



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales Ciencias Naturales
Maestría en Ciencias Biológicas

Regulación circadiana de la termorregulación y metabolismo en el ratón de los volcanes (Neotomodon alstoni), diferencias entre delgados y obesos.

Opción de titulación
Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestría en Ciencias Biológicas

Presenta:

Biol. Andrea Herrera García

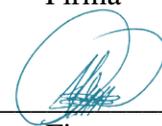
Co-dirigido por:

Dr. Moisés Pérez Mendoza y Dr. Manuel Miranda Anaya

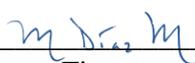
Dr. Moisés Pérez Mendoza
Presidente


Firma

Dr. Manuel Miranda Anaya
Secretario


Firma

Dr. Mauricio Díaz Muñoz
Sinodal


Firma

Dr. Marco A. Sánchez Ramos
Sinodal


Firma

Dra. Angelina Rodríguez Torrez
Sinodal


Firma

Dra. Juana Elizabeth Elton Puentes
Directora de la Facultad

Dra. Ma Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Julio, 2020

RESUMEN

En mamíferos el marcapasos circadiano es el núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo que se sincroniza con los ciclos ambientales de luz y oscuridad mediante el tracto retino-hipotalámico modulando la regulación a través de otros núcleos hipotalámicos de vías neuroendocrinas y metabólicas que coordinan a los osciladores periféricos. La disrupción del control circadiano está asociada a la disfunción de varios sistemas fisiológicos, permitiendo el desarrollo de diversas patologías metabólicas como la obesidad o la diabetes tipo 2 (DT2). El ratón *Neotomodon alstoni*, endémico del eje transvolcánico mexicano, se ha estudiado como modelo de obesidad sobre diversos rasgos de esta condición en la perspectiva de los ritmos circadianos. Actualmente se desconoce si en el ratón obeso *N. alstoni* existen diferencias en la termorregulación corporal, así como la respuesta termogénica ante la exposición a un ambiente frío y en el gasto metabólico. Los resultados en este trabajo indican que el perfil diario metabólico en los roedores obesos es menor que en los ratones delgados, siendo contrastante en el consumo de oxígeno (VO_2), el gasto energético en calorías (EEKcal) y en el consumo, y observando tendencias en la producción de dióxido de carbono (VCO_2), en el coeficiente respiratorio (RQ). La actividad locomotora indica resultados similares a trabajos previos con este modelo. De esta manera, los ratones obesos mostraron un perfil de temperatura corporal (T_c) menor tanto en ciclos de luz-oscuridad (LO) y oscuridad continua (OO) y se observó tendencia de un déficit termorregulatorio en el fenotipo obeso, asociado a baja presencia relativa de UCP1 y a la desintegración estructural (sin estructura definida) del tejido adiposo pardo (TAP). En cuanto a la abundancia de las proteínas reloj BMAL1 y PER1 no se observó un comportamiento irregular en su expresión en el tejido interescapular, sin embargo, es necesario indagar más al respecto.

Palabras clave: BMAL1, ciclos circadianos, tasa metabólica, *Neotomodon alstoni*, PER1, termorregulación, tejido adiposo, UCP1 y obesidad.

ABSTRACT

In mammals the main circadian pacemaker is the suprachiasmatic nucleus (SCN) of the hypothalamus that is synchronized in part with the environmental cycles of light and dark through the tract that allows the regulation of neuroendocrine and metabolic pathways that coordinate peripheral oscillators. The circadian control disruption is associated with the dysfunction of several physiologic systems, allowing the development of various pathologies such as obesity or type 2 diabetes (T2D). The endemic Mexican volcano mouse *Neotomodon alstoni*, has been studied as a model of obesity on various features of this condition in the perspective of circadian rhythms. It is currently unknown whether there are significant differences in metabolic and thermogenesis expenditure in the mouse *N. alstoni*, as well as the thermogenic response to the sudden exposure to a cold environment. The results in this work indicate that the daily metabolic profile is lower in the obese mice than in the lean mice, being contrasting in the oxygen consumption (VO₂), energy expenditure (EEKcal) and water intake, while in the production of carbon dioxide (VCO₂), respiratory coefficient (RQ) only trends were observed. The locomotor activity indicated similar results to previous work with this model. In this way, the obese mice showed a low body temperature profile in both, light-dark (LD) and continuous darkness cycles (DD) with a tendency of a thermoregulatory deficiency in the obese phenotype, associated with low relative presence of UCP1 and the structural disintegration (undefined structure) of the brown adipose tissue (BAT). Regarding the abundance of the clock proteins BMAL1 and PER1, an irregular behavior in their expression in the interscapular tissue was not observed, however, it is necessary to investigate further.

Key words: BMAL1, circadian rhythms, metabolic rate, *Neotomodon alstoni*, PER1, thermoregulation, adipose tissue, UCP1 y obesity.

DEDICATORIAS

A mis padres, los cuales son mi ejemplo tanto de vida como profesional, son el impulso y guía.

A mi pareja, cuyo escepticismo y raciocinio científico me lleva siempre a formular más y mejores ideas.

A los científicos y naturalistas, por su pasión a la obtención de conocimiento.

Y a la actual pandemia por Coronavirus, que me permitió ver las cosas realmente importantes en la vida.

“La Ciencia es una de las actividades más fascinantes de la Humanidad. Combina pasión y aventura, fracasos deprimentes y éxitos arrebatadores, hay héroes y villanos, personas divertidas y sabios extravagantes, investigadores obsesivos con el trabajo y auténticos bon vivants.”

-José Ramón Alonso

La nariz de Charles Darwin

AGRADECIMIENTOS

El presente proyecto se realizó bajo la dirección del Dr. Moisés Pérez Mendoza, y codirección del Dr. Manuel Miranda Anaya.

Este trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Cronobiología de la UMDI-J, UNAM, bajo el proyecto PAPIIT DGAPA IN200620, responsable: Dr. Manuel Miranda Anaya y en la Unidad de Conducta Animal del INB, UNAM bajo el apoyo de la Dra. Deisy Gasca. Además, se contó con el apoyo del Laboratorio de Biología Celular y Molecular dirigido por la Dra. Teresa García Gasca, Dr. Ulises Moreno y M en C. Josué y el Laboratorio de Histopatología veterinaria a cargo de la Mvz. Míriam Raquel Cervantes Ramírez de la Universidad Autónoma de Querétaro, FCN. Se agradece profundamente su apoyo y aportación.

Por otro lado, quiero reconocer el apoyo de los sinodales por sus aportaciones en el proyecto (Dra. Angelina Rodríguez Torres, Dr. Marco Antonio Sánchez Ramos y Dr. Mauricio Díaz Muñoz). Y por último, pero no menos importante, quiero dar las gracias al M en C. Iván Sosa Márquez por sus grandes aportaciones y sus ideas innovadoras.

Este proyecto se llevó a cabo gracias al apoyo de CONACYT y la Maestría en Ciencias Biológicas de la UAQ.

Los autores de este proyecto declaran no tener conflicto de intereses, financieros o de otro estilo.

ÍNDICE

Resumen	I
Abstract	II
Dedicatorias	III
Agradecimientos	IV
Índice	V
Índice de cuadros	VI
Índice de figuras	VII
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	
2.1 Ritmos circadianos en mamíferos	4
2.2 Cambios en el tejido adiposo en la obesidad.	8
2.3 Tejido adiposo pardo y el papel de la proteína UCP1 en la termogénesis no temblorosa y homeostasis metabólica.	9
2.4 Vías de regulación hipotalámica de la temperatura corporal (Tc) y el metabolismo	12
2.5 Modelo de obesidad y ritmos circadianos en la especie <i>Neotomodon alstoni</i> .	14
III. OBJETIVOS	17
IV. MÉTODOS	
4.1 Disposición de animales y condiciones de ambiente y alimentación.	18
4.2 Perfil de la tasa Metabólica (calorimetría indirecta)	18
4.3 Registro de temperatura.	19
4.4 Colecta de tejidos.	20
4.5 Western Blot	20
4.6 Histología	20
4.7 Análisis estadístico de datos	21
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
5.1 Comparación de la tasa metabólica entre los ratones delgados y obesos.	22
5.2 Oscilación diaria de la temperatura corporal (Tc) basal y en exposición a pulsos de temperatura baja durante la fase activa y de reposo.	30
5.3 Expresión de la proteína UCP1, BMAL1 y PER1 en adiposo pardo y blanco	33
5.4 Descripción histológica del TAP interescapular y TAB visceral	36
VI. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	40
VII. REFERENCIAS	41

ÍNDICE DE CUADROS

Tabla 1. Equivalencia térmica de O ₂ y CO ₂ para RQ no proteico (Modificada de Groff & Gropper, 2000).....	pág 25
---	--------

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Zona anatómica y composición del Núcleo Supraquiasmático, conexiones y principales vías.....pág. 5.
- Figura 2.** Mecanismo de retroalimentación del ciclo circadiano en mamíferos.....pág. 7.
- Figura 3.** Distribución de los diferentes tipos de tejidos adiposos en la rata.....pág. 9.
- Figura 4.** Mecanismo de activación de la UCP1 y producción de calor a partir de triglicéridos.....pág. 11.
- Figura 5.** Diferencia entre hembras y machos en el perfil metabólico (LO) de ratones delgados y obesos de *Neotomodon alstoni*.....pág. 14.
- Figura 6.** Perfil circadiano locomotriz y peso corporal de *Neotomodon alstoni* obeso y delgado.....pág. 15
- Figura 7.** Perfil diario de consumo de oxígeno (VO_2), producción de dióxido de carbono (VCO_2) y el coeficiente respiratorio (RQ).....pág. 23.
- Figura 8.** Perfil diario de gasto calórico (EEKcal).....pág. 26
- Figura 9.** Perfil de consumo de alimento y agua.....pág. 28
- Figura 10.** Perfil de actividad locomotriz.....pág. 29
- Figura 11.** Perfil diario del promedio (+EE) de temperatura corporal.....pág. 31
- Figura 12.** Reto de pulso temperatura fría.....pág. 32
- Figura 13.** Presencia relativa de las proteínas UCP1, BMAL1 y PER1 del TAP interescapular.....pág. 34
- Figura 14.** Población de adipocitos blancos en los extremos del TAP.....pág. 36
- Figura 15.** Histología del tejido interescapular (TAP) y visceral (TAP).....pág. 37

I. INTRODUCCIÓN

Los ritmos diarios que presentan los seres vivos en su interacción con su ambiente natural y que persisten en condiciones constantes con periodo cercano a 24 h son llamados ritmos circadianos (Pittendrigh, 1993). Estos ritmos son generalmente regulados por una serie de genes y sus productos funcionan como osciladores biológicos que interaccionan con múltiples sistemas, de tal manera que permiten ajustar y anticipar la fisiología y el comportamiento de un organismo a los ciclos diarios de su ambiente (Froy & Garaulet, 2018; Morgan, 2004). Aunque la maquinaria molecular del reloj circadiano está presente en todas las células de un animal, existe una jerarquía entre estructuras y órganos que permiten distinguir a relojes circadianos maestros o marcapasos, usualmente asociados a vías de entrada (aferecias) de sistemas sensoriales que traducen la información cíclica del ambiente. También están asociados a vías de salida (eferencias) que le permitan coordinar otras funciones internas y conductas hacia el exterior (Stillman et al., 2007).

En mamíferos el marcapasos circadiano principal es el núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo (Moore & Leak, 2001) y se sincroniza, en parte, con los ciclos ambientales de luz y oscuridad mediante el tracto retino-hipotalámico (TRH) (Meijer, 2001) para después regular, a través de otros núcleos hipotalámicos, vías neuroendocrinas y metabólicas que coordinan a los osciladores periféricos circadianos en el resto del organismo. Por su lado, el hipotálamo, principalmente a través de su conexión con la glándula anterior pituitaria y retroalimentación hormonal, regula la homeostasis fisiológica de diversos sistemas, entre los que se encuentran la presión sanguínea, la temperatura corporal (T_c) y la ingesta de alimento (Elmqvist et al., 2005). La influencia del NSQ y de la maquinaria molecular circadiana propia en estos sistemas permite que la T_c y el metabolismo muestren ritmos circadianos (Refinetti, 2015) y, específicamente, la termorregulación mediada por el sistema de termogénesis no tiritante del tejido adiposo pardo, cuyo sistema es mediado por la mitocondria en dicho tejido para la producción de calor sin necesidad de la acción muscular (Lee et al., 2014).

Actualmente se considera que la organización precisa del sistema circadiano favorece la salud. Por el contrario, la disrupción del control circadiano está asociada a la disfunción de varios sistemas fisiológicos. La disrupción circadiana se manifiesta como desorientación, fatiga, insomnio o desbalance hormonal entre otros síntomas (Froy & Garaulet, 2018) y

facilita el desarrollo de patologías, entre las cuales se consideran la obesidad y la diabetes tipo 2 (DT2) (Anaya et al., 2010).

La obesidad es una condición fisiológica que se caracteriza principalmente por el exceso de tejido adiposo (TA), en especial el adiposo blanco (TAB). Es una condición relacionada con un consumo de alimento que excede el gasto energético, en parte por la falta de actividad física, entre otras variables de señalización bioquímica y genéticas que permiten el desarrollo de diversas enfermedades metabólicas como la DT2, hipertensión, enfermedades cardiovasculares e incluso cáncer (Qasim et al., 2018). A su vez, la obesidad influye negativamente en los patrones de actividad física y el reposo, incluso en la homeostasis del sueño ya que los horarios de descanso son irregulares debido a esta condición (Froy & Garaulet, 2018).

El ratón *Neotomodon alstoni*, endémico del eje transvolcánico mexicano, se ha estudiado recientemente como modelo de obesidad, condición que se presenta espontáneamente en algunos animales en cautiverio sin necesidad de alimentación rica en calorías o nutrimentos adicionales. Este rasgo se presenta de forma variable entre los individuos y parece estar asociado a alteraciones hormonales en los niveles y señalización de glucosa, insulina, leptina, ghrelina, triacilglicéridos y ácidos grasos (Carmona-Alcocer et al., 2012; Miranda-Anaya et al., 2019; Pérez-Mendoza et al., 2017). A la fecha se desconoce si existe una base genética de esta condición en este modelo. Al respecto, se han estudiado diversos rasgos de la condición de obesidad desde la perspectiva de los ritmos diarios y circadianos, por lo que se requiere enriquecer el conocimiento sobre este modelo biológico. Actualmente se desconoce si en el ratón obeso *N. alstoni* existen diferencias importantes en el gasto metabólico y la termogénesis, así como la respuesta termogénica ante la exposición súbita a un ambiente frío. Este proceso evidentemente representa un gasto energético para la tasa metabólica y es posible que sea variable en función a la fase del ciclo diario de actividad locomotora.

Existen varios procesos internos de regulación termogénica que compensan la caída de la temperatura ambiental, uno de ellos es la termogénesis no tiritante, en la que el calor se produce por el tejido adiposo pardo (TAP) mediante la Proteína Mitocondrial Desacoplante UCP1 (Miletta & Horvath, 2018). La exposición súbita al ambiente frío permite evaluar los

procesos de termogénesis y el modelo de ratón obeso permite conocer si existe un déficit en esta función. Es por ello que se requiere comparar si entre ratones delgados y obesos existen diferencias en el proceso de termorregulación no tiritante asociado con la expresión de proteínas UCP1 en tejido adiposo pardo y de reloj circadiano BMAL1 y PER por estar mayormente relacionados con el metabolismo (Cornelissen, 2019), además de la tasa metabólica (gasto energético) y la actividad locomotriz circadiana. Lo anterior permitiría comprender mejor a través de este modelo de qué forma en la condición de obesidad, tanto la actividad locomotriz circadiana como la termogénesis del tejido adiposo pardo, y si la influencia del tejido adiposo blanco estaría vinculados en un déficit metabólico y termorregulatorio cuando existe la exposición a climas fríos.

II. ANTECEDENTES

2.1 Ritmos circadianos en mamíferos

Los ritmos circadianos en mamíferos dependen de un mecanismo genético presente en todas las células del organismo. El mecanismo molecular del reloj circadiano está compuesto por un ciclo de retroalimentación en la transcripción y traducción celular que dura aproximadamente 24 h y comprende diversos genes conservados en los animales (Blum et al., 2018; Takahashi et al., 2008). El reloj circadiano maestro en los mamíferos es el núcleo supraquiasmático (NSQ), se ubica en la base del hipotálamo, por encima del quiasma óptico. El NSQ de ratas posee aproximadamente 10,000 neuronas distribuidas entre el tercer ventrículo y el quiasma óptico, además se divide en dos subregiones (médula y corteza), la sincronización circadiana en este circuito neuronal se da por la actividad combinada de glutamato, polipéptido activador de la adenilato ciclasa pituitara (PACAB), péptido vasoactivo intestinal (VIP) y GABA (Figura 1) (Hastings et al., 2018; Legates et al., 2014).

El NSQ modula los ciclos diarios en la homeostasis fisiológica de diversos sistemas, tanto neuronales como en tejidos periféricos (Elmqvist et al., 2005; Moore & Leak, 2001) y además presentan una jerarquía en estructuras. El ritmo circadiano que se genera en el NSQ se sincroniza con la información neuroquímica que se transduce en la retina por efecto de los ciclos ambientales de luz-oscuridad y se transmite al NSQ mediante el tracto retino-hipotalámico (TRH) (Meijer, 2001). Así mismo, el NSQ tiene influencia sobre otros núcleos hipotalámicos y vías parasimpáticas y simpáticas hacia todos los órganos, de modo que el reloj maestro genera impulsos monosinápticos al nervio motor vago y a neuronas de la espina dorsal a través de neuronas pre-autonómicas del núcleo paraventricular (PVN) (Buijs, Ruiz, et al., 2019). De esta manera, el NSQ regula una diversidad de vías neuroendocrinas a otros tejidos en el resto del organismo, que al tener el mecanismo molecular circadiano también son llamados osciladores periféricos. Así mismo, el NSQ integra señales neuroendocrinas de los osciladores periféricos y el estado metabólico, lo que le permite una regulación por retroalimentación. Si se presentan deficiencias en la capacidad de coordinación del reloj circadiano, el organismo reduce eficiencia en las funciones biológicas básicas y en su

interacción con el ambiente cíclico (Miranda-Anaya et al., 2010; Carmona-Alcocer et al., 2012; Morgan, 2004).

