damiola 2000; Wu et al. 2010). Sin embargo, el consumo de alimento diurno de los obesos únicamente en unas horas antes de la fase de oscuridad sugiere que no es lo suficientemente fuerte para desregular la oscilación de la Proteína Reloj BMAL1 hepática o existe una protección de las Proteínas Reloj a través de una regulación post-traduccional, en los cuales se ha visto que la oscilación de la Proteína CRY puede regularse a través de la inhibición de su degradación y modificar la oscilación de otros Genes Reloj (Gatfield y Schibler 2007). También, las expresiones aumentadas de las proteínas PGC-1 α y PPAR α y una oscilación normal de CPT1 en los ratones obesos pueden ayudar a disminuir los niveles de lípidos en el hígado y en el plasma; sin embargo, existen niveles altos de ácidos grasos libres, por lo que se requiere la medición de cuerpos cetónicos para la comprobación de la oxidación de ácidos grasos. Existen cambios en la oscilación de la proteína SREBP-1c pero no de PPAR γ en el hígado de ratones obesos, por lo que se sugiere que otras proteínas estén involucradas en el metabolismo de lípidos. Además, se requieren análisis de inmunoblots (*Western Blot*) que ayuden a determinar el perfil diario de la expresión de las Proteína de Reloj y/o de proteínas lipogénicas (SREBP-1c y PPAR γ) en el tejido adiposo de ratones obesos, del cual no existe información completa. Por otra parte, los ratones de este estudio se consideraron adultos jóvenes (**Fig. 20**), los cuales poseen una esperanza de vida de aproximadamente de cinco años (Ayala-Guerrero et al.

1998; y observaciones en laboratorio), con lo que se sugiere observaciones fisiológicas y conductuales en edades tempranas (antes de la diferenciación de ratones delgados y obesos) y en edades avanzadas para conocer el desarrollo de la obesidad y sus marcadores específicos, así como su impacto en el metabolismo a largo plazo.



Figura 20. El ratón macho de los volcanes *Neotomodon alstoni*. Ratón delgado (lado izquierdo) y ratón obeso (lado derecho).

Bibliografía.

- Abbott, B. D. (2009). Review of the expression of peroxisome proliferator-activated receptors alpha (PPAR alpha), beta (PPAR beta), and gamma (PPAR gamma) in rodent and human development. *Reproductive Toxicology* (Elmsford, N.Y.), 27(3-4), 246–57.
<http://doi.org/10.1016/j.reprotox.2008.10.001>
- Aguilar-Roblero, R., Díaz-Muñoz, M., & Fanjul-Moles, M. L. (2015). *Mechanisms of Circadian Systems in Animals and Their Clinical Relevance* (pp. 1–396). Cham: Springer International Publishing. <http://doi.org/10.1007/978-3-319-08945-4>
- Ando, H., Takamura, T., Matsuzawa-Nagata, N., Shima, K. R., Nakamura, S., Kumazaki, M., ... Kaneko, S. (2009). The hepatic circadian clock is preserved in a lipid-induced mouse model of non-alcoholic steatohepatitis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 380(3), 684–8.
<http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.01.150>
- Aschoff, J. (1965). Circadian Rhythms in Man: A self-sustained oscillator with an inherent frequency underlies human 24-hour periodicity. *Science*, 148(3676), 1427–1432. <http://doi.org/10.1126/science.148.3676.1427>
- Aschoff, J. (1966). Circadian Activity Pattern with Two Peaks. *Ecology*, 47(4), 657–662. <http://doi.org/10.2307/1933949>
- Ayala-Guerrero, F., Vargas-Reyna, L., Ramos, J. I., & Mexicano, G. (1998). Sleep patterns of the volcano mouse (*Neotomodon alstoni alstoni*). *Physiology & Behavior*, 64(4), 577–580. [http://doi.org/10.1016/S0031-9384\(98\)00081-X](http://doi.org/10.1016/S0031-9384(98)00081-X)
- Báez-Ruiz, A., Luna-Moreno, D., Carmona-Castro, A., Cárdenas-Vázquez, R., Díaz-Muñoz, M., Carmona-Alcocer, V., ... Manuel, M.-A. (2014). Hypothalamic expression of anorexigenic and orexigenic hormone receptors in obese females *Neotomodon alstoni*: effect of fasting. *Nutritional Neuroscience*, 17(1), 31–6.
<http://doi.org/10.1179/1476830513Y.0000000063>
- Balsalobre, A. (2000). Resetting of Circadian Time in Peripheral Tissues by Glucocorticoid Signaling. *Science*, 289(5488), 2344–2347.
<http://doi.org/10.1126/science.289.5488.2344>
- Bastarrachea, R. A., Fuenmayor, R., Brajkovich, I., & Comuzzie, A. G. (2005). ENTENDIENDO LAS CAUSAS DE LA OBESIDAD A TRAVÉS DE LA

