



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES



Impacto de la desincronización circadiana por fotoperiodo irregular sobre los perfiles de actividad diaria de ratones *Neotomodon alstoni*.

Tesis Individual

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Licenciado en **Biología**

Presenta:

Karina Guadalupe Ramírez Sandoval

Dirigido por:

Manuel Miranda Anaya

Querétaro, Qro., Abril de 2021.

Dirección General de Bibliotecas UAQ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES



Impacto de la desincronización circadiana por fotoperiodo irregular sobre los perfiles de actividad diaria de ratones *Neotomodon alstoni*.

Tesis Individual

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Licenciado en **Biología**

Presenta:

Karina Guadalupe Ramírez Sandoval

Dirigido por:

Manuel Miranda Anaya

Sinodales:

Manuel Miranda Anaya
Director

Firma

Moisés Pérez Mendoza
Secretario

Firma

Alma Dalia Luna Moreno
Vocal

Firma

Marco Antonio Sánchez Ramos
Vocal

Firma

Centro Universitario. Querétaro, Qro., Abril de 2021.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Dedicatorias:

A mi madre, por creer en mí, y porque sin su esfuerzo, dedicación y apoyo incondicional no habría llegado a donde estoy ahora. Y aunque siempre existirán roces y diferencias entre nosotros, siempre será mi motivación y uno de mis modelos seguir.

A Kike, por siempre darme su apoyo y motivación a seguir adelante.

A mis amigos, Tania (una gran compañera de laboratorio), Nayeli, Dani, Eliseo, Sara y Sandra, pues gracias a su compañía esta ha sido una de las mejores etapas de mi vida.

A Yaritza, porque aún en la distancia, siempre serás mi mejor amiga.

Agradecimientos:

A la UNAM por el apoyo económico a través de la beca de tesis de licenciatura de proyecto UNAM-PAPIIT IN200620 que se me fue otorgado.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, por darme las herramientas para forjarme tanto personal como profesionalmente, y por las oportunidades de crecimiento que siempre me ha brindado.

Al Doctor Manuel Miranda Anaya, mi director de tesis. Por aceptarme como su tesista, por su paciencia y dedicación para guiar la culminación de este proyecto. A mis sinodales, Dr. Marco Antonio Ramos Sánchez, Dra. Alma Dalia Luna Moreno y Dr. Moisés Pérez (que gracias a sus clases surgió en mí el interés hacia la cronobiología). A la Dra. Elvira Arellanes Licea, por proporcionarme su apoyo y conocimiento en el laboratorio siempre que lo necesité.

Gracias a la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación de la UNAM, por proporcionarme todos los medios necesarios para la realización de este proyecto.

ÍNDICE

RESUMEN	7
SUMMARY	8
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1. Introducción General.....	11
1.2. Los ritmos biológicos.....	12
1.3. Los Ciclos Circadianos.....	14
1.4. Reloj Maestro.....	16
1.5. El Núcleo Supraquiasmático.....	17
1.6. El Reloj Circadiano Molecular.....	20
1.7. Los efectos de la Luz como sincronizador.....	22
1.8 Sincronizadores no fóticos.....	23
1.8.1. Alimentación/Ingesta.....	23
1.8.2. Temperatura.....	24
1.8.3. Actividad/Excitación Conductual Inducida.....	24
1.9. Patrones de Actividad.....	25
1.9.1. Patrones de Actividad en el Laboratorio.....	26
1.10. Desincronización Circadiana.....	28
1.11. <i>Neotomodon alstoni</i> : El ratón de los volcanes.....	30
Justificación:.....	32
2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	33
2.1. Objetivo General.....	33
2.2. Objetivos Específicos.....	33
2.3. Hipótesis.....	33
3. MATERIALES Y MÉTODOS	34
3.1. Animales.....	34
3.2. Peso e Ingesta.....	34
3.3. Actividad Locomotriz.....	35
3.4. Protocolo de desincronización.....	36
3.5. Análisis de Datos.....	38
4. RESULTADOS	39
5. Discusión	54

6. Conclusiones.....	58
7. Anexos.....	60
Referencias:.....	61

ÍNDICE DE CUADROS

Tabla 1. Cronograma de desincronización utilizado para <i>N. alstoni</i>	37
Tabla 2. Prueba de Comparaciones Múltiples de Tuckey, entre el grupo control contra el grupo experimental, y entre las 3 semanas de desincronización.	42
Tabla 3. Prueba de Comparaciones Múltiples de Tuckey entre los periodos de avances y retrasos durante la fase diurna.	49
Tabla 4. Prueba de Comparaciones Múltiples de Tuckey entre los periodos de avances y retrasos durante la fase nocturna.	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquematación de los Parámetros del Ciclo Circadiano.....	14
Figura 2. El Núcleo Supraquiasmático.....	18
Figura 3. Vía multisináptica del NSQ hacia la glándula pineal.....	19
Figura 4. Principales Componentes del Reloj Molecular.....	21
Figura 5. Actograma.....	28
Figura 6. <i>Neotomodon alstoni</i> . (Foto tomada de internet).....	31
Figura 7. Sistema de Registro.....	36
Figura 8. Protocolo de Iluminación.....	37
Figura 9. Actogramas de tres ratones en protocolo de desincronización.	41
Figura 10. Actividad Total del grupo control y experimental entre grupo control (CTL) y tiempo de exposición a desincronización circadiana en las semanas 1, 3 y 5 (DCS).....	42
Figura 11. Diferencias en actividad diurna.....	43
Figura 12. Diferencias en actividad en fase nocturna.....	44
Figura 13. Comparación del promedio de actividad diurna (eventos por cada 10 min) durante las fases del protocolo de iluminación de avances y retrasos.	46
Figura 14. Comparación del promedio de actividad nocturna ante los Avances y Retrasos del protocolo de desincronización circadiana.	47
Figura 15. Peso Corporal y Consumo promedio. Registro del peso corporal (a) de <i>Neotomodon alstoni</i> antes (Ctl) , en las tres etapas de evaluación del protocolo de desincronización. A la derecha, el consumo relativo (gramos de alimento/g de peso corporal).	52