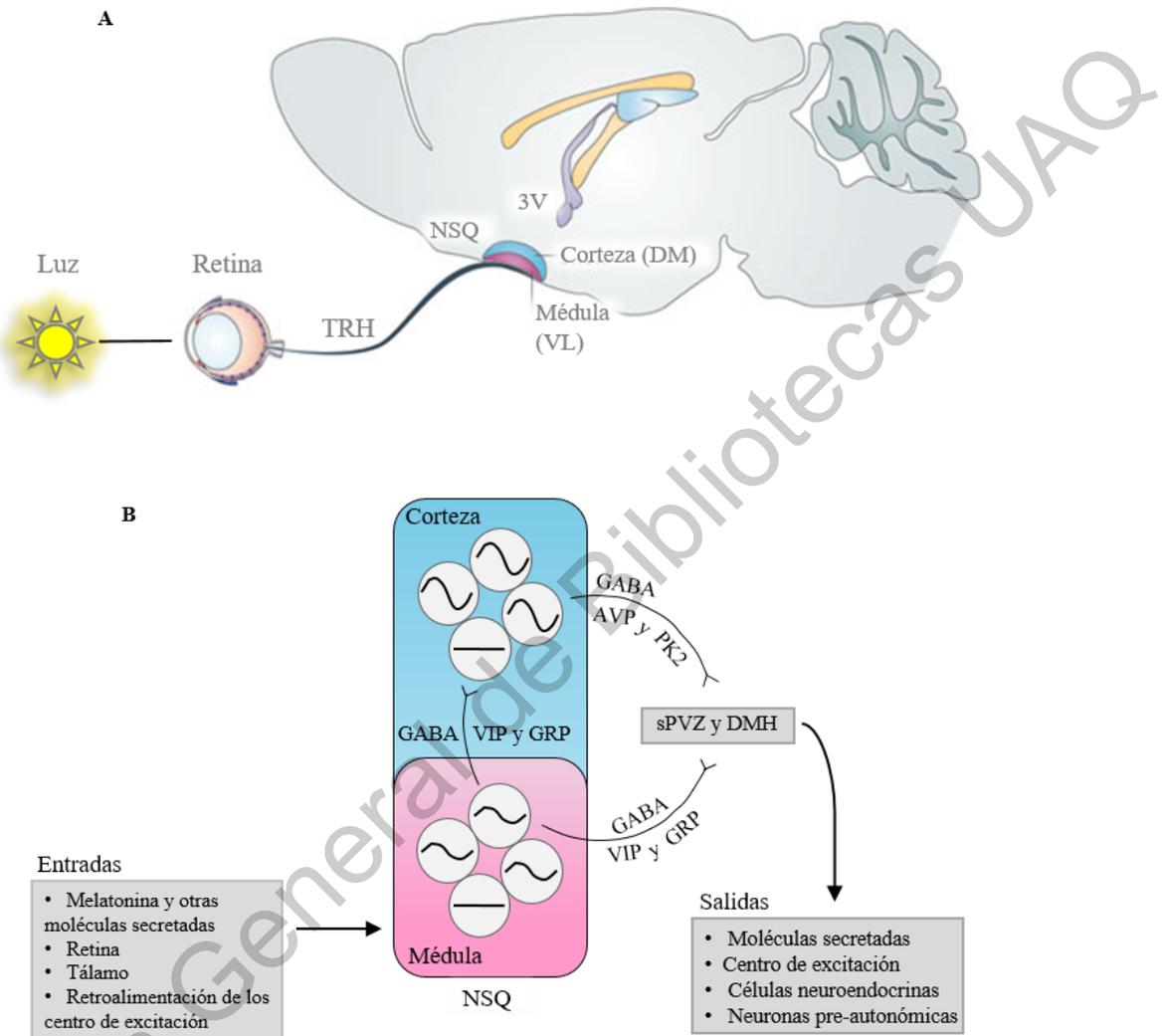


Figura 1. Zona anatómica y composición del Núcleo Supraquiasmático, conexiones y principales vías. A) Corte sagital de cerebro de ratona indicando la posición del NSQ a los lados del tercer ventrículo en el hipotálamo. Se muestra la corteza (dorsomedial o DM), la médula (ventrolateral o VL) y la aferencia fótica del TRH. B) Indica una representación del NSQ con sus principales vías aferentes y eferentes, con los neurotransmisores dominantes en cada región. Las neuronas de la médula incorporan la información del exterior como la luz que pasa por el TRH, información del tálamo entre otras estructuras y moléculas. Dicha información de una amplitud rítmica relativamente baja pasa de la médula como GABA o péptido vasoactivo intestinal (VIP) o péptido gástrico (GRP). En la corteza se utiliza GABA, arginina vasopresina (AVP) o prokinetina 2 (PK2) para comunicar con una amplitud rítmica alta a otras neuronas en regiones de la zona subparaventricular (sPVZ) y del hipotálamo dorsomedial (DMH) las cuales generan proyecciones al sistema nervioso central y endocrino (Modificada de Colwell, 2011).

El origen de la ritmicidad circadiana a nivel molecular es, principalmente, la interacción entre reguladores positivos y negativos (Figura 2). Los reguladores positivos son las proteínas dimerizadas (CLOCK/BMAL1) de los genes *Clock/Bmal1*, que en el núcleo activan la transcripción de los genes *Per 1, 2, 3* y *Cry 1, 2*, cuyas proteínas (PER 1, 2, 3; CRY 1 y 2) forman heterodímeros que se transloca al núcleo celular para funcionar como reguladores negativos al interactuar con el complejo proteico de CLOCK-BMAL1 e inhibir su propia transcripción a través de las regiones reguladoras (E-box); por lo que los niveles de mRNA de ambos disminuye e inicia la degradación del complejo de proteínas, permitiendo el reinicio del ciclo (Hastings et al., 2018; Takahashi et al., 2008). La actividad oscilatoria de estos factores de transcripción, principalmente de CLOCK/BMAL1 y sus mecanismos de regulación permiten una expresión rítmica de múltiples genes (genes controlados por reloj) que constituye al menos un 10-43% del transcriptoma según el tejido. Tanto la traslocación de los dímeros al núcleo, así como la degradación de los monómeros requieren de la fosforilación por parte de las enzimas GSK3 β y CK δ/ϵ . La fosforilación en proteínas no dimerizadas facilita su ubiquitinación (Ub) y degradación por proteosoma (Blum et al., 2018).

Además, también participa una asa secundaria de regulación de BMAL1 por parte de receptores nucleares *Ror α - β - γ* y *Rev-erb- α - β* , cuyas proteínas regulan de forma opuesta la expresión de *Bmal1*, y lo vinculan a procesos de regulación metabólica (Gréchez-Cassiau et al., 2015). Finalmente, el gen *Clock* se expresa constitutivamente por lo que la oscilación del dímero de CLOCK y BMAL1 depende de la oscilación de éste último (Takahashi, 2017). En este sentido, los órganos periféricos están en una oscilación molecular rítmica coordinada con el NSQ a manera de un orden temporal interno.

Se ha demostrado que el tejido adiposo (TA) posee genes de reloj, entre ellos *Bmal1*, *Pers* y *Crys*, que regulan la secreción rítmica de varias moléculas señalizadoras como la adiponectina y la leptina, hormonas de la regulación de la ingesta y muy asociadas al desarrollo de la obesidad y síndrome metabólico; a la eficiencia de la insulina para la captación de glucosa y la variación de ácidos grasos y triacilglicéridos (TAG). Por lo anterior, el TA es un tejido de interés en el estudio de la etiología de la obesidad y su vínculo con el reloj circadiano (Gómez-Abellán et al., 2008; Hernández-García et al., 2019).

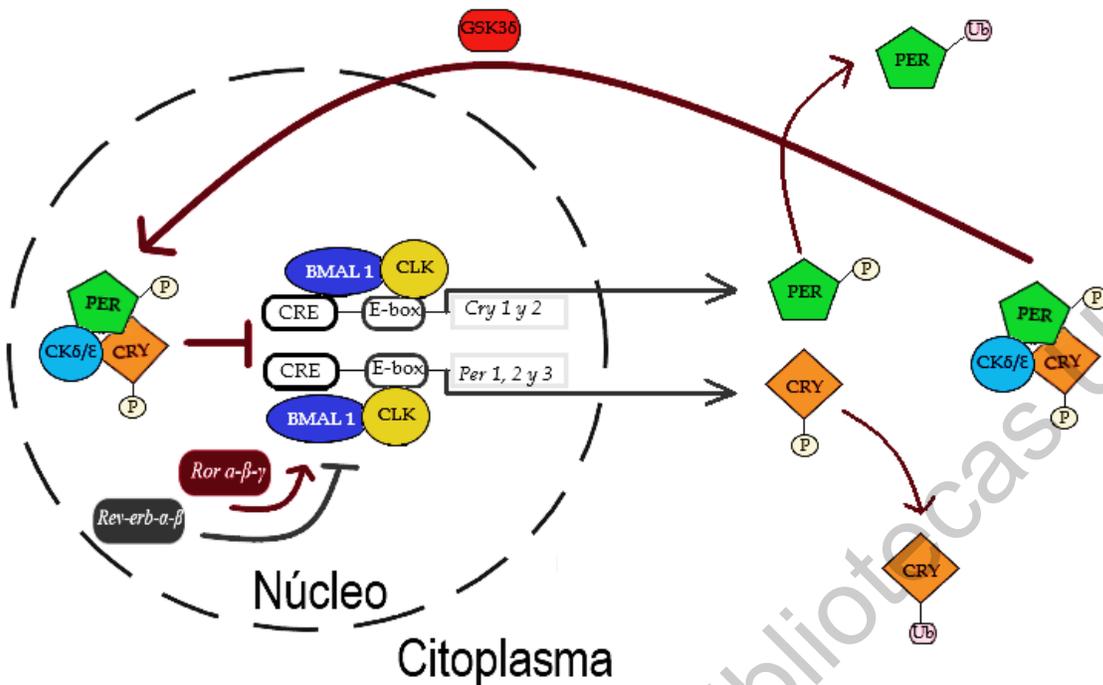


Figura 2. Mecanismo de retroalimentación del ciclo circadiano en mamíferos. La dimerización de las proteínas CLOCK/BMAL1 activan la transcripción de los genes *Per* y *Cry* regulando los niveles de expresión las proteínas PER y CRY las cuales forman un heterodímero fuera del núcleo al ser fosforilados por los complejos GSK3 β y CK δ / ϵ y regresan al núcleo para inhibir la actividad del complejo CLOCK/BMAL1 y detener su propia transcripción. Si las proteínas de PER1 y CRY1 no forman el complejo inhibidor, estas pueden ser fosforiladas por separado y ubiquitinadas para su degradación (Modificada de Blum *et al.*, 2018).

Esta comunicación entre el reloj circadiano y el TA es importante para la regulación de adiposidad y peso corporal en animales que muestran los cambios fisiológicos asociados a las estaciones del año. Varios estudios establecen una estrecha relación entre estos dos sistemas y el desarrollo del síndrome metabólico, obesidad y DT2 (Bray & Young, 2007; Hernández-García *et al.*, 2019). Con respecto a mutaciones en *Clock*, se ha observado que este fenotipo presenta una disminución en la alimentación, aumento en los niveles de adiponectina así como la pérdida de ritmicidad de esta molécula y decremento en el receptor de Glut4, desembocando en síndrome metabólico (Gómez-Abellán *et al.*, 2010; Kennaway *et al.*, 2007; Turek *et al.*, 2005).

2.2 Cambios en el tejido adiposo en la obesidad.

La obesidad es una enfermedad de origen multifactorial en la que influyen desde elementos genéticos hasta ambientales y se caracteriza por el incremento en cantidad y tamaño (hiperplasia y/o hipertrofia) del Tejido Adiposo (TA). La obesidad se vincula a alteraciones fisiológicas y pro-inflamatorias en el TA debido a la asociación que tienen los adipocitos con diversas citosinas como la IL6 (Hajer et al., 2008; King & King, 2013; Lugogo et al., 2011), que afectan las funciones metabólicas y endocrinas del propio TA (Lee et al., 2014). El TA es un órgano de importancia metabólica ya que responde a la disposición y requerimiento de nutrientes, así como a cambios ambientales de temperatura. En mamíferos existen tres tipos de adipocitos, el blanco, beige y pardo, cada uno conformando el tejido adiposo dependiendo del contenido de adipocitos (TAB, TABe y TAP). El TAB posee una sola vesícula donde almacena grasa en forma de triglicéridos que pueden ser hidrolizados por la acción de varias lipasas favoreciendo la separación de ácidos grasos y glicerol cuando hay escasez de alimento (Bartelt & Heeren, 2014; Ghaben & Scherer, 2019; Lee et al., 2014). Estos tejidos poseen una composición muy alta de adipocitos (30-40%), y el resto corresponde a estructuras nerviosas, vasculares, fibroblastos, macrófagos, linfocitos y preadipocitos. La cantidad de TAB y TAP puede ser variable y dependiente de rasgos genéticos, edad y de condiciones ambientales (Cinti, 2015).

El adipocito beige (TABe) se encuentra en el TAB bajo condiciones de alta producción calorífica (cuando el organismo está expuesto al frío o en actividad física). Se producen a través de un proceso de diferenciación de TAB a TABe llamado “browning”, y ayudan a la producción de calor (Bartelt & Heeren, 2014). Tanto el TAB como el TABe se originan de un mismo linaje celular, mientras que el TAP parte de otro linaje a través de factores miogénicos Myf5 (Lee et al., 2014). Los adipocitos pardos o cafés, que son muy abundantes en el tejido adiposo pardo (TAP), poseen un origen distinto al TAB dependiendo de la zona anatómica en donde se presenten (Figura 3). Estas zonas son, principalmente: la interescapular o el TAP clásico, gonadal o epididimal (solo TAB) e inguinal (iTAB) el cual se presenta como adiposo blanco beige (Bartelt & Heeren, 2014; Lee et al., 2014). Según Zhang & Bi (2015), el TAP además de tener una distribución interescapular, también tiene la cervical, periaórtica, pericárdica, perirrenal y axilar.

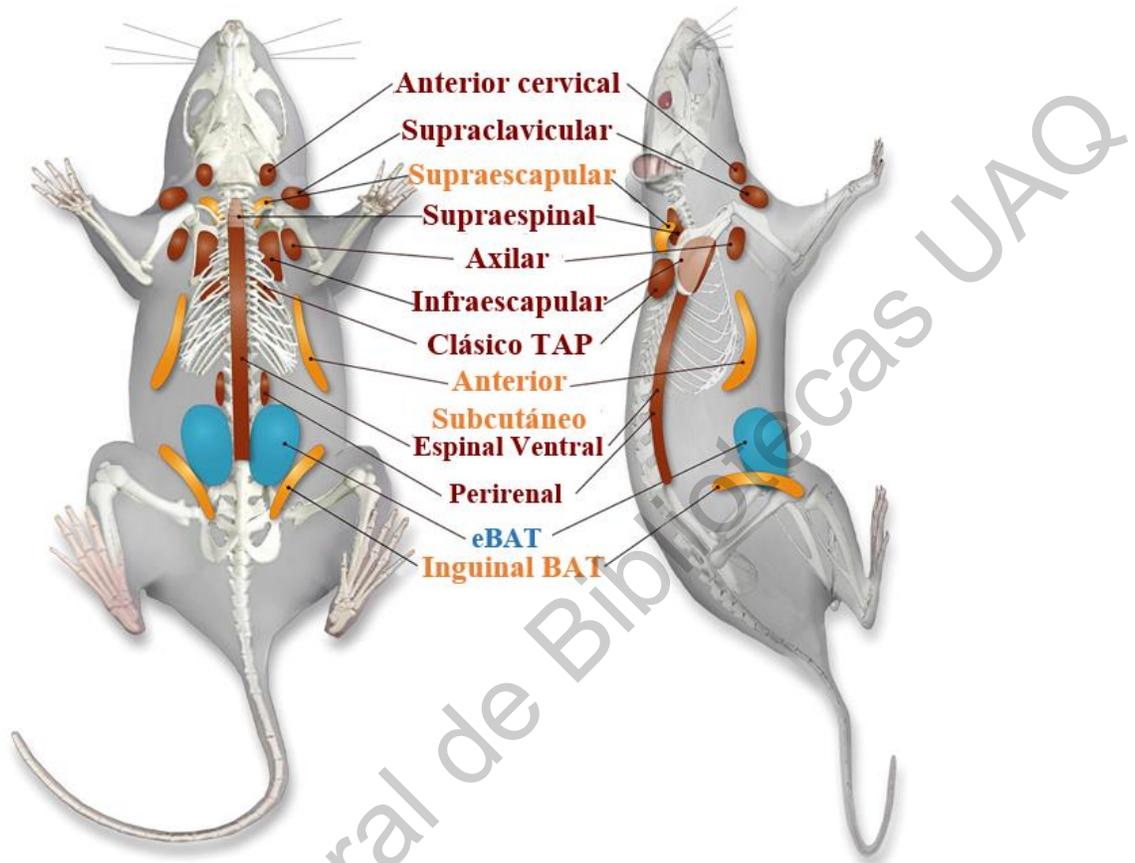


Figura 3. Distribución de los diferentes tipos de tejidos adiposos en la rata. Las zonas marcadas en rojo contienen en gran cantidad adipocitos pardos, el TAP (BAT por sus siglas en inglés) interescapular conocido como “clásico”, las anaranjadas son una combinación entre adipocitos blancos y rojos, donde se puede llevar a cabo el proceso de “browning” y la zona marcada en azul corresponde únicamente a tejido con adipocitos blancos, también conocida como visceral o gonadal (imagen modificada de F. Zhang et al., 2018).

2.3 Tejido adiposo pardo y el papel de la proteína UCP1 en la termogénesis no temblorosa y homeostasis metabólica.

A diferencia del TAB, el TAP está especializado en la producción y disipación de calor en la termogénesis no temblorosa, debido a su alto contenido de mitocondrias y de múltiples vesículas con ácidos grasos disponibles. La producción de calor se debe a la actividad de las

proteínas desacoplantes de la mitocondria, principalmente la UCP1 (Bartelt & Heeren, 2014; Harper, 2020; Lee et al., 2014). Se sabe que en humanos el TAP contribuye en un 20% en producción diaria de calor y un 5% de la tasa metabólica (Press, 2016; van Marken et al., 2011).