BIOLOGÍA CELULAR DEL ADIPOCITO. Revisión. Rev Venez Endocrinol Metab, 3(3), 20–29.

- Bennett, M. J., & Santani, A. B. (2013, March 7). Carnitine Palmitoyltransferase 1A Deficiency. University of Washington, Seattle. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1527/>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248–254. [http://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Bravo, R., Cubero, J., Franco, L., Mesa, M., Galán, C., Rodríguez, A. B., ... Barriga, C. (2014). Body weight gain in rats by a high-fat diet produces chronodisruption in activity/inactivity circadian rhythm. *Chronobiology International*, 31(3), 363–70. <http://doi.org/10.3109/07420528.2013.859151>
- Browning, J. D., & Horton, J. D. (2004). Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *The Journal of Clinical Investigation*, 114(2), 147–52. <http://doi.org/10.1172/JCI22422>
- Canaple, L., Rambaud, J., Dkhissi-Benyahya, O., Rayet, B., Tan, N. S., Michalik, L., ... Laudet, V. (2006). Reciprocal regulation of brain and muscle Arnt-like protein 1 and peroxisome proliferator-activated receptor alpha defines a novel positive feedback loop in the rodent liver circadian clock. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 20(8), 1715–27. <http://doi.org/10.1210/me.2006-0052>
- 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. <http://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.09.022>
- Carmona-Castro, A. (2006). Obesidad, esteatosis hepática y parámetros sanguíneos en el ratón de los volcanes (*Neotomodon alstoni*) mantenido en cautiverio [Master in Science Thesis]. Retrieved November 25, 2015, from [http://132.248.9.34/pd2006/0604182/0604182.pdf#search="Agustín Carmona Castro "](http://132.248.9.34/pd2006/0604182/0604182.pdf#search=)
- Chen, L., & Yang, G. (2014). PPARs Integrate the Mammalian Clock and Energy Metabolism. *PPAR Research*, 2014, 653017. <http://doi.org/10.1155/2014/653017>

- Collins, S., Martin, T. L., Surwit, R. S., & Robidoux, J. (2004). Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics. *Physiology & Behavior*, 81(2), 243–8. <http://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.02.006>
- Concannon, P., Levac, K., Rawson, R., Tennant, B., & Bensadoun, A. (2001). Seasonal changes in serum leptin, food intake, and body weight in photoentrained woodchucks. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*, 281(3), R951–959. Retrieved from <http://ajpregu.physiology.org/content/281/3/R951.short>
- Damiola, F. (2000). Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes & Development*, 14(23), 2950–2961. <http://doi.org/10.1101/gad.183500>
- Dark, J., Zucker, I., & Wade, G. N. (1983). Photoperiodic regulation of body mass, food intake, and reproduction in meadow voles. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*, 245(3), R334–338. Retrieved from <http://ajpregu.physiology.org/content/245/3/R334.short>
- Dibner, C., Schibler, U., & Albrecht, U. (2010). The Mammalian Circadian Timing System: Organization and Coordination of Central and Peripheral Clocks. *Annual Review of Physiology*, 72(1), 517–549. <http://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135821>
- Dif, N., Euthine, V., Gonnet, E., Laville, M., Vidal, H., & Lefai, E. (2006). Insulin activates human sterol-regulatory-element-binding protein-1c (SREBP-1c) promoter through SRE motifs. *The Biochemical Journal*, 400(1), 179–88. <http://doi.org/10.1042/BJ20060499>
- Do, M. T. H., & Yau, K.-W. (2010). Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *Physiological Reviews*, 90(4), 1547–81. <http://doi.org/10.1152/physrev.00013.2010>
- Eberlé, D., Hegarty, B., Bossard, P., Ferré, P., & Foufelle, F. (2004). SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie*, 86(11), 839–48. <http://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.09.018>
- Finck, B. N., & Kelly, D. P. (2007). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 (PGC-1) regulatory cascade in cardiac physiology and disease. *Circulation*, 115(19), 2540–8. <http://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.670588>

- Fontaine, C., Dubois, G., Duguay, Y., Helledie, T., Vu-Dac, N., Gervois, P., ...
Staels, B. (2003). The orphan nuclear receptor Rev-Erbalpha is a
peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma target gene and
promotes PPARgamma-induced adipocyte differentiation. *The Journal of
Biological Chemistry*, 278(39), 37672–80.
<http://doi.org/10.1074/jbc.M304664200>
- Froy, O. (2010). Metabolism and circadian rhythms--implications for obesity.
Endocrine Reviews, 31(1), 1–24. <http://doi.org/10.1210/er.2009-0014>
- Fuentes-Granados, C., Duran, P., Carmona-Castro, A., Cárdenas-Vázquez, R., &
Miranda-Anaya, M. (2012). Obesity alters the daily sleep homeostasis and
metabolism of the volcano mouse *Neotomodon alstoni*. *Biological Rhythm
Research*, 43(1), 39–47. <http://doi.org/10.1080/09291016.2011.638135>
- 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. <http://doi.org/10.1080/09291010902863420>
- 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. *The American Journal of Physiology*, 263(6 Pt
2), R1169–75. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1481923>
- Gatfield, D., & Schibler, U. (2007). Physiology. Proteasomes keep the circadian
clock ticking. *Science (New York, N.Y.)*, 316(5828), 1135–6.
<http://doi.org/10.1126/science.1144165>
- Gavrilova, O., Haluzik, M., Matsusue, K., Cutson, J. J., Johnson, L., Dietz, K. R., ...
Reitman, M. L. (2003). Liver peroxisome proliferator-activated receptor
gamma contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and
regulation of body fat mass. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(36),
34268–76. <http://doi.org/10.1074/jbc.M300043200>
- Gervois, P., Torra, I. P., Fruchart, J. C., & Staels, B. (2000). Regulation of lipid and
lipoprotein metabolism by PPAR activators. *Clinical Chemistry and
Laboratory Medicine : CCLM / FESCC*, 38(1), 3–11.
<http://doi.org/10.1515/CCLM.2000.002>
- Gibbons, G. F., Patel, D., Wiggins, D., & Knight, B. L. (2002). The functional
efficiency of lipogenic and cholesterogenic gene expression in normal mice
and in mice lacking the peroxisomal proliferator-activated receptor–alpha