El TAP existe en adultos tanto humanos como roedores (van Marken Lichtenbelt et al., 2018) y en ambos, una exposición al frío estimula la función del TAP y un incremento en la presencia de UCP1 en el TAB, el cual se denomina tejido adiposo beige (TABe) (Guerra et al., 1998; van Marken Lichtenbelt et al., 2018). La liberación de norepinefrina o noradrenalina (dependiendo de la localización y su función como neurotransmisor u hormona) promueve una cascada de señalización mediada por una proteína G, la cual, con la ayuda de la lipasa, permiten la degradación de TAG que son descompuestos a ácidos grasos a que se utilizan en la β -oxidación. Estos ácidos grasos se introducen a la matriz mitocondrial para generar ATP como resultado de la oxidación de los ácidos grasos y el flujo de la cadena electrones, sin embargo, la UCP1 se encarga de interrumpir el flujo de electrones para producir energía calorífica derivada de la fuga de protones a través de la membrana mitocondrial, lo que produce un desacople entre la fosforilación oxidativa y la producción del ATP (Figura 4) (Dávila & Jesús, 2014; Miletta & Horvath, 2018). Adicionalmente, se ha observado que la óptima activación de la proteína UCP1 está asociada a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas por la cadena de transferencia de electrones (CTE) en la mitocondria y que el TAP aumenta los índices de reacciones pro-oxidantes cuando hay una exposición al frío (Chouchani et al., 2016; Nicholls & Rial, 2016).

El TA es un tejido con importancia metabólica que regula la homeostasis energética en todo el cuerpo cumpliendo una función esencial en el balance energético, ya que utiliza los TAG circulantes y también aprovecha la glucosa cuando hay una exposición al frío (Bartelt et al., 2011).

Los adipocitos pardos secretan hormonas como la betatrofina y el factor de crecimiento FGF21, que actúan como proliferador de células beta pancreáticas o como regulador de la glucosa, respectivamente (Cinti, 2015). Por otro lado, el TAB no sólo cumple función de almacenamiento de TAG, sino que también es responsable de la secreción de varias

moléculas asociadas a la homeostasis energética como ácidos grasos (secretados en intervalos entre las comidas), hormonas como la leptina (señalizador para el sistema límbico-alimentación) y adipocitocinas o adipocinas que controlan la homeostasis energética a través de tejidos periféricos y el SNC. Asimismo, el TAB participa regulando los niveles de glucosa y de ácidos grasos también en procesos proinflamatorios o antiinflamatorios a través de la producción y liberación de diferentes citocinas (Choe et al., 2016; Cinti, 2015; Serin & Acar Tek, 2019).

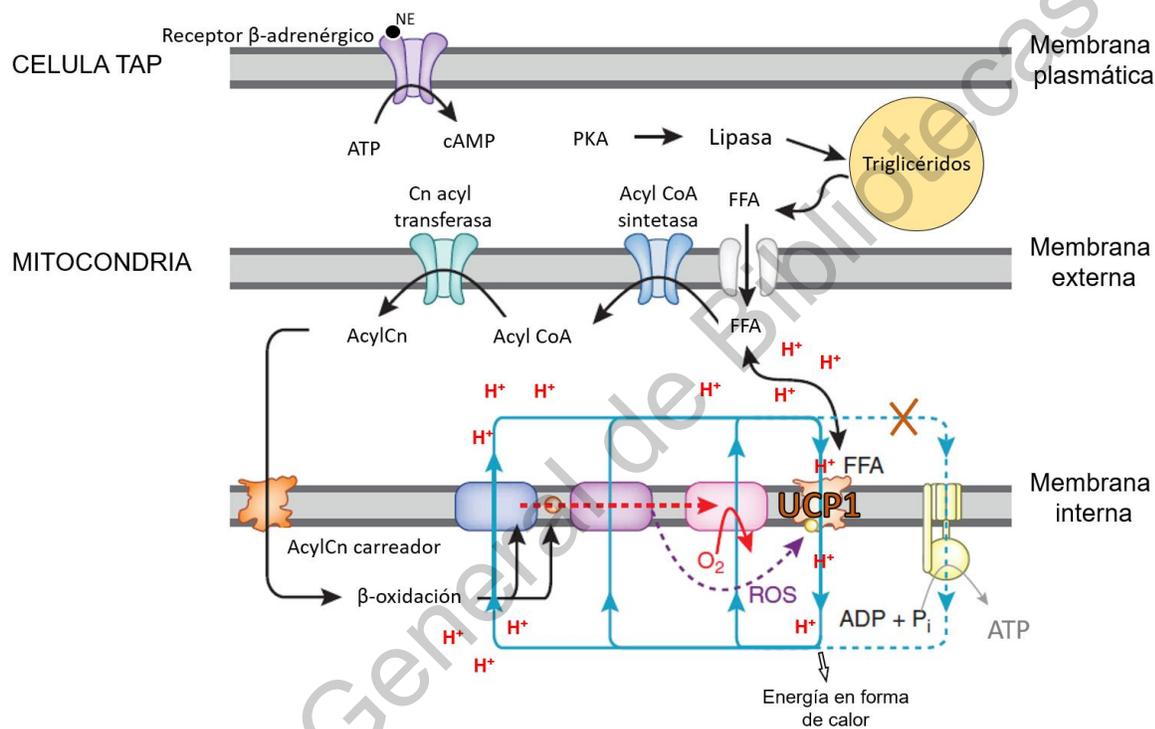


Figura 4. Mecanismo de activación de la UCP1 y producción de calor a partir de triglicéridos.

La norepinefrina (NE) es liberada por el sistema nervioso simpático (SNS) y al unirse al receptor β -adrenérgico permite la lipólisis de triacilglicéridos endógenos del TAP a través de la ruta cAMP y proteína quinasa A (PKA). La liberación de ácidos grasos (FFA) activan la ruta del ácido graso sintetasa (Acyl CoA), del acil carnitina tranferasa (Cn asyl) y β -oxidación para el mecanismo convencional respiratorio. La acumulación de FFA y su oxidación permite la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), y a su vez, la unión de los FFA y ROS para una activación óptima de la UCP1, permitiendo el flujo de protones a través de la UCP1 (flechas azules) para la respiración termogénica. Al finalizar la lipólisis, los FFA residuales son oxidados revirtiendo la activación de la UCP1 (imagen modificada de Nicholls & Rial, 2016).

2.4 Vías de regulación hipotalámica de la temperatura corporal (Tc) y el metabolismo.

La regulación circadiana de los mecanismos homeostáticos involucra diversos núcleos hipotalámicos neuronales que participan como centros multifuncionales en procesos de alimentación, la termorregulación, el sueño-vigilia, entre otros (Shukla & Basheer, 2016), lo que lo hace un sistema muy complejo. Ante una exposición al frío, la actividad del TAP y del pardeamiento en el TAB se ve modulada por diferentes centros neuronales que regulan el uso de energía en el organismo (Zhang & Bi, 2015). El proceso termogénico en el TAP es controlado por el Sistema Nervioso Simpático (SNS) por neuronas glutamatérgicas distribuidas en la región del rafe medular rostral (rMR, con la participación de los núcleos rafe *pallidus* y rafe *obscurus*) (Nakamura et al., 2004; Nakamura & Nakamura, 2018). Dicha región posee una conexión con neuronas del hipotálamo dorsomedial (DMH) cuya interacción permite la activación del TAP (Kataoka et al., 2014), generando una respuesta termogénica dada través de la liberación de noradrenalina y permitiendo la activación de receptores β -adrenérgicos, en particular de tres subtipos de receptores que promueven la termogénesis en el TAP en respuesta al frío. Uno de ellos es el β 1-adrenérgico, encargado de regular la proliferación de preadipocitos cafés y junto con el β 2-adrenérgico se estimula la lipólisis y termogénesis del TAP en humanos, mientras que el β 3-adrenérgico es importante para la diferenciación de los adipocitos cafés maduros y se ha sugerido que también promueve el pardeamiento en el TAB (Zhang & Bi, 2015; Blondin & Severinsen, 2019).

Adicionalmente, el control y la ritmicidad de la Tc requiere de la estrecha conexión entre el NSQ y el núcleo arcuato (ARC), regulando la respuesta metabólica diaria (niveles de glucosa) y consecuentemente el ARC manda información de vuelta al NSQ sobre el estado metabólico del cuerpo con la finalidad de regular la señal. Ambos núcleos mandan la retroalimentación al Núcleo Preóptico Medial (MPO) en forma de Vasopresina (del NSQ) y de α -MSH o Neuropeptido Y (del ARC) permitiendo determinar el estado termorregulador del cuerpo para ahorrar energía, considerado un centro integrador de la termorregulación (Bujis et al., 2019). El MPO secreta de manera continua GABA sobre el DMH y al núcleo pálido rafe rostral de la médula oblonga (rRPa) y cuando la temperatura de la piel disminuye, la inhibición a estos núcleos por parte del MPO se bloquea (Dávila & Jesús, 2014; Morrison

et al., 2014; Morrison & Nakamura, 2011), permitiendo la señal para la termorregulación corporal.

De esta manera las regiones hipotalámicas que controlan o modulan la conexión simpática y que se encuentran más relacionadas con el TAP son: el hipotálamo paraventricular (HPV), hipotálamos lateral (LH), el área preóptica (POA), área preóptica medial (MPO), el hipotálamo ventromedial (VHM) y los ya antes mencionados como el ARC y DMH, núcleos que también están asociados al comportamiento alimentario (Buijs, Ruiz, et al., 2019) mientras que para el TAB se reduce al VMH, DMH y POA (Zhang & Bi, 2015; Buijs et al., 2019). Además es importante destacar que las proyecciones eferentes del NSQ, que también se encuentra en el hipotálamo, son principalmente GABAérgicas y reprimen la actividad fuera del NSQ (Bechtold & Loudon, 2013); sin embargo, la conexión del DMH (núcleo importante para la integración rítmica) con los diferentes núcleos (rMR, LH, VMH, HPV o PVN, PO y ARC) es muy diversa, teniendo algunas conexiones glutamatérgicas, pero a su vez una posible la retroalimentación negativa mediada por el NSQ (Press, 2016).

Por último, la coordinación y activación rítmica de las diferentes vías metabólicas se vinculan a los genes de reloj. En particular, BMAL1 está relacionado con las vías lipogénicas y los ciclos circadianos (Froy & Miskin, 2007). Recientemente, Christou y colaboradores (2019) observaron que hay una regulación circadiana en la función de genes y de proteínas del tejido adiposo, y que depende de la fase activa de cada organismo. Esta regulación se asocia también con el metabolismo de los ácidos grasos (elongación, biosíntesis y degradación), llevados a cabo en la mitocondria. En función a este sistema regulatorio gen-proteína, se ha observado en diversos estudios el desarrollo de obesidad en ratones *knockout* de *Bmal1*^{-/-}. Principalmente estos modelos suprimen variaciones en el metabolismo de la glucosa y de TGA (Froy & Garaulet, 2018; Rudic et al., 2004; Shi et al., 2013).

Por otra parte, PER2 se asocia con obesidad abdominal y con la inhibición de preadipogénesis al inhibir a *PPARγ* el cual es un activador de la proliferación de peroxisomas expresado en tejido adiposo y se encuentra asociado a diversas vías de regulación metabólica (Garaulet et al., 2010; Froy & Garaulet, 2018; Grimaldi et al., 2010) sin embargo la actividad de PER1 es poco descrita dentro de este mecanismo regulatorio en el tejido adiposo.

2.5 Modelo de obesidad y ritmos circadianos en la especie *Neotomodon alstoni*.

El ratón de los volcanes *Neotomodon alstoni* puede desarrollar obesidad en distintos grados en condiciones de bioterio. Esta condición está caracterizada por el aumento de la grasa visceral y subcutánea (Miranda-Anaya et al., 2019), además de desarrollarse de manera aleatoria en los individuos cautivos a temprana edad y con la capacidad de que el peso corporal disminuya en condiciones de estrés. El ratón obeso posee características del síndrome metabólico, entre ellas: resistencia a la leptina, hiperglucemia, hiperinsulinemia e hipertriacilgliceridemia, siendo más agudo en las hembras que en machos (Figura 5) (Carmona-Alcocer et al., 2012; Pérez-Mendoza et al., 2017, 2018).

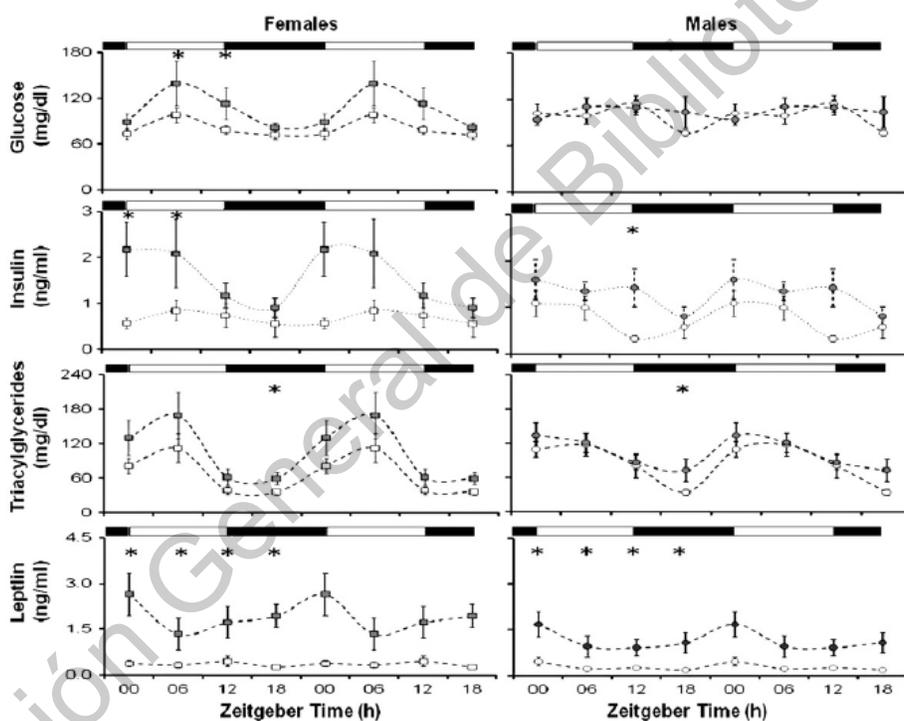


Figura 5. Diferencia entre hembras y machos en el perfil metabólico (LO) de ratones delgados y obesos de *Neotomodon alstoni*. Se muestran los niveles de cada biomolécula (glucosa, insulina, triacilglicéridos y leptina) en delgados (línea negra punteada) y obesos (línea gris punteada) entre hembras (panel izquierdo) y machos (panel derecho) en función de tiempos Zeitgeber. Diferencias significativas se muestran con asteriscos (tomada de Carmona-Alcocer *et al.*, 2012).

Este modelo se ha utilizado para comprender el papel que tiene la obesidad en la desregulación circadiana como consecuencia de un desajuste fisiológico general. Se sabe que

el fenotipo obeso de este ratón tiene un perfil locomotriz con amplitud baja (Figura 6) y además de que el consumo de alimento en proporción al peso corporal (g) es menor en ratones obesos que en los ratones delgados, lo que indica una menor demanda de energía diaria. Además se ha mostrado que la señalización hipotalámica de la leptina es deficiente en el ratón *Neotomodon* obeso, que junto con la hiperleptinemia, sugiere una resistencia a la leptina (Miranda-Anaya et al., 2019; Pérez-Mendoza et al., 2017); así también se ha observado en los ratones obesos una mayor cantidad de ghrelina total, pero menor cantidad de ghrelina activa, asociando una posible resistencia a la ghrelina con la falta de apetito en el periodo activo y mayor alimentación en el periodo de reposo (Luna-Moreno et al., 2018).

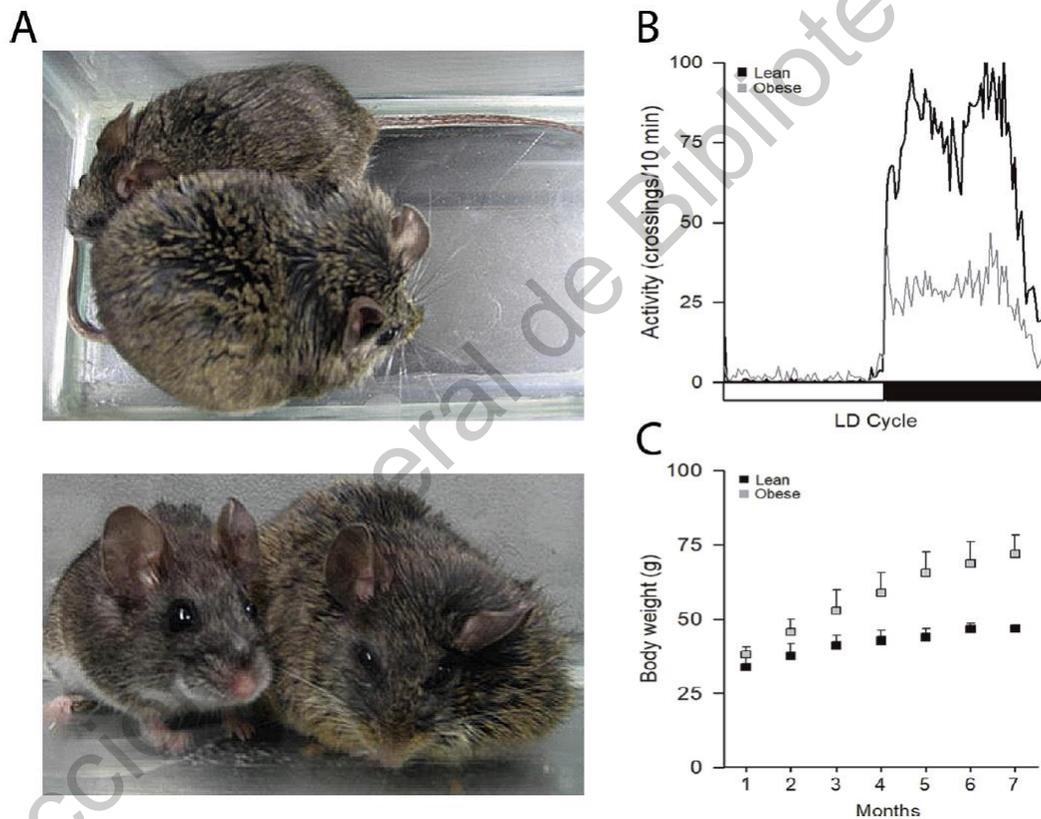


Figura 6. Perfil circadiano locomotriz y peso corporal de *Neotomodon alstoni* delgado vs obeso.

A) Diferencia entre ratón delgado y obeso de *N. alstoni*. B) Perfil de actividad locomotriz de ratones de 7 meses de edad, comparando entre obesos (con baja amplitud, línea gris) y delgados. C) Seguimiento de peso corporal durante 7 meses entre dos grupos, delgados: cuadro oscuro y obesos: cuadro claro (tomada de Pérez-Mendoza *et al.*, 2018).

Se sabe que el fenotipo obeso de este ratón tiene un perfil locomotriz con amplitud baja (posible resistencia a la ghrelina con la falta de apetito en el periodo activo y mayor alimentación en el periodo de reposo (Luna-Moreno et al., 2018). En otros tipos de ratones obesos, como los ratones ob/ob que son genéticamente deficientes en la producción de leptina (Wang et al., 2014), la obesidad es una posible consecuencia de uno de los diversos rasgos afectados por la mutación. También se ha observado en estos ratones que existen deficiencias en la termorregulación (Joumal et al., 1978), asociada a una menor presencia de UCP1 en el TAP (Kates & Himms-Hagen, 1990).

N. alstoni, se encuentra por encima de los 2,500 msnm (Alvarez & Mayo-Aceves, 1993) habitando zonas montañosas del eje Neovolcánico Transversal y es posible que se encuentre habituado a los cambios de temperatura extremos debido a la altitud y a la composición de áreas boscosas (CONABIO, 2000 Listado de Regiones Terrestres Prioritarias). Los ejemplares de laboratorio usados en este estudio provienen de reproductores capturados en el bosque de Parres, Ajusco, CdMx. Es crucial reconocer la naturaleza biológica de *N. alstoni* debido a que es un modelo que en condiciones de cautiverio desarrolla distintos grados de crecimiento y obesidad, por lo tanto es importante determinar si esta condición se encuentra mayormente relacionada como una adaptación a las temporadas frías del año (o del día a manera de torpor en distintos grados) (Melvin & Andrews, 2009) o a que en condiciones de encierro y con comida a libre acceso que a pesar de que no hay diferencia notoria en el consumo de alimento, desarrollan el síndrome metabólico y la obesidad. Se desconoce si en estos roedores la condición de obesidad afecta su respuesta termorreguladora ante ambientes fríos y si poseen la capacidad de entrar en un proceso de letargo para enfrentar restricciones energéticas en ambientes de temperaturas bajas asociado a la disrupción metabólica y circadiana que posee.

III. OBJETIVOS

3.1 General

Determinar si la condición de obesidad en el ratón *Neotomodon alstoni* afecta el perfil diario del gasto metabólico y la termorregulación.

3.2 Específicos

-Establecer las diferencias entre animales delgados y obesos ante ciclos LO 12:12 en:

3.2.1 El perfil diario de la tasa metabólica.

3.2.2 El perfil diario de temperatura corporal.

3.2.3 La respuesta en termorregulación ante un reto agudo de frío en dos fases opuestas del ciclo de actividad.

3.2.4 Comprobar si en tejido adiposo, estas diferencias se vinculan a la presencia relativa de proteína UCP1 y de las proteínas de reloj involucradas en metabolismo: BMAL1 y PER1

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Disposición de animales y condiciones de ambiente y alimentación.

Se usaron un total de 29 individuos de *N. alstoni*, delgados (17) y obesos (12), de entre 1 a 2 años y medio de vida, principalmente machos (10 hembras y 19 machos). Los ejemplares fueron obtenidos del Bioterio de la Facultad de Ciencias de la UNAM, CdMx y se mantuvieron en el laboratorio de Cronobiología, en la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación (UMDI-FC), UNAM campus Juriquilla. Los ratones se habituaron en un cuarto aislado con periodos de 12 h luz-12 h oscuridad (LO 12:12), temperatura de un intervalo entre 22-25°C y humedad ambiental (relativa 30-50%). Los ratones fueron alimentados desde el destete con comida estándar para roedor (Purina, 5001) y agua a libre acceso. Después de ser monitoreados, los animales fueron sacrificados por decapitación. Se obtuvieron muestras de tejido adiposo blanco (gonadal o visceral), beige (inguinal) y pardo (escapular) para el análisis semi cuantitativo por Western Blot. De los tejidos fijados con paraformaldehído al 4% se obtuvo tejido para cortes histológicos representativos para comparación anatómica del tejido adiposo. Los procedimientos para la colecta de muestras fueron aprobados por la Comisión de Bioética de la Facultad de Ciencias, en la UNAM y por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales, en la UAQ.

4.2 Perfil de la tasa Metabólica (calorimetría indirecta)

Se usaron animales intactos para los registros en las cámaras metabólicas (15 ratones delgados y 10 obesos). El análisis metabólico se obtuvo mediante la cuantificación y análisis de: Consumo de oxígeno (VO_2), producción de dióxido de carbono (VCO_2), gasto calórico (EEKcal), actividad locomotriz (ACT) y consumo de alimento y agua (CA y CH_2O) mediante el equipo OxyletPro (Panlab, Harvard Apparatus. Mss) facilitado por la Unidad de Análisis Conductual del Instituto de Neurobiología (UNAM, Juriquilla, Querétaro) bajo la supervisión de la Dra. Deisy Gasca Martínez.

Cada registro consistió en un seguimiento continuo durante al menos tres días seguidos, con una previa aclimatación a las cajas de registro de dos a tres días. Se instaló un ratón por cámara (23.4 cm de largo x 20.9 cm ancho x 20.9 cm de alto), con tapas herméticas equipadas

con los dispositivos que surten y miden el consumo de comida y el agua, con capacidad de 66 g de alimento estándar de laboratorio y capacidad de 44 ml por bebedero, suficientes para tres días continuos de registro. Además, el equipo consta de un analizador de gas, con sensores de concentración de oxígeno (diodo láser) y de dióxido de carbono (espectroscopia infrarroja), en una unidad que controla el flujo de aire dentro de las cámaras. Después del registro, los ratones se mantuvieron en recuperación en condiciones estándar en el laboratorio de Cronobiología, de la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación de la Facultad de Ciencias (UMDI-FC), UNAM, Juriquilla.

4.3 Registro de temperatura.

En el laboratorio de la UMDI-FC, se realizaron las cirugías en 7 ratones delgados y 7 obesos, en la que a cada ratón se implantó en el área intraperitoneal un sensor registrador de temperatura (iButton, Maranata, Madrid, España), previamente cubierto en parafina estéril y desinfectada con solución benzal. La anestesia profunda se verificó mediante pruebas de sensibilidad a pinchado en cola y patas sin reacción ni movimiento de bigotes. Se dieron 15 días de recuperación con cuidados postquirúrgicos, que incluyen la limpieza de la herida y de las cajas y camas de aserrín limpio. Los sensores se programaron antes de la implantación y se procuró programar el inicio del registro al menos 10 días después del implante, para registrar un dato de temperatura intraperitoneal cada diez minutos durante 14 días.

Al inicio del registro y posterior a la recuperación, los ratones fueron mantenidos en cajas limpias donde se les registró la actividad locomotriz de forma continua, en un ambiente de fotoperiodo, temperatura y humedad controlados, mediante el uso de una cámara ADAPTIS 1000 (CONVIRON). El registro de temperatura se llevó a cabo durante 14 días en tres condiciones con una duración aproximada de 4-5 días cada una. La primera, inició con luz-oscuridad 12:12 (LO 12:12) con temperatura de 23°C constante y humedad relativa del 40%, la segunda en oscuridad continua (OO) 23°C, HR 40% y al finalizar un ciclo de LO 12:12 con pulsos de temperatura fría (10°C) de 2 horas, los cuales se dieron uno al medio día (12:00 – 14:00) y otro a la media noche (00:00 – 02:00).

Al final del último pulso de temperatura se sacrificaron los animales por decapitación, se recuperaron los sensores y tomaron muestras de tejido adiposo blanco y tejido adiposo pardo

(TAB y TAP) para realizar análisis de presencia relativa de proteínas por la técnica de Western Blot.

4.4 Colecta de tejidos.

Los individuos se decapitaron con la finalidad de coleccionar muestras de diversos tejidos para análisis de WB con fines propios de este proyecto y de otros del laboratorio. Se coleccionó tejido adiposo café presente debajo de la superficie dorsal del cuello (interescapular) y tejido adiposo blanco gonadal o visceral. El tejido se fue separado y se procesó para western blot o se fijó por inmersión con paraformaldehído al 4% en PBS. La fijación de todos los tejidos permite realizar técnicas posteriores de identificación celular en histología tisular.

4.5 Western Blot

Las muestras de TAB y TAP se homogenizaron con PBS e inhibidores de enzimas de degradación (SIGMAFAST S8830). La concentración de proteína se cuantificó mediante la técnica de Bradford para obtener la cantidad necesaria de proteína de cada tejido para realizar el Western Blot de UCP1 (dilución: 1:5000, EPR20381 ab 209483, ~33 kDa), BMAL1 (dilución 1: 1000; ab3350, ~ 69 kDa) y PER1 (dilución: 1:1000, Bioss antibodies Bs 2350R, ~100 kDa). Se empleó el método utilizado de Pérez-Mendoza et al., (2018), con modificaciones en el manejo del tejido adiposo blanco, pardo cuya homogenización se realizó con 200µl del buffer de homogenizado de tejidos por cada 100 mg de tejido, geles de poli(acrilamida) al 7.5%, buffer de transferencia al 20% y 3 horas de bloqueo para anticuerpos anti UCP1.

4.6 Histología de tejido adiposo interescapular y visceral

El tejido adiposo pardo y blanco (TAB y TAP) se fijó en Paraformaldehído al 4% durante 24 h, después se transfirió a una solución de fijado de formalina al 10% por una semana y después a zinc-formalina (sulfato de zinc al 1%) hasta que los tejidos pasaron a la deshidratación para el parafinado. Los cortes fueron aproximadamente de 20 micras y sometidas a la tinción Hematoxilina-eosina (HE). El método utilizado para el procesamiento de tejido fue descrito por Berry et al., 2014 con modificaciones en la deshidratación del tejido

llevándose a cabo de manera automatizada (Histokinette Leica, modelo TP 1020). El procedimiento de deshidratación utilizado y llevado a cabo por el laboratorio de Histopatología veterinaria. Este tiene una duración de 12 h y consta de 12 pases en diferentes soluciones. Cada uno de los pases tiene una duración de una hora y el orden de las soluciones es: Formol 10%, Agua destilada, Alcohol 70%, Alcohol 80%, Alcohol 96% (x2), etanol (x2), Xilol (x2) y Parafina a 57°C (x2).

Las imágenes correspondientes a la tinción HE se analizaron en el programa ImageJ V5.0. Se realizó un cuadrante en las imágenes de TAB (aumento 10x) y se seleccionaron 3 números aleatorios para cada imagen los cuales sirvieron para elegir el cuadrante en el que se realizó la medición de área adipocitos blancos, tomando en cuenta la misma escala para todas las imágenes (2.24 pixeles/ μm , correspondiente a 50 μm). Los cuadrantes sin presencia de tejido no fueron tomados en cuenta. Para las imágenes de TAP (aumento 10x), se realizó un contraste de “treshold” modificando la luz y el gradiente de color para seleccionar toda el área respectiva al TAP. Se consideró la misma para todas las imágenes siendo el área total de la imagen y se sacaron los porcentajes respectivos.

4.7 Análisis estadístico de datos

El análisis estadístico para medir la ritmicidad de ciclos de temperatura, se hizo en primer lugar con ANOVA de una vía (Prisma 7.0). La comparación de los dos grupos experimentales (delgados y obesos) para el RALM-Temp y la tasa metabólica (TM) se corrieron análisis de ANOVA de dos vías, el área bajo la curva y además de dos pruebas extra para TM: U-Mann Whitney no pareado y un ANCOVA con el género como variable (a excepción del consumo). Para el Western Blot e Histología se realizó una T de Student (Prisma 7.0). Las diferencias estadísticas se consideraron significativas a una $P < 0.05$.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Comparación de la tasa metabólica entre los ratones delgados y obesos.

Los resultados correspondientes a diferentes parámetros metabólicos: VO_2 , VCO_2 , RQ, EEKcal, ACT, CA y CH_2O de 15 ratones delgados y 10 obesos, se muestran en la Figura 7. Se grafican el perfil promedio diario (+EE) de los 2 últimos días en condiciones de registro en la cámara metabólica, por lo que se descartan datos del primer día debido a la transición al sistema de registro. En las gráficas de barras internas a cada perfil se muestra la comparación correspondiente del promedio en el área bajo la curva. Las comparaciones estadísticas con diferencias significativas entre los grupos se indican con un asterisco en cada figura. Los resultados se grafican como promedios a cada hora y en eje de ordenadas se muestran los periodos de luz y oscuridad en un ciclo de 24h. Los resultados muestran en lo general valores de tasa metabólica menores en los obesos con respecto a los delgados en todos los parámetros (LO 12:12), a excepción del RQ (Figura 7C). Sin embargo, anteriormente se observaron diferencias entre hembras y machos en los perfiles bioquímicos (Carmona-Alcocer et al., 2012; Pérez-Mendoza et al., 2017), el análisis comparativo entre sexos en este estudio no mostró diferencias significativas (ANCOVA), por lo que habrá que indagar más sobre este tema.

El perfil diario de VO_2 muestra un menor consumo de oxígeno en los ratones obesos diferente a los delgados en toda la fase de reposo (ANOVA dos vías $p=0.0008$, área bajo la curva: $p=0.0019$), mientras que en el perfil de VCO_2 , aunque hay una tendencia a ser menor en obesos, no hay diferencias estadísticamente significativas a lo largo del día. Tanto el perfil de VO_2 como el de VCO_2 son muy similares con valores bajos durante el día y altos en la noche en una forma bimodal. Con un pico al inicio y otro cerca del final de la noche (Figura 7A y B). Este resultado es consistente con el perfil de actividad locomotora en esta especie (Pérez-Mendoza et al., 2017) y con lo observado en otros estudios en que ratones obesos en ambientes “termo-neutrales” y con deficiencia de UCP1 incrementan únicamente el consumo de O_2 , lo que se encuentra relacionado con un incremento en la grasa inguinal y epididimal (Bond & Ntambi, 2018). Por otro lado, se ha observado que el CO_2 tiene un incremento cuando los niveles de actividad metabólica aumentan (Dávila & Jesús, 2014), lo que

correspondería a la tasa metabólica de los ratones delgados. Sin embargo, esta lógica no aplica en los ratones obesos, ya que su tasa metabólica es menor con respecto a los niveles de consumo de VO_2 y al gasto calórico. La obesidad además de promover el desarrollo de DT2 o síndrome metabólico, permite la apnea obstructiva del sueño (OSA) y el síndrome de hipoventilación en obesos (OHS) asociada a la hipercapnia (bajos niveles de O_2 y aumento de presión parcial de CO_2 en sangre), acelerando la adipogénesis en TAB visceral y subcutáneo al aumentar la producción cAMP que activa factores de transcripción pro-adipogénicos (Kikuchi et al., 2017).

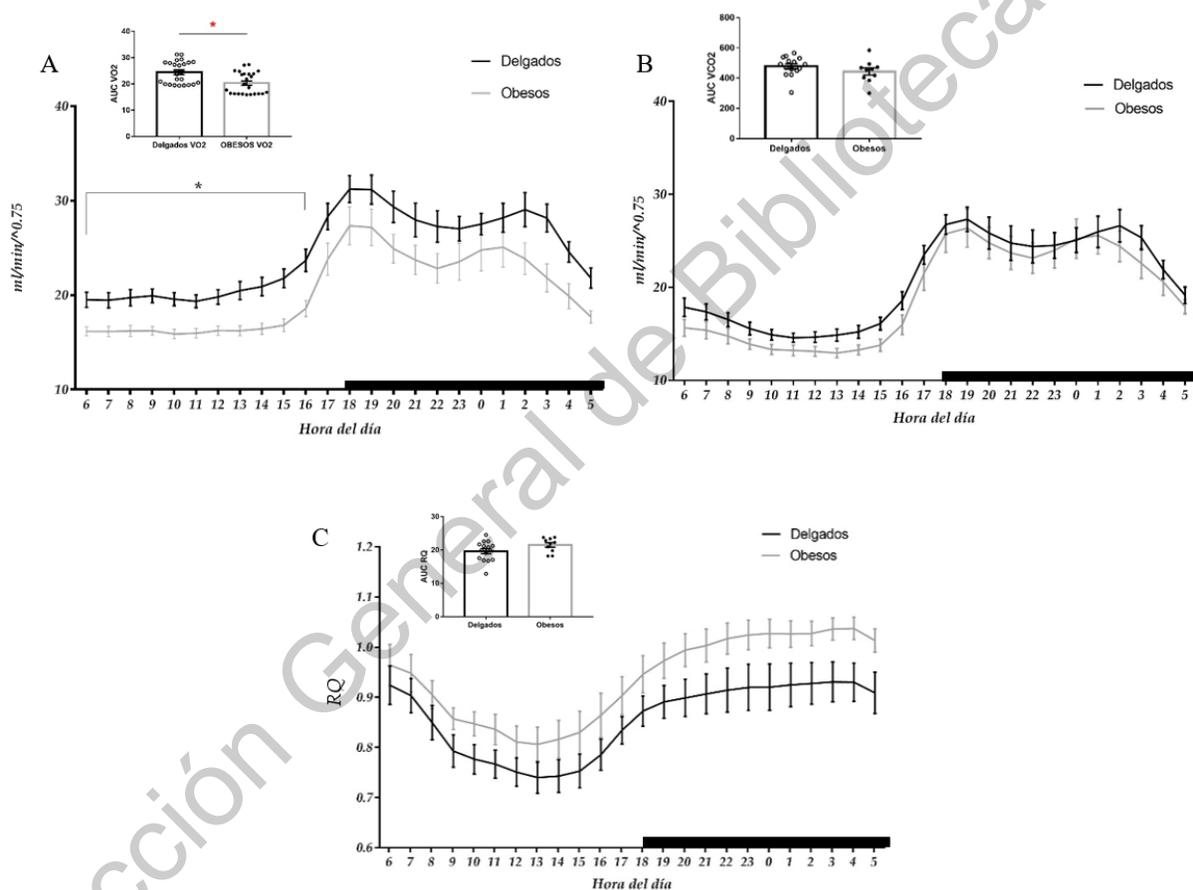


Figura 7. Perfil diario de consumo de oxígeno (VO_2), producción de dióxido de carbono (VCO_2) y el coeficiente respiratorio (RQ). A) el VO_2 muestra diferencias significativas en el perfil diario de ratones delgados (línea negra) y obesos (línea gris) solo durante la fase de reposo, pero si en el área bajo la curva (histograma). B) VCO_2 sin diferencias significativas a lo largo de todo el perfil diario, tampoco en el área bajo la curva. C) Perfil diario del RQ, sin diferencias significativas entre grupos. Diferencias estadísticas del perfil diario con ANOVA dos vías (*, $p < 0.05$), área bajo la curva (*, $p < 0.05$).