- (PPAR- α). *Advances in Enzyme Regulation*, 42, 227–247.
[http://doi.org/10.1016/S0065-2571\(01\)00033-4](http://doi.org/10.1016/S0065-2571(01)00033-4)
- Gilardi, F., Migliavacca, E., Naldi, A., Baruchet, M., Canella, D., Le Martelot, G., ... Desvergne, B. (2014). Genome-wide analysis of SREBP1 activity around the clock reveals its combined dependency on nutrient and circadian signals. *PLoS Genetics*, 10(3), e1004155.
<http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004155>
- Goel, N., Stunkard, A. J., Rogers, N. L., Van Dongen, H. P. A., Allison, K. C., O'Reardon, J. P., ... Dinges, D. F. (2009). Circadian rhythm profiles in women with night eating syndrome. *Journal of Biological Rhythms*, 24(1), 85–94. <http://doi.org/10.1177/0748730408328914>
- Gómez-Abellán, P., Madrid, J. A., Ordovás, J. M., & Garaulet, M. (2012). [Chronobiological aspects of obesity and metabolic syndrome]. *Endocrinología Y Nutrición : Órgano de La Sociedad Española de Endocrinología Y Nutrición*, 59(1), 50–61.
<http://doi.org/10.1016/j.endonu.2011.08.002>
- Granados, H. (1994). THE VOLCANO MOUSE (NEOTOMODON-ALSTONI-ALSTONI, MERRIAM 1898), A NEW LABORATORY-ANIMAL - STRAIN GFC-UNAM. Retrieved from
<http://repositorio.fcencias.unam.mx:8080/xmlui/handle/11154/3453>
- Green, C. B., Takahashi, J. S., & Bass, J. (2008). The Meter of Metabolism. *Cell*, 134(5), 728–742. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.022>
- Heideman, P. D. (2004). Top-down Approaches to the Study of Natural Variation in Complex Physiological Pathways Using the White-footed Mouse (*Peromyscus leucopus*) as a Model *ILAR J* 45 (1): 4-13
[doi:10.1093/ilar.45.1.4](https://doi.org/10.1093/ilar.45.1.4)
- Hogenesch, J. B., & Ueda, H. R. (2011). Understanding systems-level properties: timely stories from the study of clocks. *Nature Reviews. Genetics*, 12(6), 407–16.
<http://doi.org/10.1038/nrg2972>
- Horton, J. D., Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (2002). SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *The Journal of Clinical Investigation*, 109(9), 1125–31.
<http://doi.org/10.1172/JCI15593>
- 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. *International Journal of Obesity* (2005), 34(2), 227–39.
<http://doi.org/10.1038/ijo.2009.228>
- Iwahana, E., Karatsoreos, I., Shibata, S., & Silver, R. (2008). Gonadectomy reveals sex differences in circadian rhythms and suprachiasmatic nucleus androgen receptors in mice. *Hormones and Behavior*, 53(3), 422–30.
<http://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2007.11.014>
- Kanasaki, K., & Koya, D. (2011). Biology of obesity: lessons from animal models of obesity. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2011, 197636.
<http://doi.org/10.1155/2011/197636>
- Kast-Woelbern, H. R., Dana, S. L., Cesario, R. M., Sun, L., de Grandpre, L. Y., Brooks, M. E., ... Leibowitz, M. D. (2004). Rosiglitazone induction of Insig-1 in white adipose tissue reveals a novel interplay of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and sterol regulatory element-binding protein in the regulation of adipogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(23), 23908–15. <http://doi.org/10.1074/jbc.M403145200>
- Kennaway, D. J., Owens, J. A., Voultsios, A., Boden, M. J., & Varcoe, T. J. (2007). Metabolic homeostasis in mice with disrupted Clock gene expression in peripheral tissues, 5005, 1528–1537.
<http://doi.org/10.1152/ajpregu.00018.2007>.
- Kennedy, A. J., Ellacott, K. L. J., King, V. L., & Hasty, A. H. (2010). Mouse models of the metabolic syndrome. *Disease Models & Mechanisms*, 3(3-4), 156–66.
<http://doi.org/10.1242/dmm.003467>
- Kim, J. B., Wright, H. M., Wright, M., & Spiegelman, B. M. (1998). ADD1/SREBP1 activates PPAR through the production of endogenous ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(8), 4333–4337.
<http://doi.org/10.1073/pnas.95.8.4333>
- Kohsaka, A., Laposky, A. D., Ramsey, K. M., Estrada, C., Joshu, C., Kobayashi, Y., ... Bass, J. (2007). High-fat diet disrupts behavioral and molecular circadian rhythms in mice. *Cell Metabolism*, 6(5), 414–21.
<http://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.09.006>
- Koo, S.-H., Satoh, H., Herzig, S., Lee, C.-H., Hedrick, S., Kulkarni, R., ... Montminy, M. (2004). PGC-1 promotes insulin resistance in liver through PPAR-alpha-dependent induction of TRB-3. *Nature Medicine*, 10(5), 530–4.
<http://doi.org/10.1038/nm1044>