En cuanto al coeficiente respiratorio (RQ, Figura 7C), es la relación entre el VO_2 y VCO_2 y se evalúa en un rango que determina la molécula utilizada para la producción de energía en ATP, cuyos valores y asignaciones son en el método de calorimetría directa serían: 0.7: lípidos, 0.8: proteínas y 1: carbohidratos (Bazán, 2012), sin embargo, el método utilizado corresponde a calorimetría indirecta, por lo que no se mide el nitrógeno urinario.

De esta manera, el RQ varía en función del momento del día y se utilizó la Tabla de Lusk para observar la correlación carbohidratos-grasa para la producción de energía (Tabla 1). Se obtuvo un RQ de 0.97 para ratones obesos al final de la fase activa e inicios de la fase de reposo (6:00) con la relación 90.4% carbohidratos (CHO) y 9.58% grasas (G); de 0.81 a media fase en reposo (12 h) con 36.9% CHO y 63.1% de G y, finalmente, de 0.9 al inicio de la fase activa (18:00, noche) hasta llegar a 1, lo que sugiere principalmente el uso de CHO para generar energía. Durante la fase del periodo activo se observaron valores de relación por arriba de 1. En ratas, 24 h de ayuno refleja un índice de RQ del 0.75 (Gregorio et al., 1976), sin embargo *N. alstoni* obeso presenta valores más altos probablemente asociado a la baja movilización de lípidos y además de que el periodo de ayuno no se cumple ya que consumen alimento durante una parte de la fase de reposo (Figura 9).

Por su parte, los ratones delgados mostraron valores de relación de 0.92 al final de la fase activa e inicios de fase en reposo (6 h) con la relación 74.1% CHO y 25.9% G, de 0.75 a media fase en reposo (12 h) con 15.6% CHO y 84.4% G y de 0.85 iniciando la fase activa (18:00, noche) hasta llegar nuevamente a los valores cercanos a 0.92. Lo anterior sugiere la disminución del uso de carbohidratos al inicio de la fase de reposo e intercambiando al uso de lípidos (probablemente por el período de ayuno en reposo) hasta llegar de nuevo al inicio de la fase activa, donde los carbohidratos son utilizados en toda la fase activa, siendo el recurso principal en este periodo. Sin embargo, no se observaron diferencias importantes entre delgados y obesos.

En general, por cada punto temporal del día, los obesos utilizan menos el recurso de las grasas para la generación de energía, apuntando a un déficit en la activación lipolítica y la movilización de ácidos grasos, ya que se ha observado que después de 24 h de ayuno los obesos tienen menor movilización (Báez-Ruiz et al., 2014). Además, índices de RQ elevados

en humanos se ha asociado con probabilidades de desarrollar DT2 y síndrome metabólico (Pujia et al., 2019). No obstante, siendo una calorimetría indirecta se excluye el papel de las proteínas el cual es un factor de sesgo, ya que siguen siendo parte del índice metabólico natural.

Tabla 1. Equivalencia térmica de O₂ y CO₂ para RQ no protéico

RQ no protéico	Valor Calórico 1 L O ₂	Valor Calórico 1 L CO ₂	Fuente de Calorías	
			Carbohidratos (%)	Grasa (%)
0.707	4.686	6.629	0	100
0.71	4.690	6.606	1.10	98.9
0.72	4.702	6.531	4.76	95.2
0.73	4.714	6.458	8.40	91.6
0.74	4.727	6.388	12.0	88.0
0.75	4.739	6.319	15.6	84.4
0.76	4.751	6.253	19.2	80.8
0.77	4.764	6.187	22.8	77.2
0.78	4.776	6.123	26.3	73.3
0.79	4.788	6.062	29.9	70.1
0.80	4.801	6.001	33.4	66.6
0.81	4.813	5.942	36.9	63.1
0.82	4.825	5.884	40.3	59.7
0.83	4.838	5.829	43.8	56.2
0.84	4.850	5.774	47.2	52.8
0.85	4.862	5.721	50.7	49.3
0.86	4.875	5.669	54.1	45.9
0.87	4.887	5.617	57.5	42.5
0.88	4.899	5.568	60.8	39.2
0.89	4.911	5.519	64.2	35.8
0.90	4.924	5.471	67.5	32.5
0.91	4.936	5.424	70.8	29.2
0.92	4.948	5.378	74.1	25.9
0.93	4.961	5.333	77.4	22.6
0.94	4.973	5.290	80.7	19.3
0.95	4.985	5.247	84.0	16.0
0.96	4.998	5.205	87.2	12.8
0.97	5.010	5.165	90.4	9.58
0.98	5.022	5.124	93.6	6.37
0.99	5.035	5.085	96.8	3.18
100	5.047	5.047	100	0

Fuente: Modificada de Groff & Gropper, 2000.

El índice de EEKcal (Figura 8A) indica el gasto energético o calórico el cual se calcula a través de la siguiente ecuación:

$$RQ = VCO_2 / VO_2$$

$$EE = (3.815 + (1.232 \times RQ)) \times VO_2 \times 1.44$$

Basada en la potencia 0.75 que expresa el metabolismo basal con respecto al peso corporal de Kleiber siendo conveniente debido a que la energía metabólica incrementa con el peso corporal, sin embargo, este exponente es necesario ser ajustado cuando se estudia a más de una especie con diferente peso corporal (Heusner, 1982). Otras fuentes considera el VO_2 como la variable más relevante para obtener el gasto energético (Singer, 2016). En los ratones obesos de *N. alstoni* se observa un gasto calórico o un estado de gasto energético menor mostrando diferencias significativas en la fase de reposo, siendo reflejo tanto del consumo de alimento como del RQ.

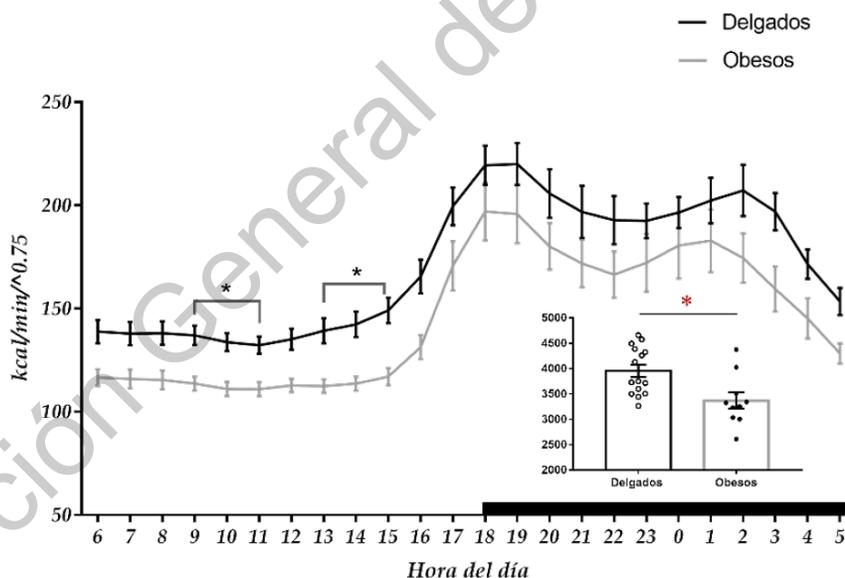


Figura 8. Perfil diario de gasto calórico (EEKcal). Se observa una tendencia de menor gasto energético en ratones obesos (línea gris) que en delgados (línea negra) y diferencias significativas en la fase de reposo. El análisis del área bajo la curva muestra diferencias entre grupos (histograma dentro de la figura). Diferencias estadísticas del perfil diario con ANOVA dos vías para perfil diario (*, > p=0.05), área bajo la curva (*, > p=0.05) y barras de error estándar.

Los estudios relacionados con tasa metabólica frecuentemente son llevados a cabo con ratones genéticamente modificados o con dietas altas en calorías que induzcan un cambio en el peso corporal (Burnett & Grobe, 2014) y estos modelos son los más comunes para examinar los mecanismos fisiológicos de diversas enfermedades (Fischer et al., 2018). Este hecho le añade un valor adicional a este modelo biológico no convencional, debido a que no hay intervenciones de este carácter en los individuos. En estudios con C57BL/6, se sugiere que una dieta alta en calorías (para inducir un estado de obesidad) aumenta los niveles de la tasa metabólica en reposo (TMR) a comparación de una dieta normal (Burnett & Grobe, 2014), mientras que una restricción calórica por varios meses induce un decremento en la tasa metabólica basal (TMB) debido a un déficit energético (Mitchell et al., 2017).

El resultado obtenido con nuestro modelo no es consistente con lo observado en C57BL/6 con dietas hipercalóricas, indicando que inducir una condición parecida a la obesidad podría ser un sesgo para estudios metabólicos. Por otro lado se ha observado que una tasa metabólica alta con el gasto energético correspondiente parece contribuir en reducir la acumulación de masa corporal, colesterol (HDL, LDL), triglicéridos y glucosa, aunque el daño oxidativo en otros órganos como el corazón, hígado o riñones es posible ya que las especies reactivas de oxígeno (ROS) son producto de la producción de energía requerida para las distintas funciones fisiológicas (Bury et al., 2018; Sadowska et al., 2017). Este caso podría corresponder con el fenotipo delgado de *N. alstoni*.

En el modelo de ratón OSA, la expresión del sistema orexigénico se ve reducida resultando en desordenes de descanso y disrupciones en la homeostasis energética y termogénica (Fiori et al., 2014). En *N. alstoni* hay un déficit en la activación de las neuronas orexigénicas debido a un tono reducido en el DMH. Este resultado fue observado en la restricción de alimento, donde no se induce un aumento en la expresión de *cFOS* tan notable en núcleos hipotalámicos relacionados con el control de la movilidad y el metabolismo en la fase de anticipación al alimento, a pesar de que, si se induce una pérdida de peso, por lo que los mecanismos neurales de la integración metabólica y de conducta no son tan claros como en los ratones delgados (Luna-Illades et al., 2017).

En el consumo de alimento se observaron diferencias en la hora en que se consumió el alimento, con periodos de consumo en la fase de reposo (Figura 9). Varios estudios asocian los periodos inusuales de alimentación (en especial en la fase de reposo) con la obesidad, desordenes metabólicos, desincronización en diferentes niveles fisiológicos y bioquímicos, cambios en la expresión (en PER1) y ritmicidad de genes de reloj en el NSQ y en el hipotálamo lateral (Oishi & Hashimoto, 2018; Opperhuizen et al., 2016; Sen et al., 2017)

Por otro lado, no se observaron diferencias en la cantidad neta diaria consumida entre los obesos (3.31 g) y delgados (2.30 g), siendo un resultado contrastante con los obtenidos por Pérez-Mendoza (2017) en el cual, los ratones obesos tienen un menor consumo de calorías por gramo de peso corporal y a pesar de ello el gasto calórico sigue siendo menor en los obesos. Aunque también es necesario contrastar si la diferencia es la total consumida o por gramos de peso tejido (peso corporal).

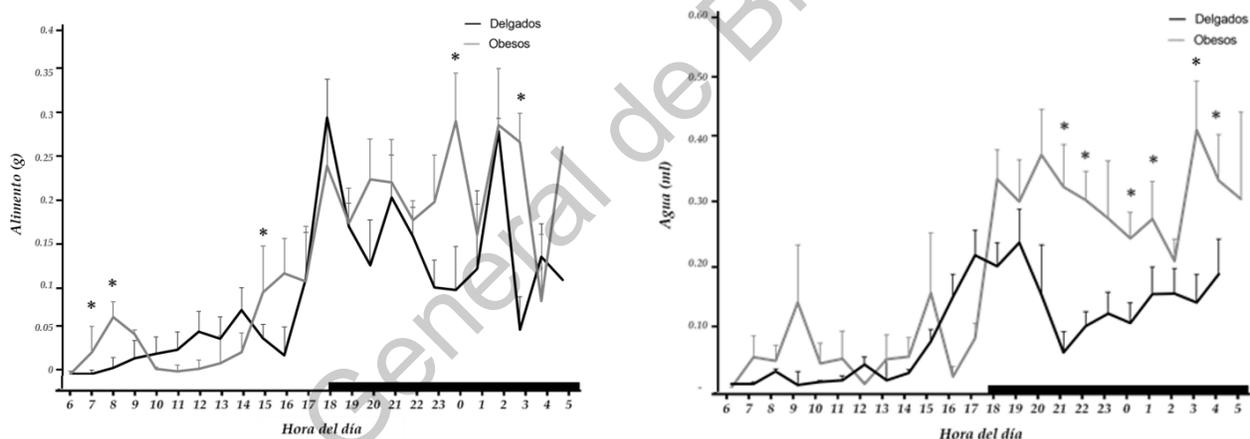


Figura 9. Perfil de consumo de alimento y agua. Perfil del promedio de dos días del consumo total de alimento (izquierda) y agua (derecha) en ratones delgados (línea negra) y obesos (línea gris). Ambas con datos significativos a lo largo del día. Diferencias significativas T-test para consumo ($p < 0.05$) y barras de error estándar.

En este trabajo es la primera vez que se mide el consumo de agua en este modelo, obteniendo resultados contrastantes. Los ratones obesos tuvieron un consumo diario de agua de 2.15 ml comparado con los delgados de 4.34ml ($p = 0.0026$), observando diferencias significativas tanto en el promedio consumido como en diferentes horas del perfil (Figura 9). En otro estudios con ratones diabéticos, se ha demostrado que el consumo de agua es mayor (Bibak

et al., 2014) debido a los antecedentes de alta insulina y glucosa circulante (Carmona-Alcocer, et al 2012). Es muy probable que los animales obesos de *N. alstoni* se encuentren en una condición prediabética y que esté relacionado con poliuria y aumento en la ingesta de agua.

En la actividad locomotriz no se encontraron diferencias significativas entre los grupos. Sin embargo, se muestra tendencia de desfase en el periodo activo tardío (Figura 10, noche) lo cual podría verse relacionado con el bajo gasto calórico. En trabajo previos existe una tendencia a reducir la actividad en la segunda mitad de la noche (Miranda-Anaya et al., 2019; Pérez-Mendoza et al., 2017) sin embargo en este estudio no se observó una diferencia tan clara en el perfil entre obesos y delgados, además de que muestra inconsistencias comparando con los registros de consumo. Probablemente se debió al método de registro que podría tener menor sensibilidad para la actividad locomotriz, por lo que haría falta indagar de manera más profunda.

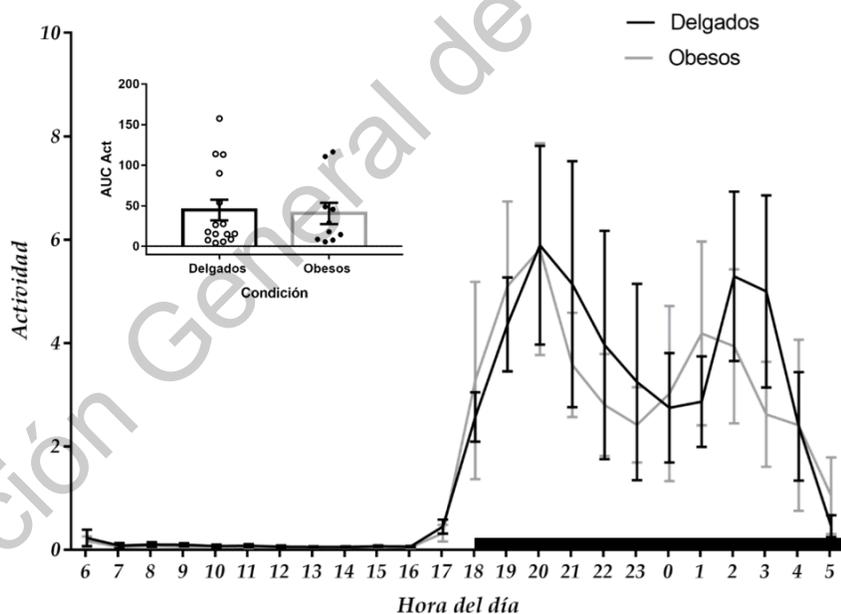


Figura 10. Perfil de Actividad locomotriz. Se muestra el promedio diario de actividad en ratones obesos (línea gris) y delgados (línea negra). En la fase de reposo (día) no se observan diferencias entre los grupos y en la fase activa (noche) se observa tendencia a disminuir la actividad a mitad de la noche (0:00hr). Se grafican error estándar en cada punto del horario. Diferencias estadísticas del perfil diario con ANOVA.

5.2 Oscilación diaria de la temperatura corporal (Tc) basal y en exposición a pulsos de temperatura baja durante la fase activa y de reposo.

Se analizaron los perfiles diarios de temperatura corporal en 7 ratones delgados y 7 obesos, durante un total de 3 días completos y graficando el promedio (+EE) de los 3 días en 24hrs. La Figura 11 muestra el perfil en LO (12:12). *N. alstoni* mantiene una Tc promedio de entre 37-38°C en un ambiente “termo-neutral”, considerando ningún déficit metabólico, hormonal o neurológico y que en pequeñas especies la temperatura de termo-neutralidad se encuentra aproximadamente en 30°C (Dávila & Jesús, 2014). Durante todo el periodo del día existen leves variaciones de la Tc, de esta manera durante la fase de reposo (día) los ratones obesos presentan una Tc menor (34.5-35°C) a la de los delgados (35-36°C), mientras que en la fase activa (noche) la Tc de ambos grupos aumenta a un rango de 37-38°C con tendencia a ser menor en obesos, pero sin diferencias significativas. Las diferencias observadas durante el día son estadísticamente significativas (Figura 11A). El perfil en oscuridad constante (OO, Figura 11B) indica que no existe un efecto indirecto del fotoperiodo en el perfil de temperatura, se mantiene la ritmicidad circadiana y las diferencias de temperatura en la fase de reposo.

Los registros de Tc en que los ratones son expuestos por dos horas a una caída de temperatura ambiental (de 25 a 10°C), tanto a media noche como al medio día, se muestra en la Figura 12B. En el promedio de los datos, se observa que persiste la diferencia basal de temperatura, pero no hay disminución clara en todos los animales en la Tc durante la exposición al frío. Es posible observar casos de ratones obesos con la incapacidad de termorregular y disminuyen su Tc hasta 4°C (Figura 12B). Se sabe que disminuir y controlar la ritmicidad de la Tc se considera como una estrategia que utilizan los animales homeotermos para conservar energía (Nagashima et al., 2019). De esta manera, individuos humanos con 1°C menor de Tc se consideran con discapacidad termogénica el cual evita el gasto calórico de 100 a 300 kcal/día, contribuyendo a la formación de 0.454kg de grasa (Landsberg et al., 2009).

La distribución de la Tc durante y después del pulso frío es muy variable entre los individuos de cada grupo (Figura 12A). A la izquierda se muestran los datos individuales de la variación porcentual de la Tc unidos por líneas, antes (control) y a distintos tiempos durante dos horas de exposición al pulso de frío (60 y 120min) y posterior (180 min). Se nota que en ambos

grupos hay variaciones en el porcentaje de Tc, siendo más dispersos en los animales obesos. La figura de la derecha (B) muestra los valores de Tc promedio durante tres días (+EE), un caso de un ratón delgado y uno obeso, donde se nota la respuesta termorreguladora ante pulsos de frío a mediodía y a media noche. Cuando el organismo se encuentra ante retos fisiológicos como restricciones calóricas, dietas pobres en calorías o cambios de temperatura, hay una necesidad fisiológica para modificar los valores de referencia (set-point) energéticos y la mayoría de estos valores de referencia están regulados circadianamente por el NSQ (Buijs, Ruiz, et al., 2019). Además se genera una combinación de respuestas automáticas hipotalámicas como: la termogénesis simpática en el TAP, termogénesis por temblor en el músculo, aumento en la producción de CO₂ debido al incremento en la actividad metabólica (50 g de TAP activo generan un cambio relevante en el metabolismo y peso corporal en humanos), vasoconstricción y taquicardia (Dávila & Jesús, 2014).

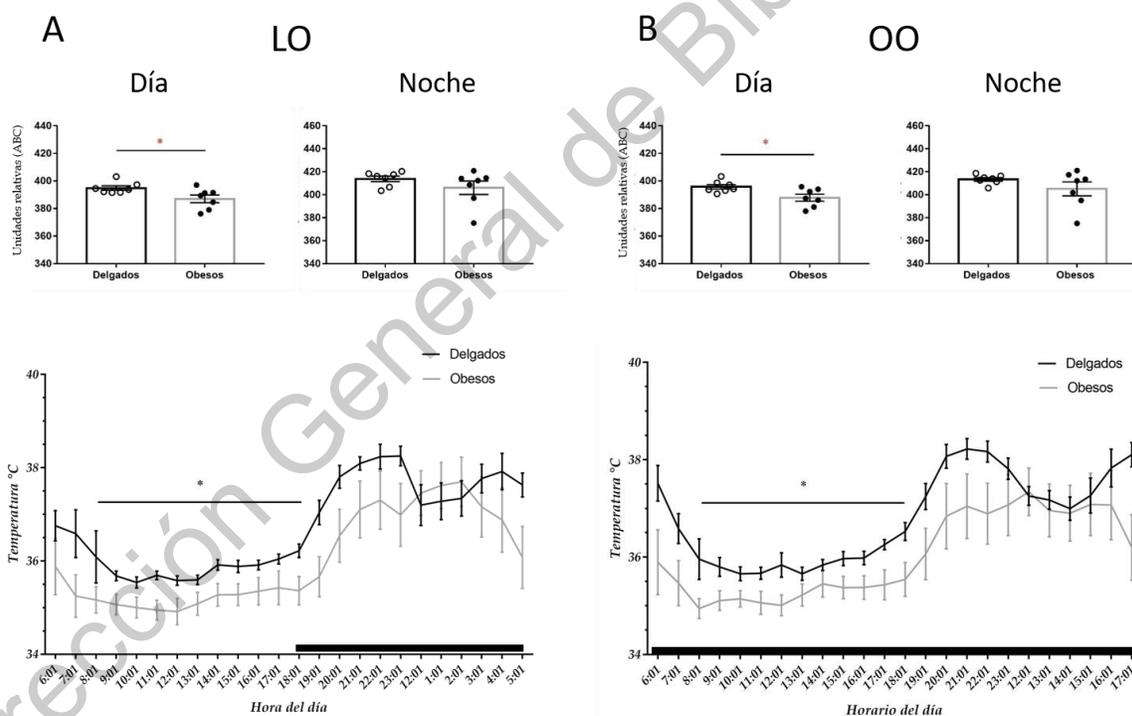


Figura 11. Perfil diario del promedio (+EE) de temperatura corporal. A) Graficas superiores en A y B muestran el área bajo la curva (ABC, unidades relativas) del día y la noche del perfil LO (izquierda) y OO (derecha), gráficas inferiores muestran perfil de 24hrs en un periodo LO y OO, mostrando diferencias en la fase de reposo (día) donde los obesos tienen una diferencia aproximada de 0.4°C en LO y 0.7-0.8°C en OO. Diferencias estadísticas del perfil diario con ANOVA dos vías (*, > p=0.05), área bajo la curva (*, > p=0.05) y barras de error estándar.

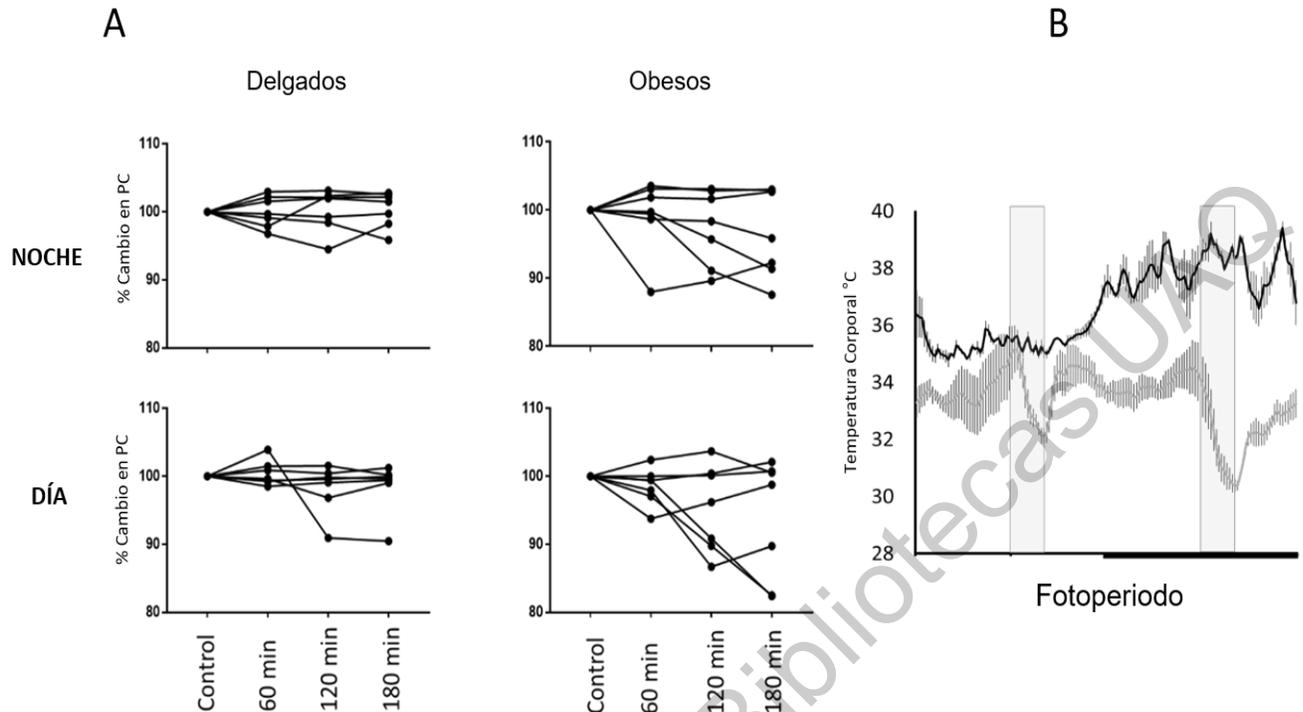


Figura 12. Reto de Pulso Temperatura Fría. A) Cambio porcentual de la temperatura corporal (respecto al estado previo al pulso, indicado como control) durante y después del pulso de frío. Datos correspondientes a animales delgados (izquierda) y Obesos (derecha) 30 min antes, 60 y 120 min del pulso frío y a los 60 minutos después del pulso frío (minuto 180) durante el día y durante la noche. B) Perfil diario de termorregulación corporal en ciclo luz-oscuridad (LO) con reto al pulso frío de temperatura entre un ratón delgado (línea negra) y obeso (línea gris).

El fenotipo obeso de *N. alstoni* muestra una tasa metabólica menor que los ratones delgados, lo que sugiere un posible déficit energético o un cambio en el set-point para el ahorro de energía diario que puede estar influyendo directamente en el control de la Tc tanto en estado termo-neutral como en el reto de temperatura baja. La respuesta de termorregulación posiblemente esté atenuada por una integración hipotalámica reducida que no inicie los procesos de termogénesis correspondiente o al menos no a la intensidad requerida como ocurre en animales delgados. De esta manera, el bajo tono neuronal no es recibido al TAP, el cual también presenta irregularidades estructurales del tejido como la falta de vascularidad y de adipocitos pardos.

5.3 Expresión de la proteína UCP1, BMAL1 y PER1 en adiposo pardo y blanco

Se analizaron en Western Blot las muestras de tejido adiposo pardo de 13 ratones delgados para todas las proteínas y de 8 obesos para UCP1, 10 para BMAL1 y 9 para PER1. La presencia relativa de UCP1 en el TAP se muestra significativamente disminuida o atenuada en los ratones obesos (Figura 13A), esto podría correlacionar con la menor capacidad termogénica a consecuencia de la desintegración estructural o reestructuración del TAP interescapular en los ratones obesos debido a la integración del TAB en esta zona y sugiriendo un menor potencial termogénico no tiritante. Por otro lado, se desconoce que ocurre con otros mecanismos relacionados con este proceso termorregulatorio, aunque también se observa que existe disminución de termogénesis por actividad locomotora en *N. alstoni*, lo que implicaría que por un lado la actividad del TAP se encuentra comprometida ya sea por baja conexión-señal con vías hipotalámicas y por otro lado existe una deficiencia al estímulo a producir movilidad. En cuanto a la expresión de UCP1 en el TAB no se detectó.

En otros modelos de roedores, la delección de UCP1 ($^{-/-}$) altera el metabolismo de las grasas en el TAB, incrementando la expresión de genes lipogénicos, los niveles de Glut4 y lipólisis en el TAB inguinal y la liberación y/o esparcimiento de grasa epididimal, permitiendo la acumulación de TAG en el hígado y ácidos grasos libres en sangre (FFA, siglas en inglés) (Bond & Ntambi, 2018). *N. alstoni* no elimina la producción de la proteína UCP1, sin embargo se observó una nula expresión en el TAB, lo que podría relacionarse con la triacilgliceridemia en los ratones obesos (Carmona-Alcocer et al., 2012) y altos niveles de TAG hepáticos y FFA (Pérez-Mendoza et al., 2018). Por otro lado, en este estudio no se observaron diferencias significativas en la estructura de los adipocitos blancos, pero sí una tendencia en el tamaño de los adipocitos en el TAB visceral lo que podría sugerir que este tejido sufre un proceso similar en el esparcimiento de la grasa y por lo tanto la acumulación de TG y FFA.

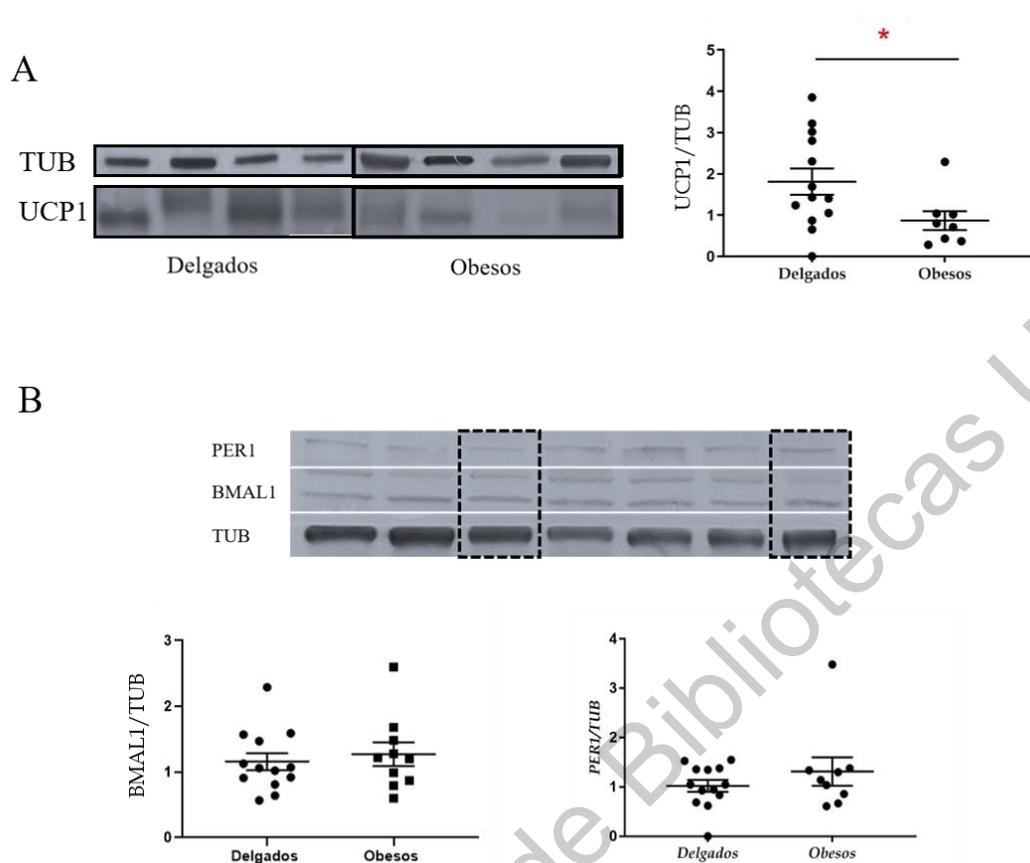


Figura 13. Presencia relativa de las proteínas UCP1, BMAL1 y PER1 del TAP interescapular.

A) Diferencias en la proteína UCP1, del lado izquierdo se muestran ejemplos representativos del Western blot y del lado derecho la cantidad relativa de UCP1/Tubulina. B) Imagen del western blot de proteínas PER1 y BMAL1 con su respectiva distribución relativa con Tubulina, los rectángulos con línea punteada muestran blots de tejido de ratones obesos y el resto son ratones delgados. Se muestran diferencias significativas en la expresión relativa entre grupos. (T-tests $* < p = 0.05$).

En cuanto a la expresión de BMAL1 y PER1, las muestras fueron tomadas al medio día por lo que BMAL1 (como heterodímero con CLOCK) se encuentra más presente o activa, permitiendo la transcripción de PER1 la cual se acumula (junto con CRYs) para tener actividad en la noche e inhibir su propia transcripción. En el análisis de western blot se observa la presencia de ambas, por lo que el sistema de retroalimentación a esa hora del día parece estar funcionando. Sin embargo, no se observaron diferencias contrastantes entre los grupos de ratones delgados y obesos (Figura 13B) a esta hora del día por lo que faltaría comparar con horarios de la noche y observar sí el mecanismo de regulación circadiana en el

tejido interescapular sigue conservando su ritmicidad para la expresión de estas proteínas y su interacción con el tejido.

En otros ratones en que hay déficit en la expresión de *Bmall* ocurre un incremento de TAP y la inducción de UCP1, asociado a un incremento en la termorregulación, lo que sugiere que la actividad de *Bmall* inhibe la formación de adipocitos pardos y a su vez bloquea la capacidad termogénica a través de las cascadas de señalización de *TGF- β* , *BMP* y *Wnt* (Guo et al., 2012; Nam et al., 2015). Por el contrario, Li y colaboradores (2013) indican que la expresión del gen *Bmall* fue inducida con frío generando una activación adrenérgica, necesario para la activación termogénica y para la formación de gotas lipídicas de mayor tamaño y no obstante, el *knock out* de este gen no afectó en la resistencia termogénica de los ratones y no parece ser indispensable para el desarrollo de adipocitos. Por otro lado, la expresión de *Per1* parece no ser afectada ni inducir ningún cambio en el TAP, manteniendo su papel de regulador negativo y presenta un efecto opuesto a *Bmall* (decremento de masa corporal alterada, aumento en la alimentación y sistema de glucosa eficiente) (Fonken & Nelson, 2014). Cabe señalar que en este estudio se hizo la determinación de BMAL1 y PER 1 en condiciones basales, lo que no descarta un posible cambio inmediatamente después de haber sido expuestos al frío.

Es probable que el déficit termorregulatorio en *N. alstoni* se deba a otros sistemas (como la función lipolítica) además de una posible desincronización del sistema circadiano del TA con el NSQ. Los resultados permiten sugerir una asociación entre la expresión de BMAL1 en el tejido interescapular, tanto en obesos como en delgados, debido a el papel inhibitorio de adipogénesis que ha tenido este tejido en otros trabajos previamente discutidos, sin embargo, se necesita profundizar más sobre el tema. Es posible que BMAL1 esté cumpliendo su papel de manera adecuada en los delgados debido a que no hay un desequilibrio neuroendocrino, mientras que en los obesos la función de BMAL1 esté jugando un papel inhibitorio debido al desequilibrio neuroendocrino que la obesidad genera y a la desintegración estructural del TAP, ya que hay menos adipocitos pardos por área de tejido.

5.4 Descripción histológica del TAP interescapular y TAB visceral

El análisis histológico del tejido adiposo interescapular muestra una estructura contrastante entre obesos y delgados (Figura 14). Los animales delgados poseen principalmente TAP con una estructura definida a manera de células chicas y opacas por la densidad mitocondrial y únicamente conformada por adipocitos pardos (Figura 14B y D). En todos los cortes histológicos de individuos delgados se puede observar la presencia de TAB, casi siempre rodeando el TAP, lo que podría contribuir con la desintegración o reestructuración del TAP cuando el organismo está en condiciones de desarrollar obesidad.

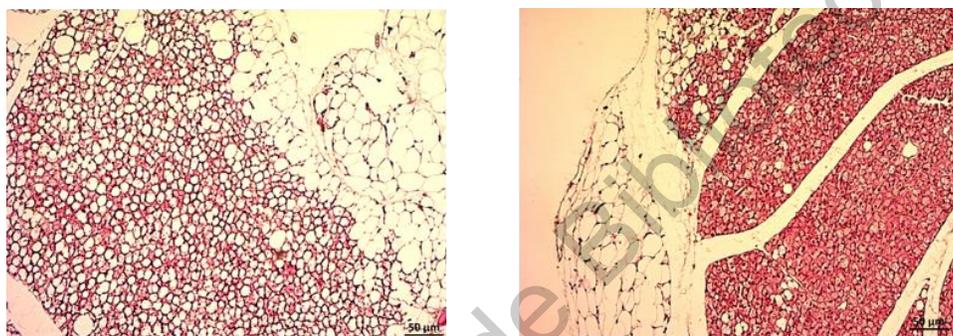


Figura 14. Población de adipocitos blancos en los extremos del TAP. Cada imagen corresponde a un individuo con fenotipo delgado. Se puede observar diferente concentración de TAB a los alrededores del TAP y diferente concentración de adipocitos blancos entre el TAP, siendo en mayor grado en la imagen izquierda.