- Kramer, A., & Mellow, M. (2013). *Circadian Clocks*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Kuhlman, S. J., Mackey, S. R., & Duffy, J. F. (2007). Biological Rhythms Workshop I: introduction to chronobiology. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 72(0), 1–6. <http://doi.org/10.1101/sqb.2007.72.059>
- Lamia, K. A., Storch, K.-F., & Weitz, C. J. (2008). Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(39), 15172–7. <http://doi.org/10.1073/pnas.0806717105>
- Laposky, A. D., Bradley, M. A., Williams, D. L., Bass, J., & Turek, F. W. (2008). Sleep-wake regulation is altered in leptin-resistant (db/db) genetically obese and diabetic mice. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 295(6), R2059–66. <http://doi.org/10.1152/ajpregu.00026.2008>
- Le Martelot, G., Claudel, T., Gatfield, D., Schaad, O., Kornmann, B., Lo Sasso, G., ... Schibler, U. (2009). REV-ERB α participates in circadian SREBP signaling and bile acid homeostasis. *PLoS Biology*, 7(9), e1000181. <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000181>
- Lehrke, M., & Lazar, M. A. (2005). The many faces of PPAR γ . *Cell*, 123(6), 993–9. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2005.11.026>
- Lemberger, T., Desvergne, B., & Wahli, W. (1996). Peroxisome proliferator-activated receptors: a nuclear receptor signaling pathway in lipid physiology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 12, 335–63. <http://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.12.1.335>
- Leone, T. C., Lehman, J. J., Finck, B. N., Schaeffer, P. J., Wende, A. R., Boudina, S., ... Kelly, D. P. (2005). PGC-1 α deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. *PLoS Biology*, 3(4), e101. <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030101>
- Li, X. (2013). SIRT1 and energy metabolism. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 45(1), 51–60. <http://doi.org/10.1093/abbs/gms108>
- Liang, H., Balas, B., Tantiwong, P., Dube, J., Goodpaster, B. H., O'Doherty, R. M., ... Ward, W. F. (2009). Whole body overexpression of PGC-1 α has opposite effects on hepatic and muscle insulin sensitivity. *American Journal*

- of Physiology. Endocrinology and Metabolism, 296(4), E945–54.
<http://doi.org/10.1152/ajpendo.90292.2008>
- Liang, H., & Ward, W. F. (2006). PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism. *Advances in Physiology Education*, 30(4), 145–51.
<http://doi.org/10.1152/advan.00052.2006>
- Lin, J., Handschin, C., & Spiegelman, B. M. (2005). Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metabolism*, 1(6), 361–70.
<http://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.05.004>
- Liu, C., Li, S., Liu, T., Borjigin, J., & Lin, J. D. (2007). Transcriptional coactivator PGC-1alpha integrates the mammalian clock and energy metabolism. *Nature*, 447(7143), 477–81. <http://doi.org/10.1038/nature05767>
- Liu, Y.-J., Araujo, S., Recker, R., & Deng, H.-W. (2003). Molecular and Genetic Mechanisms of Obesity: Implications for Future Management. *Current Molecular Medicine*, 3(4), 325–340.
<http://doi.org/10.2174/1566524033479735>
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Darnell, J. (2000). *The Three Roles of RNA in Protein Synthesis*. W. H. Freeman. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21603/>
- Louet, J.-F., Hayhurst, G., Gonzalez, F. J., Girard, J., & Decaux, J.-F. (2002). The coactivator PGC-1 is involved in the regulation of the liver carnitine palmitoyltransferase I gene expression by cAMP in combination with HNF4 alpha and cAMP-response element-binding protein (CREB). *The Journal of Biological Chemistry*, 277(41), 37991–8000.
<http://doi.org/10.1074/jbc.M205087200>
- Lowrey, P. L., & Takahashi, J. S. (2004). Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 5, 407–41.
<http://doi.org/10.1146/annurev.genom.5.061903.175925>
- Lowrey, P. L., & Takahashi, J. S. (2011). Genetics of circadian rhythms in Mammalian model organisms. *Advances in Genetics*, 74, 175–230.
<http://doi.org/10.1016/B978-0-12-387690-4.00006-4>
- Luis, J., Ramírez, L., Carmona, A., Ortiz, G., & Delgado, J. (2009). Paternal behavior and testosterone plasma levels in the Volcano Mouse *Neotomon alstoni* (Rodentia : Muridae), 57(June), 433–439.