Por el contrario, el tejido adiposo interescapular en los ratones obesos está notablemente reducido en adipocitos pardos y presenta una composición mayormente por adipocitos blancos (Figura 15 A y C) pareciendo ser una característica específica en la obesidad genética o adquirida, donde la función y la apariencia del TAP se vuelve más parecida al TAB por la infiltración (cuyos adipocitos blancos permanecen en la periferia del TAP) o blanqueamiento del mismo, contribuyendo a un estado inflamatorio sistémico el cual aún no se entiende del todo (Kotzbeck et al., 2018). Hasta ahora los resultados obtenidos, nos hacen sugerir que la obesidad en *N. alstoni* y la deficiencia termorregulatoria es mediada por un desbalance entre el TAB-TAP. Sin embargo, se necesitan más experimentos para corroborar.

Las gráficas del lado derecho a las micrografías (Figura 15G, arriba y en medio) son inversamente proporcionales, describiendo el peso en gramos del TAP interescapular (con

diferencias significativas) y el porcentaje de adipocitos pardos en dicho tejido (sin diferencias significativas). De esta manera en los obesos el TAP en promedio es mucho más pesado (0.78 g) que en los delgados (0.17 g) sugiriendo la desintegración o restructuración del TAP y el porcentaje de adipocitos pardos es menor en los obesos que en delgados, debido a la entrada del TAB en la zona interescapular.

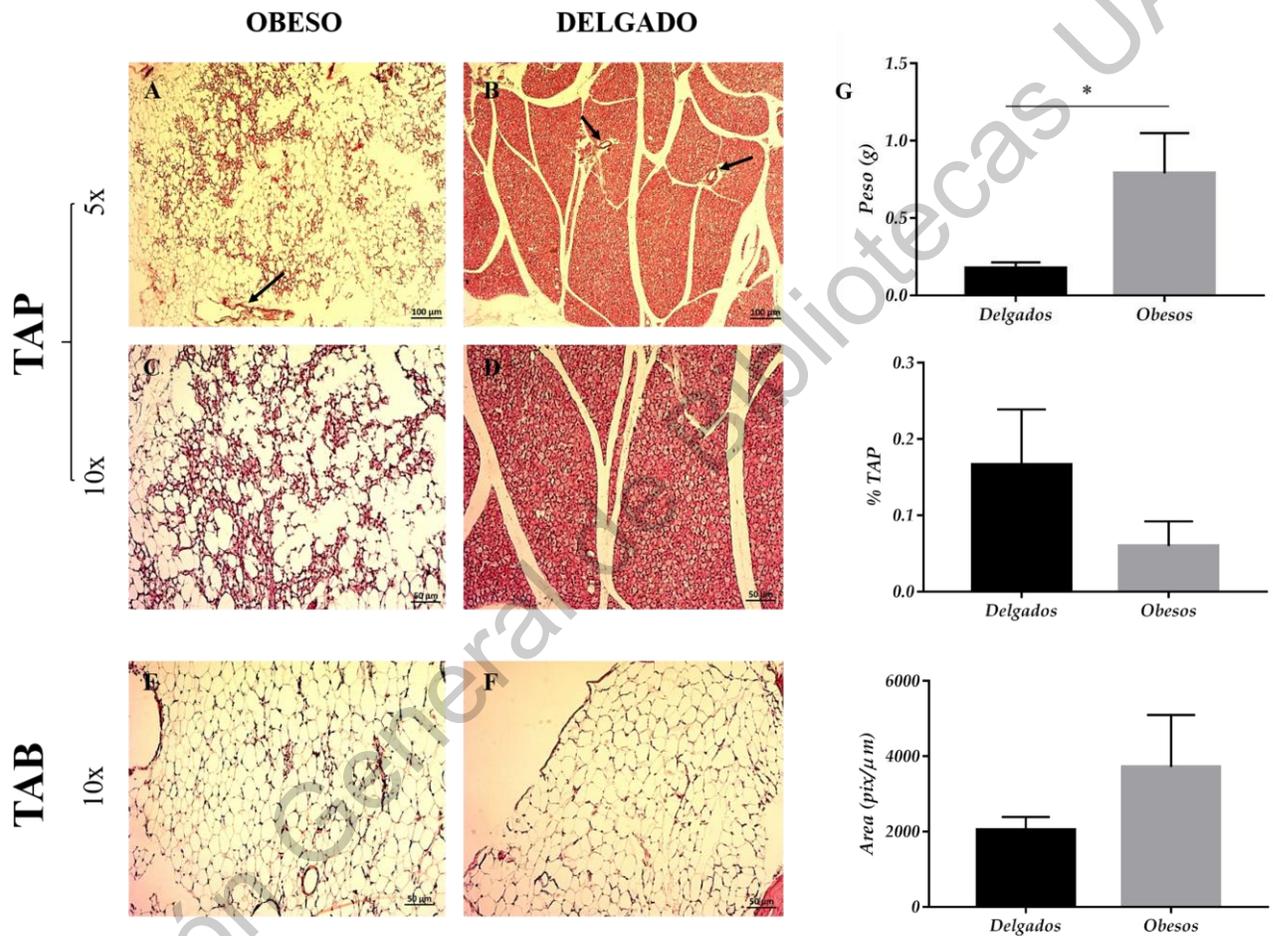


Figura 15. Histología del tejido interescapular (TAP) y visceral (TAB). Imágenes en 5x y 10x del TAP (A y C) y TAB (E) de un ratón obeso y del lado derecho (B, D y F) se muestran en el mismo orden las imágenes de un ratón delgado. Los vasos sanguíneos del TAP se muestran con flechas (A y B). Las gráficas de barras (G) representa las diferencias en promedio del peso en gramos y porcentaje del TAP interescapular (arriba y en medio) siendo inversamente proporcionales, además del tamaño de adipocito blanco (abajo) entre ratones obesos (gris) y delgados (negros). Diferencias significativas del T-student (* $p > 0.05$). Barras de error estándar.

En otros estudios con diferentes modelos de obesidad en ratones, se ha observado un comportamiento similar en el TAP y TAB (Alcalá et al., 2017). Por otro lado, los vasos

sanguíneos no se encuentran definidos en el tejido de obesos, probablemente por el reacomodo o desintegración del TAP (Figura 15A) y siendo muy bien visibles en delgados (Figura 15B). La alta densidad vascular participa en dos procesos de importancia energética: flujo de oxígeno para la β -oxidación y el flujo del calor generado en el tejido, además de que la conexión del tejido con los capilares es de suma importancia para la directa conexión neuronal que regula la termogénesis (Cinti, 2015; Cinti et al., 2002). La descomposición o reestructuración del TAP en *N. alstoni* obeso podría sugerir una pérdida de la interacción entre el sistema neuronal (inervación simpática, en especial conexión con el hipotálamo) y el tejido para regular la termogénesis, además, la relativa ausencia de UCPI puede ser una consecuencia de esta descomposición estructural del tejido.

En comparación, el TAB visceral o gonadal no posee una estructura tan definida, sino que es más laxa debido al contenido de grasa en los adipocitos blancos y no pareciera haber diferencia en el tamaño de los adipocitos blancos (Figura 15 E y F); sin embargo, al comparar el área aleatoria en adipocitos blancos, se puede observar una tendencia a ser mayores, posiblemente porque existan 2 poblaciones de adipocitos en los obesos (Figura 14G, debajo).

La pérdida de adipocitos pardos en el TAP y la desintegración del tejido es un factor importante que influye de manera negativa en la comunicación con centros neuronales hipotalámicos-TAP para la integración de procesos termorregulatorios, por lo que afecta la presencia-cantidad de UCPI activas. De esta manera, el uso de ácidos grasos es menor ya que las gotas lipídicas tanto del TAP como del TAB no están siendo utilizadas ni para producción de energía (en forma de ATP) para requerimientos diarios, ni para la generación de calor cuando el organismo se encuentra en condiciones especiales como la exposición a ambientes fríos, generando cambios en los valores de referencia metabólica o umbrales (set-points).

Por último, existen tres factores del ambiente que promueven torpor relacionado a procesos hibernatorios: reducción de la disponibilidad y calidad del alimento, disminución de la temperatura y fotoperiodo acortado, generando un decaimiento de la tasa metabólica, de manera que permite ahorro de energía para los procesos fisiológicos fundamentales y consecuentemente genera la reducción de la temperatura corporal (Cortes et al., 2018). De

esta manera, se podría considerar la naturaleza en *N. alstoni* sobre el aumento de peso debido a un proceso pre-torpor, a pesar de que se desconoce si existen individuos obesos en campo y que las características que posee en laboratorio, metabólicamente hablando, estén más relacionadas con la obesidad. No obstante, el decremento de la tasa metabólica y/o la disminución en la capacidad termogénica permiten un mejor almacenamiento de calorías en grasas, prolongando la supervivencia en tiempos de hambruna y además, se asocian con dos componentes del estado de inanición los cuales son la conservación de energía y la preservación de proteínas (Landsberg et al., 2009). De esta manera, estas características en los roedores obesos, permitirían la supervivencia del individuo en su ambiente natural.

VI. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Los estudios relacionados con procesos termorregulatorios en el TAP y su asociación con la obesidad y problemas metabólicos permiten aumentar el conocimiento de los diversos mecanismos y su interacción. Los resultados de este trabajo indican perfiles diarios de tasa metabólica y termogénica relativamente bajos, en diferentes valores de referencia en comparación al fenotipo delgado, lo cuales son asociados a la baja expresión de UCP1 ya que cumple un papel fundamental para ambos procesos y cuyo funcionamiento también radica en el uso de ácidos grasos. En cuanto la expresión de genes-proteína reloj habrá que buscar más a fondo su papel en este modelo, ya que no se logró corroborar una disrupción rítmica o ciclicidad de las moléculas y además es relevante observar como intervienen de manera diferencial en obesos en los diferentes mecanismos y procesos homeostáticos. En trabajo realizado en el TAP y TAB sugieren un desequilibrio tanto estructural como molecular, sin embargo, falta explicar el papel que tiene el TABe dentro de este mismo proceso de obesidad. Por otro lado, un análisis más robusto en cuanto a la comparación de datos por sexo permitiría mayor claridad de los datos.

El acercamiento fisiológico y bioquímico que se ha obtenido actualmente en este modelo permite abrir diversos panoramas sobre nuevos temas de investigación como el papel de la mitocondria en este proceso termogénico y metabólico en términos de estrés oxidativo, respiración celular y su interacción con la UCP1 en el TAP. El TABe muestra ser un tejido de importancia en otros estudios, por lo que sería interesante explorar más su composición y su papel en *N. alstoni*. Además, es importante explorar el área molecular de estos procesos (tanto circadiano como en la etiología de la obesidad), explorando la relación gen-proteína y las modificaciones, mutaciones o polimorfismos que implican un cambio relevante para el fenotipo obeso.

VIII. REFERENCIAS

- Alcalá, M., Calderon-Dominguez, M., Bustos, E., Ramos, P., Casals, N., Serra, D., Viana, M., & Herrero, L. (2017). Increased inflammation, oxidative stress and mitochondrial respiration in brown adipose tissue from obese mice. *Scientific Reports*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16463-6>
- Alvarez, T., & Mayo-Aceves. (1993). {C}ONTRIBUCION AL CONOCIMIENTO DE LOS HABITOS ALIMENTARIOS DEL RATON DE LOS VOLCANES NEOTOMODON ALSTONI (MERRIAM, 1898). *Acta Zool. Mex.*, 59, 1--51.
- Báez-Ruiz, A., Luna-Moreno, D., Carmona-Castro, A., Cárdenas-Vázquez, R., Díaz-Muñoz, M., Carmona-Alcocer, V., Fuentes-Granados, C., & Manuel, M. A. (2014). Hypothalamic expression of anorexigenic and orexigenic hormone receptors in obese females *Neotomodon alstoni*: Effect of fasting. *Nutritional Neuroscience*, 17(1), 31–36. <https://doi.org/10.1179/1476830513Y.00000000063>
- Bartelt, A., Bruns, O. T., Reimer, R., Hohenberg, H., Ittrich, H., Peldschus, K., Kaul, M. G., Tromsdorf, U. I., Weller, H., Waurisch, C., Eychmüller, A., Gordts, P. L. S. M., Rinninger, F., Bruegelmann, K., Freund, B., Nielsen, P., Merkel, M., & Heeren, J. (2011). Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nature Medicine*, 17(2), 200–206. <https://doi.org/10.1038/nm.2297>
- Bartelt, A., & Heeren, J. (2014). Adipose tissue browning and metabolic health. *Nature Reviews Endocrinology*, 10(1), 24–36. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.204>
- Bazán, N. E. (2012). UNIDAD III : *Metabolismo METABOLISMO ENERGÉTICO*.
- Bechtold, D. A., & Loudon, A. S. I. (2013). Hypothalamic clocks and rhythms in feeding behaviour. *Trends in Neurosciences*, 36(2), 74–82. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.12.007>

- Berry, R., Church, C. D., Gericke, M. T., Jeffery, E., Colman, L., & Rodeheffer, M. S. (2014). Imaging of adipose tissue. In *Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 537). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411619-1.00004-5>
- Bibak, B., Khalili, M., Rajaei, Z., Soukhtanloo, M., Hadjzadeh, M.-A.-R., & Hayatdavoudi, P. (2014). Effects of melatonin on biochemical factors and food and water consumption in diabetic rats. *Advanced Biomedical Research*, 3, 173. <https://doi.org/10.4103/2277-9175.139191>
- Blum, I. D., Bell, B., & Wu, M. N. (2018). Time for Bed: Genetic Mechanisms Mediating the Circadian Regulation of Sleep. *Trends in Genetics*, 34(5), 379–388. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.01.001>
- Bond, L. M., & Ntambi, J. M. (2018). UCP1 deficiency increases adipose tissue monounsaturated fatty acid synthesis and trafficking to the liver. *Journal of Lipid Research*, 59(2), 224–236. <https://doi.org/10.1194/jlr.M078469>
- Bray, M. S., & Young, M. E. (2007). Circadian rhythms in the development of obesity: Potential role for the circadian clock within the adipocyte. *Obesity Reviews*, 8(2), 169–181. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2006.00277.x>
- Buijs, R. M., Guzmán Ruiz, M. A., Méndez Hernández, R., & Rodríguez Cortés, B. (2019). The suprachiasmatic nucleus; a responsive clock regulating homeostasis by daily changing the setpoints of physiological parameters. *Autonomic Neuroscience*, 218, 43–50. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.autneu.2019.02.001>
- Buijs, R. M., Ruiz, M. A. G., Hernández, R. M., & Cortés, B. R. (2019). Autonomic Neuroscience : Basic and Clinical The suprachiasmatic nucleus ; a responsive clock regulating homeostasis by daily changing the setpoints of physiological parameters. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 218(November 2018), 43–50.

<https://doi.org/10.1016/j.autneu.2019.02.001>

Burnett, C. M. L., & Grobe, J. L. (2014). Dietary effects on resting metabolic rate in C57BL/6 mice are differentially detected by indirect (O₂/CO₂ respirometry) and direct calorimetry. *Molecular Metabolism*, 3(4), 460–464.

<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2014.03.003>

Bury, S., Cichoń, M., Bauchinger, U., & Sadowska, E. T. (2018). High oxidative stress despite low energy metabolism and vice versa: Insights through temperature acclimation in an ectotherm. *Journal of Thermal Biology*, 78, 36–41.

<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.08.003>

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 and Behavior*, 105(3), 727–733.

<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.09.022>

Choe, S. S., Huh, J. Y., Hwang, I. J., Kim, J. I., & Kim, J. B. (2016). Adipose tissue remodeling: Its role in energy metabolism and metabolic disorders. *Frontiers in Endocrinology*, 7(APR), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00030>

Chouchani, E. T., Kazak, L., Jedrychowski, M. P., Lu, G. Z., Erickson, B. K., Szpyt, J., Pierce, K. A., Laznik-Bogoslavski, D., Vetrivelan, R., Clish, C. B., Robinson, A. J., Gygi, S. P., & Spiegelman, B. M. (2016). Mitochondrial ROS regulate thermogenic energy expenditure and sulfenylation of UCP1. *Nature*, 532(7597), 112–116.

<https://doi.org/10.1038/nature17399>

Christou, S., Wehrens, S. M. T., Isherwood, C., Möller-Levet, C. S., Wu, H., Revell, V. L., Bucca, G., Skene, D. J., Laing, E. E., Archer, S. N., & Johnston, J. D. (2019). Circadian

regulation in human white adipose tissue revealed by transcriptome and metabolic network analysis. *Scientific Reports*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39668-3>

Cinti, S. (2015). The Adipose Organ: Implications For Prevention And Treatment Of Obesity. In M.L. Frelut (Ed.), *The ECOG's EBook on Child and Adolescent Obesity*.

<https://ebook.ecog-obesity.eu/wp-content/uploads/2015/02/ECOG-Obesity-eBook-The-Adipose-Organ-Implications-For-Prevention-And-Treatment-Of-Obesity.pdf>

Cinti, S., Cancellò, R., Zingaretti, M. C., Ceresi, E., De Matteis, R., Giordano, A., Himms-Hagen, J., & Ricquier, D. (2002). CL316,243 and cold stress induce heterogeneous expression of UCP1 mRNA and protein in rodent brown adipocytes. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 50(1), 21–31.

<https://doi.org/10.1177/002215540205000103>

Colwell, C. S. (2011). *Linking neural activity and molecular oscillations in the SCN*. 12.

<https://doi.org/10.1038/nrn3086>

Cornelissen, G. (2019). Altered Circadian Energy Metabolism and Chronobiological Risk Factors of Chronic Diseases. In *The Role of Functional Food Security in Global Health*.

Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813148-0.00030-x>

Cortes, P. A., Bozinovic, F., & Blier, P. U. (2018). Mitochondrial phenotype during torpor: Modulation of mitochondrial electron transport system in the Chilean mouse–opossum

Thylamys elegans. *Comparative Biochemistry and Physiology -Part A : Molecular and Integrative Physiology*, 221(November 2017), 7–14.

<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.12.014>

Dávila, L., & Jesús, A. (2014). *Redalyc.ACTUALIDAD EN TERMORREGULACIÓN*.