- Luna-Illades, C., Carmona-Castro, A., & Miranda-Anaya, M. (2014). Differences in locomotor activity before and during the access to food in a restricted feeding protocol between obese and lean female mice *Neotomodon alstoni*. *Biological Rhythm Research*, 45(6), 915–923. <http://doi.org/10.1080/09291016.2014.934076>
- Mathes, W. F., Kelly, S. A., & Pomp, D. (2011). Advances in comparative genetics: influence of genetics on obesity. *The British Journal of Nutrition*, 106 Suppl (S1), S1–10. <http://doi.org/10.1017/S0007114511001905>
- Memon, R. A., Tecott, L. H., Nonogaki, K., Beigneux, A., Moser, A. H., Grunfeld, C., & Feingold, K. R. (2000). Up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR-alpha) and PPAR-gamma messenger ribonucleic acid expression in the liver in murine obesity: troglitazone induces expression of PPAR-gamma-responsive adipose tissue-specific genes in the li. *Endocrinology*, 141(11), 4021–31. <http://doi.org/10.1210/endo.141.11.7771>
- Mohawk, J. a, Green, C. B., & Takahashi, J. S. (2012). Central and peripheral circadian clocks in mammals. *Annual Review of Neuroscience*, 35, 445–62. <http://doi.org/10.1146/annurev-neuro-060909-153128>
- Oishi, K., Shirai, H., & Ishida, N. (2005). CLOCK is involved in the circadian transactivation of peroxisome-proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in mice. *The Biochemical Journal*, 386(Pt 3), 575–81. <http://doi.org/10.1042/BJ20041150>
- Patsouris, D., Reddy, J. K., Müller, M., & Kersten, S. (2006). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the effects of high-fat diet on hepatic gene expression. *Endocrinology*, 147(3), 1508–16. <http://doi.org/10.1210/en.2005-1132>
- Pittendrigh, C. S. (1993). Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. *Annual Review of Physiology*, 55, 16–54. <http://doi.org/10.1146/annurev.ph.55.030193.000313>
- Puigserver, P., Wu, Z., Park, C. W., Graves, R., Wright, M., & Spiegelman, B. M. (1998). A Cold-Inducible Coactivator of Nuclear Receptors Linked to Adaptive Thermogenesis. *Cell*, 92(6), 829–839. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81410-5](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81410-5)
- Reid, K. J., & Zee, P. C. (2009). Circadian rhythm disorders. *Seminars in Neurology*, 29(4), 393–405. <http://doi.org/10.1055/s-0029-1237120>

- Rodgers, J. T., Lerin, C., Haas, W., Gygi, S. P., Spiegelman, B. M., & Puigserver, P. (2005). Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature*, 434(7029), 113–8.
<http://doi.org/10.1038/nature03354>
- Roenneberg, T., & Foster, R. G. (1997). Twilight Times: Light and the Circadian System. *Photochemistry and Photobiology*, 66(5), 549–561.
<http://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1997.tb03188.x>
- Rosenbaum, M., Leibel, R. L., & Hirsch, J. (1997). Obesity. *New England Journal of Medicine*, 337(6), 396–407.
<http://doi.org/10.1056/NEJM199708073370606>
- Saderi, N., Cazarez-Márquez, F., Buijs, F. N., Salgado-Delgado, R. C., Guzman-Ruiz, M. A., del Carmen Basualdo, M., ... Buijs, R. M. (2013). The NPY intergeniculate leaflet projections to the suprachiasmatic nucleus transmit metabolic conditions. *Neuroscience*, 246, 291–300.
<http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.05.004>
- Salgado-Delgado, R. C., Saderi, N., Basualdo, M. del C., Guerrero-Vargas, N. N., Escobar, C., & Buijs, R. M. (2013). Shift work or food intake during the rest phase promotes metabolic disruption and desynchrony of liver genes in male rats. *PloS One*, 8(4), e60052.
<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0060052>
- Sandoval, A. G., Manzur J, F., Gómez, D., & Gómez A, C. (2009). Nuclear receptors and lipid metabolism: cardiovascular implications. *Revista Colombiana de Cardiología*, 16(1), 29–34. Retrieved from
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-56332009000100005&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- Schellekens, H., Finger, B. C., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2012). Ghrelin signalling and obesity: at the interface of stress, mood and food reward. *Pharmacology & Therapeutics*, 135(3), 316–26.
<http://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.06.004>
- Shimomura, I., Shimano, H., Horton, J. D., Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (1997). Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 99(5), 838–45.
<http://doi.org/10.1172/JCI119247>
- Smale, L., Heideman, P. D., & French, J. A. (2005). Behavioral neuroendocrinology in nontraditional species of mammals: things the “knockout” mouse CAN'T

- tell us. *Hormones and Behavior*, 48(4), 474–83.
<http://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2005.05.002>
- Sonoda, J., Mehl, I. R., Chong, L.-W., Nofsinger, R. R., & Evans, R. M. (2007). PGC-1beta controls mitochondrial metabolism to modulate circadian activity, adaptive thermogenesis, and hepatic steatosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(12), 5223–8.
<http://doi.org/10.1073/pnas.0611623104>
- Stienstra, R., Duval, C., Müller, M., & Kersten, S. (2007). PPARs, Obesity, and Inflammation. *PPAR Research*, 2007, 95974.
<http://doi.org/10.1155/2007/95974>
- Swift, L. L. (2012). Role of liver in triglyceride homeostasis. Retrieved February 03, 2016, from
http://www.mc.vanderbilt.edu/diabetes/msshortcourse/presentations/7232012_Swift.pdf
- Takahashi, J. S., Hong, H.-K., Ko, C. H., & McDearmon, E. L. (2008a). The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. *Nature Reviews. Genetics*, 9(10), 764–75.
<http://doi.org/10.1038/nrg2430>
- Takahashi, J. S., Hong, H.-K., Ko, C. H., & McDearmon, E. L. (2008b). The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. *Nature Reviews. Genetics*, 9(10), 764–75.
<http://doi.org/10.1038/nrg2430>
- Tschöp, M., & Heiman, M. L. (2002). Overview of rodent models for obesity research. *Current Protocols in Neuroscience / Editorial Board, Jacqueline N. Crawley ... [et Al.]*, Chapter 9, Unit 9.10.
<http://doi.org/10.1002/0471142301.ns0910s17>
- Turek, F. W., Joshu, C., Kohsaka, A., Lin, E., Ivanova, G., McDearmon, E., ... Bass, J. (2005). Obesity and Metabolic Syndrome in Circadian Clock Mutant Mice, 308(May), 1043–1045.
- Varga, T., Czimmerer, Z., & Nagy, L. (2011). PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1812(8), 1007–22.
<http://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.02.014>
- Vargas, M. H., Rodríguez-Godínez, I., Arias-Gómez, J., & Furuya, M. E. Y. (2012). Circadian Variability of Pulse Oximetry in Healthy Children Under the Age of