Elmqvist, J. K., Coppari, R., Balthasar, N., Ichinose, M., & Lowell, B. B. (2005). Identifying

- hypothalamic pathways controlling food intake, body weight, and glucose homeostasis. *Journal of Comparative Neurology*, 493(1), 63–71. <https://doi.org/10.1002/cne.20786>
- Fiori, C. Z., Martinez, D., Baronio, D., da Rosa, D. P., Kretzmann, N. A., Forgiarini, L. F., Montanari, C. C., Marroni, N. P., & Carissimi, A. (2014). Downregulation of uncoupling protein-1 mRNA expression and hypoadiponectinemia in a mouse model of sleep apnea. *Sleep and Breathing*, 18(3), 541–548. <https://doi.org/10.1007/s11325-013-0916-2>
- Fischer, A. W., Cannon, B., & Nedergaard, J. (2018). Optimal housing temperatures for mice to mimic the thermal environment of humans: An experimental study. *Molecular Metabolism*, 7(October 2017), 161–170. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.10.009>
- Fonken, L. K., & Nelson, R. J. (2014). The effects of light at night on circadian clocks and metabolism. *Endocrine Reviews*, 35(4), 648–670. <https://doi.org/10.1210/er.2013-1051>
- Froy, O., & Garaulet, M. (2018). The circadian clock in white and brown adipose tissue: Mechanistic, endocrine, and clinical aspects. *Endocrine Reviews*, 39(3), 261–273. <https://doi.org/10.1210/er.2017-00193>
- Froy, O., & Miskin, R. (2007). *The interrelations among feeding , circadian rhythms and ageing*. 82, 142–150. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2007.03.002>
- Garaulet, M., Corbalán-Tutau, M. D., Madrid, J. A., Baraza, J. C., Parnell, L. D., Lee, Y.-C., & Ordovas, J. M. (2010). PERIOD2 variants are associated with abdominal obesity, psycho-behavioral factors, and attrition in the dietary treatment of obesity. *Journal of the American Dietetic Association*, 110(6), 917–921.
- Ghaben, A. L., & Scherer, P. E. (2019). Adipogenesis and metabolic health. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(4), 242–258. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0093-z>
- Gómez-Abellán, P., Gómez-Santos, C., Madrid, J. A., Milagro, F. I., Campion, J., Martínez,

- J. A., Ordovás, J. M., & Garaulet, M. (2010). Circadian expression of adiponectin and its receptors in human adipose tissue. *Endocrinology*, *151*(1), 115–122. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0647>
- Gómez-Abellán, P., Hernández-Morante, J. J., Luján, J. A., Madrid, J. A., & Garaulet, M. (2008). Clock genes are implicated in the human metabolic syndrome. *International Journal of Obesity*, *32*(1), 121–128. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803689>
- Gréchez-cassiau, A., Feillet, C., Guérin, S., Delaunay, F., Feillet, C., Guérin, S., Delaunay, F., Delaunay, F., Gre, A., Antipolis, N. S., Umr, C., & Inserm, U. (2015). *The hepatic circadian clock regulates the choline kinase α gene through the BMAL1-REV-ERB α axis*. *The hepatic circadian clock regulates the choline kinase α gene through the BMAL1-REV-ERB α axis*. 0528. <https://doi.org/10.3109/07420528.2015.1046601>
- Gregorio, C. A., Gail, D. B., & Massaro, D. (1976). Influence of fasting on lung oxygen consumption and respiratory quotient. *The American Journal of Physiology*, *230*(2), 291–294. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1976.230.2.291>
- Grimaldi, B., Bellet, M. M., Katada, S., Astarita, G., Hirayama, J., Amin, R. H., Granneman, J. G., Piomelli, D., Leff, T., & Sassone-corsi, P. (2010). Article PER2 Controls Lipid Metabolism by Direct Regulation of PPAR γ . *Cell Metabolism*, *12*(5), 509–520. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.10.005>
- Groff, J. L., & Gropper, S. A. S. (2000). *Advanced Nutrition and Human Metabolism*. West/Wadsworth. <https://books.google.com.mx/books?id=E9NqAAAAMAAJ>
- Guerra, C., Walsh, K., Kozak, L. P., Guerra, C., Koza, R. A., Yamashita, H., Walsh, K., & Kozak, L. P. (1998). *Emergence of brown adipocytes in white fat in mice is under genetic control . Effects on body weight and adiposity . Find the latest version : 102*(2), 412–420.

- Guo, B., Chatterjee, S., Li, F., Kim, J. M., Lee, J., Yechoor, V. K., Minze, L. J., Hsueh, W., & Ma, K. (2012). The clock gene, brain and muscle Arnt-like 1, regulates adipogenesis via Wnt signaling pathway. *FASEB Journal*, 26(8), 3453–3463. <https://doi.org/10.1096/fj.12-205781>
- Hajer, G. R., Van Haeften, T. W., & Visseren, F. L. J. (2008). Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *European Heart Journal*, 29(24), 2959–2971. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehn387>
- Harper, M. (2020). *highlighted topics*. 2187–2198.
- Hastings, M. H., Maywood, E. S., & Brancaccio, M. (2018). Generation of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus. *Nature Reviews Neuroscience*, 19(8), 453–469. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0026-z>
- Hernández-García, J., Navas-Carrillo, D., & Orenes-Piñero, E. (2019). Alterations of circadian rhythms and their impact on obesity, metabolic syndrome and cardiovascular diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 0(0), 1–10. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1556579>
- Joumal, E., Trayhurn, P., & James, W. P. T. (1978). Pfljgers Archiv Thermoregulation and Non-Shivering Thermogenesis in the Genetically Obese (ob/ob) Mouse. *Pflfigers Arch*, 373(1), 189–193. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F00584859.pdf>
- Kataoka, N., Hioki, H., Kaneko, T., & Nakamura, K. (2014). Article Psychological Stress Activates a Dorsomedial Hypothalamus-Medullary Raphe Circuit Driving Brown Adipose Tissue Thermogenesis and Hyperthermia. *Cell Metabolism*, 20(2), 346–358. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.05.018>
- Kennaway, D. J., Owens, J. A., Voultios, A., Boden, M. J., & Varcoe, T. J. (2007). Metabolic homeostasis in mice with disrupted Clock gene expression in peripheral

tissues. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 293(4), 1528–1537. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00018.2007>

Kikuchi, R., Tsuji, T., Watanabe, O., Yamaguchi, K., Furukawa, K., Nakamura, H., & Aoshiba, K. (2017). Hypercapnia accelerates adipogenesis: A novel role of high co2 in exacerbating obesity. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 57(5), 570–580. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2016-0278OC>

King, B. M., & King, B. M. (2013). *The Modern Obesity Epidemic, Ancestral Hunter-Gatherers, and the Sensory/Reward Control of Food Intake*. 68(2).

Kotzbeck, P., Giordano, A., Mondini, E., Murano, I., Severi, I., Venema, W., Cecchini, M. P., Kershaw, E. E., Barbatelli, G., Haemmerle, G., Zechner, R., & Cinti, S. (2018). Brown adipose tissue whitening leads to brown adipocyte death and adipose tissue inflammation. *Journal of Lipid Research*, 59(5), 784–794. <https://doi.org/10.1194/jlr.M079665>

Landsberg, L., Young, J. B., Leonard, W. R., Linsenmeier, R. A., & Turek, F. W. (2009). Is obesity associated with lower body temperatures? Core temperature: a forgotten variable in energy balance. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 58(6), 871–876. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2009.02.017>

Lee, Y. H., Mottillo, E. P., & Granneman, J. G. (2014). Adipose tissue plasticity from WAT to BAT and in between. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1842(3), 358–369. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.05.011>

Legates, T. A., Fernandez, D. C., & Hattar, S. (2014). *Light as a central modulator of circadian rhythms , sleep and affect*. June. <https://doi.org/10.1038/nrn3743>

Li, S., Yu, Q., Wang, G. X., & Lin, J. D. (2013). The Biological Clock is Regulated by Adrenergic Signaling in Brown Fat but is Dispensable for Cold-Induced

- Thermogenesis. *PLoS ONE*, 8(8), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070109>
- Lugogo, N. L., Bappanad, D., & Kraft, M. (2011). Biochimica et Biophysica Acta Obesity , metabolic dysregulation and oxidative stress in asthma ☆. *BBA - General Subjects*, 1810(11), 1120–1126. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.09.004>
- Luna-Illades, C., Morales, T., & Miranda-Anaya, M. (2017). Decreased food anticipatory activity of obese mice relates to hypothalamic c-Fos expression. *Physiology and Behavior*, 179(March), 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.05.020>
- Luna-Moreno, D., Pérez-Mendoza, M., Carmona-Castro, A., & Miranda-Anaya, M. (2018). Daily profile in ghrelin and hypothalamic ghrelin receptors in obese and lean mice *Neotomodon alstoni*. *Biological Rhythm Research*, 49(4), 515–520. <https://doi.org/10.1080/09291016.2017.1385979>
- Meijer, J. H. (2001). Photic entrainment in mammals. In *Circadian clocks* (pp. 183–222). Springer.
- Melvin, R. G., & Andrews, M. T. (2009). Torpor induction in mammals: recent discoveries fueling new ideas. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 20(10), 490–498. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2009.09.005>
- Miletta, M. C., & Horvath, T. L. (2018). From white to beige: a new hypothalamic pathway. *EMBO Reports*, 19(4), 1–2. <https://doi.org/10.15252/embr.201845928>
- Miranda-Anaya, M., Alcocer, C., & Patricia, V. (2010). La obesidad y la regulación del reloj circadiano. *Spring*.
- Miranda-Anaya, M., Pérez-Mendoza, M., Juárez-Tapia, C. R., & Carmona-Castro, A. (2019). The volcano mouse *Neotomodon alstoni* of central Mexico, a biological model in the study of breeding, obesity and circadian rhythms. *General and Comparative*

- Endocrinology*, 273(February), 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.ygcn.2018.04.024>
- Mitchell, S. E., Tang, Z. H., Kerbois, C., Delville, C., Deros, D., Green, C. L., Wang, Y., Han, J. J. D., Chen, L., Douglas, A., Lusseau, D., Promislow, D. E. L., & Speakman, J. R. (2017). The effects of graded levels of calorie restriction: VIII. Impact of short term calorie and protein restriction on basal metabolic rate in the C57BL/6 mouse. *Oncotarget*, 8(11), 17453–17474. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15294>
- Moore, R. Y., & Leak, R. K. (2001). Suprachiasmatic Nucleus. In J. S. Takahashi, F. W. Turek, & R. Y. Moore (Eds.), *Circadian Clocks* (pp. 141–179). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1201-1_7
- Morgan, E. (2004). Ecological significance of biological clocks. *Biological Rhythm Research*, 35(1–2), 3–12. <https://doi.org/10.1080/09291010412331313205>
- Morrison, S. F., Madden, C. J., & Tupone, D. (2014). Central neural regulation of brown adipose tissue thermogenesis and energy expenditure. *Cell Metabolism*, 19(5), 741–756. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.02.007>
- Morrison, S. F., & Nakamura, K. (2011). Central neural pathways for thermoregulation. *Frontiers in Bioscience*, 16(1), 74–104. <https://doi.org/10.2741/3677>
- Nagashima, K., Tokizawa, K., Marui, S., & Uchida, Y. (2019). Circadian Body Temperature Rhythm and the Interaction with Energy State. *Homeostasis - An Integrated Vision*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76229>
- Nakamura, K., Matsumura, K., Hu, T., Nakamura, Y., Hioki, H., Fujiyama, F., Boldogko, Z., Ko, M., & Kobayashi, S. (2004). *Identification of Sympathetic Premotor Neurons in Medullary Raphe Regions Mediating Fever and Other Thermoregulatory Functions*. 24(23), 5370–5380. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1219-04.2004>
- Nakamura, Y., & Nakamura, K. (2018). Central regulation of brown adipose tissue

thermogenesis and energy homeostasis dependent on food availability. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 470(5), 823–837. <https://doi.org/10.1007/s00424-017-2090-z>

Nam, D., Guo, B., Chatterjee, S., Chen, M. H., Nelson, D., Yechoor, V. K., & Ma, K. (2015).

The adipocyte clock controls brown adipogenesis through the TGF- β and BMP signaling pathways. *Journal of Cell Science*, 128(9), 1835–1847. <https://doi.org/10.1242/jcs.167643>

Nicholls, D. G., & Rial, E. (2016). A novel regulatory mechanism for the brown-fat uncoupling protein? *Nature Structural and Molecular Biology*, 23(5), 364–365. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3221>

Oishi, K., & Hashimoto, C. (2018). Short-term time-restricted feeding during the resting phase is sufficient to induce leptin resistance that contributes to development of obesity and metabolic disorders in mice. *Chronobiology International*, 35(11), 1576–1594. <https://doi.org/10.1080/07420528.2018.1496927>

Opperhuizen, A.-L., Wang, D., Foppen, E., Jansen, R., Boudzovitch-Surovtseva, O., de Vries, J., Fliers, E., & Kalsbeek, A. (2016). Feeding during the resting phase causes profound changes in physiology and desynchronization between liver and muscle rhythms of rats. *European Journal of Neuroscience*, 44(10), 2795–2806. <https://doi.org/10.1111/ejn.13377>

Pérez-Mendoza, M., Luna-Moreno, D., Carmona-Castro, A., Rodríguez-Guadarrama, H. A., Montoya-Gómez, L. M., Díaz-Muñoz, M., & Miranda-Anaya, M. (2017). Neotomodon alstoni mice present sex differences between lean and obese in daily hypothalamic leptin signaling. *Chronobiology International*, 34(7), 956–966. <https://doi.org/10.1080/07420528.2017.1331354>

- Pérez-Mendoza, M., Rivera-Zavala, J. B., Rodríguez-Guadarrama, A. H., Montoya-Gomez, L. M., Carmona-Castro, A., Díaz-Muñoz, M., & Miranda-Anaya, M. (2018). Daily cycle in hepatic lipid metabolism in obese mice, *Neotomodon alstoni*: Sex differences. *Chronobiology International*, 35(5), 643–657. <https://doi.org/10.1080/07420528.2018.1424178>
- Pittendrigh, C. (1993). Temporal Organization: Reflections of a Darwinian Clock-Watcher. *Annual Review of Physiology*, 55(1), 17–54. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.55.1.17>
- Press, D. (2016). *Metabolic signals in sleep regulation : recent insights*. 9–20.
- Pujia, A., Mazza, E., Ferro, Y., Gazzaruso, C., Coppola, A., Doldo, P., Grembiale, R. D., Pujia, R., & Romeo, S. (2019). *Lipid Oxidation Assessed by Indirect Calorimetry Predicts Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetes*. 9(January), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00806>
- Qasim, A., Turcotte, M., de Souza, R. J., Samaan, M. C., Champredon, D., Dushoff, J., Speakman, J. R., & Meyre, D. (2018). On the origin of obesity: identifying the biological, environmental and cultural drivers of genetic risk among human populations. *Obesity Reviews*, 19(2), 121–149. <https://doi.org/10.1111/obr.12625>
- Refinetti, R. (2015). Comparison of light, food, and temperature as environmental synchronizers of the circadian rhythm of activity in mice. *Journal of Physiological Sciences*, 65(4), 359–366. <https://doi.org/10.1007/s12576-015-0374-7>
- Rudic, R. D., Mcnamara, P., Curtis, A., Boston, R. C., Panda, S., Hogenesch, J. B., & Fitzgerald, G. A. (2004). *BMAL1 and CLOCK , Two Essential Components of the Circadian Clock , Are Involved in Glucose Homeostasis*. 2(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020377>

- Sadowska, J., Gębczyński, A. K., & Konarzewski, M. (2017). Metabolic risk factors in mice divergently selected for BMR fed high fat and high carb diets. *PLoS ONE*, *12*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172892>
- Sen, S., Raingard, H., Dumont, S., Kalsbeek, A., Vuillez, P., & Challet, E. (2017). Ultradian feeding in mice not only affects the peripheral clock in the liver, but also the master clock in the brain. *Chronobiology International*, *34*(1), 17–36. <https://doi.org/10.1080/07420528.2016.1231689>
- Serin, Y., & Acar Tek, N. (2019). Effect of Circadian Rhythm on Metabolic Processes and the Regulation of Energy Balance. *Annals of Nutrition and Metabolism*, *74*(4), 322–330. <https://doi.org/10.1159/000500071>
- Shi, S., Ansari, T. S., McGuinness, O. P., Wasserman, D. H., & Johnson, C. H. (2013). Article Circadian Disruption Leads to Insulin Resistance and Obesity. *Current Biology*, *23*(5), 372–381. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.01.048>
- Singer, P. (2016). Simple equations for complex physiology: Can we use VCO₂ for calculating energy expenditure? *Critical Care*, *20*(1), 3–4. <https://doi.org/10.1186/s13054-016-1251-3>
- Stillman, B., Stewart, D. J., Grodzicker, T., & Laboratory, C. S. H. (2007). *Clocks and Rhythms*. Cold Spring Harbor Laboratory. <https://books.google.com.mx/books?id=j-wUsLLGzvEC>
- Takahashi, J. S. (2017). Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. *Nature Publishing Group*, *18*(March). <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.150>
- Takahashi, J. S., Hong, H. K., Ko, C. H., & McDearmon, E. L. (2008). The genetics of mammalian circadian order and disorder: Implications for physiology and disease. *Nature Reviews Genetics*, *9*(10), 764–775. <https://doi.org/10.1038/nrg2430>

- Turek, F. W., Joshu, C., Kohsaka, A., Lin, E., Ivanova, G., McDearmon, E., Laposky, A., Losee-olson, S., Easton, A., Jensen, D. R., Eckel, R. H., Takahashi, J. S., & Bass, J. (2005). *Obesity and Metabolic Syndrome in Circadian Clock Mutant Mice*. 308(May), 1043–1046.
- van Marken Lichtenbelt, W. D., Pallubinsky, H., & te Kulve, M. (2018). Modulation of thermogenesis and metabolic health: a built environment perspective. *Obesity Reviews*, 19, 94–101. <https://doi.org/10.1111/obr.12789>
- van Marken Lichtenbelt, Wouter D., & Schrauwen, P. (2011). Implications of nonshivering thermogenesis for energy balance regulation in humans. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 301(2). <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00652.2010>
- Zhang, F., Hao, G., Shao, M., Nham, K., An, Y., Wang, Q., Zhu, Y., Kusminski, C. M., Hassan, G., Gupta, R. K., Zhai, Q., Sun, X., Scherer, P. E., & Oz, O. K. (2018). An Adipose Tissue Atlas: An Image-Guided Identification of Human-like BAT and Beige Depots in Rodents. *Cell Metabolism*, 27(1), 252-262.e3. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2017.12.004>
- Zhang, W., & Bi, S. (2015). Hypothalamic Regulation of Brown Adipose Tissue Thermogenesis and Energy Homeostasis. *Frontiers in Endocrinology*, 6(August). <https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00136>