7. Archivos de Bronconeumología (English Edition), 48(6), 202–206.
<http://doi.org/10.1016/j.arbr.2012.02.003>

- Vázquez-Martínez, O., Pérez-Mendoza, M., Valente-Godínez, H., Revueltas-Guillén, F., Carmona-Castro, A., Díaz-Muñoz, M., & Miranda-Anaya, M. (2015). Day-night variations in pro-oxidant reactions of hypothalamic, hepatic and pancreatic tissue in mice with spontaneous obesity (*Neotomodon alstoni*). *Biological Rhythm Research*, 1–10.
<http://doi.org/10.1080/09291016.2015.1108061>
- Vega, R. B., Huss, J. M., & Kelly, D. P. (2000). The Coactivator PGC-1 Cooperates with Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha in Transcriptional Control of Nuclear Genes Encoding Mitochondrial Fatty Acid Oxidation Enzymes. *Molecular and Cellular Biology*, 20(5), 1868–1876.
<http://doi.org/10.1128/MCB.20.5.1868-1876.2000>
- Wang, X., Xue, J., Yang, J., & Xie, M. (2013). Timed high-fat diet in the evening affects the hepatic circadian clock and PPAR α -mediated lipogenic gene expressions in mice. *Genes & Nutrition*, 8(5), 457–63.
<http://doi.org/10.1007/s12263-013-0333-y>
- Welsh, D. K., Takahashi, J. S., & Kay, S. A. (2010). Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties. *Annual Review of Physiology*, 72, 551–77. <http://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135919>
- Woon, P. Y., Kaisaki, P. J., Bragança, J., Bihoreau, M.-T., Levy, J. C., Farrall, M., & Gauguier, D. (2007). Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like (BMAL1) is associated with susceptibility to hypertension and type 2 diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(36), 14412–7.
<http://doi.org/10.1073/pnas.0703247104>
- Wu, T., Ni, Y., Zhuge, F., & Fu, Z. (2010). Resetting process of peripheral circadian gene expression after the combined reversal of feeding schedule and light/dark cycle via a 24-h light period transition in rats. *Physiological Research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, 59(4), 581–90.
Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19929146>
- Yamaguchi, S., Isejima, H., Matsuo, T., Okura, R., Yagita, K., Kobayashi, M., & Okamura, H. (2003). Synchronization of cellular clocks in the suprachiasmatic nucleus. *Science (New York, N.Y.)*, 302(5649), 1408–12.
<http://doi.org/10.1126/science.1089287>

- Yamazaki, S. (2000). Resetting Central and Peripheral Circadian Oscillators in Transgenic Rats. *Science*, 288(5466), 682–685.
<http://doi.org/10.1126/science.288.5466.682>
- Yang, X., Downes, M., Yu, R. T., Bookout, A. L., He, W., Straume, M., ... Evans, R. M. (2006). Nuclear receptor expression links the circadian clock to metabolism. *Cell*, 126(4), 801–10. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.050>
- Yang, X., Zhang, Y.-K. J., Esterly, N., Klaassen, C. D., & Wan, Y.-J. Y. (2009). Gender disparity of hepatic lipid homeostasis regulated by the circadian clock. *Journal of Biochemistry*, 145(5), 609–23.
<http://doi.org/10.1093/jb/mvp018>
- Yellaturu, C. R., Deng, X., Park, E. A., Raghov, R., & Elam, M. B. (2009). Insulin enhances the biogenesis of nuclear sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1c by posttranscriptional down-regulation of Insig-2A and its dissociation from SREBP cleavage-activating protein (SCAP). SREBP-1c complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(46), 31726–34.
<http://doi.org/10.1074/jbc.M109.050914>
- Yoo, S.-H., Yamazaki, S., Lowrey, P. L., Shimomura, K., Ko, C. H., Buhr, E. D., ... Takahashi, J. S. (2004). PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(15), 5339–46.
<http://doi.org/10.1073/pnas.0308709101>
- Yoon, J. C., Puigserver, P., Chen, G., Donovan, J., Wu, Z., Rhee, J., ... Spiegelman, B. M. (2001). Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature*, 413(6852), 131–8.
<http://doi.org/10.1038/35093050>
- Yoon, J.-A., Han, D.-H., Noh, J.-Y., Kim, M.-H., Son, G. H., Kim, K., ... Cho, S. (2012). Meal time shift disturbs circadian rhythmicity along with metabolic and behavioral alterations in mice. *PloS One*, 7(8), e44053.
<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0044053>
- Yoon, M. J., Lee, G. Y., Chung, J.-J., Ahn, Y. H., Hong, S. H., & Kim, J. B. (2006). Adiponectin increases fatty acid oxidation in skeletal muscle cells by sequential activation of AMP-activated protein kinase, p38 mitogen-activated protein kinase, and peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Diabetes*, 55(9), 2562–70. <http://doi.org/10.2337/db05-1322>