RESUMEN

Los ritmos de vida actuales han propiciado la aparición de alteraciones en los ritmos biológicos a nivel global, generando desórdenes conductuales y fisiológicos. Los cambios repentinos entre zonas horarias y la aparición de trabajos nocturnos o rotativos han propiciado la desincronización del medio interno con el externo, ocasionando el fenómeno desfase-horario conocido como Jet-lag. El ratón de los volcanes, *Neotomodon alstoni*, como modelo biológico, presenta perfiles de actividad locomotora con ritmos circadianos muy estables, en condiciones de movimiento libre y en oscuridad constante; lo que permite observar la influencia de un protocolo de desincronización en los perfiles de actividad. El objetivo de este estudio fue observar las variaciones y diferencias entre los perfiles de actividad diurna y nocturna bajo un protocolo de avances y retrasos a lo largo de dos meses. Se utilizaron 9 ratones en jaulas con sensores infrarrojos para el registro de actividad, dentro de una cámara de ambiente controlado, con iluminación programada según el protocolo de desincronización: dos horas de adelanto diarios por tres días, 2 horas de retraso diarios por tres días y un día en luz constante. Se encontraron diferencias en cuanto a la actividad locomotriz de los ratones, y una desincronización evidente hacia la quinta semana de exposición al protocolo, con un aumento de los registros durante la fase de reposo. Con esto se concluye que el fotoperiodo irregular sí tiene un efecto negativo sobre el perfil de actividad de *N. alstoni*, ligado a un estado de *Jet-lag* crónico, debido a la incapacidad de sincronización del medio interno con el medio externo. *N. alstoni* presenta individuos

que, bajo las mismas condiciones, pueden desarrollar condiciones de ~~obesidad, sobrepeso~~ mientras que otros individuos en las mismas condiciones permanecen delgados. La exposición ~~de animales delgados~~ a protocolos de desincronización circadiana en roedores que propicie el desarrollo de obesidad, o compararlo al comportamiento de ratones en un estado preexistente de obesidad, permitiría comprender mejor las alteraciones fisiológicas y conductuales asociadas arar los efectos de la desincronización hacia a las alteraciones del sistema circadiano individuos metabólicamente vulnerables en humanos.

Palabras clave: Desincronización circadiana, Ritmos Circadianos, *Neotomodon alstoni*, actividad locomotora.

SUMMARY

Current life rhythms have led to the appearance of alterations in biological rhythms at a global level, generating behavioral and physiological disorders. Sudden changes between time zones and the appearance of night or rotating jobs have led to the desynchronization of the internal environment with the external environment, causing the phenomenon known as Jet-lag. The volcano mouse, *Neotomodon alstoni*, as a biological model, shows locomotor activity profiles with very stable circadian rhythms in free movement and in constant dark condition; allowing to observe the influence of a desynchronization protocol in the activity profiles. The objective of this study was to observe the variations and differences between the daytime and nighttime activity profiles under a protocol of advances and delays over two months. Nine mice were used in cages with infrared sensors for the recording of

activity, within a controlled environment chamber, with lighting programmed according to the desynchronization protocol: two hours in advance per day for three days, 2 hours in delay per day for three days and a day in constant light. Differences were found in terms of the locomotor activity of the mice, and an evident desynchronization towards the fifth week of exposure to the protocol, with an increase in the records during the resting phase. With this, it is concluded that the irregular photoperiod does have a negative effect on the activity profile of *N. alstoni*, linked to a state of chronic Jet-lag, due to the inability to synchronize the internal environment with the external environment. *N. alstoni* presents individuals who, under the same conditions, can develop overweight conditions while other individuals in the same conditions remain thin. Exposure to circadian desynchronization protocols in rodents would allow a better understanding of the physiological and behavioral alterations associated with alterations of the circadian system in humans.

~~Current life rhythms have led to the appearance of alterations in biological rhythms at a global level, generating behavioral and physiological disorders. Sudden changes between time zones and the appearance of night or rotating jobs have led to the desynchronization of the internal environment with the external environment, causing the current phenomenon known as Jet lag. The "Mexican volcano mouse", *Neotomodon alstoni*, as a biological model, shows locomotor activity profiles with very stable circadian rhythms, in free movement conditions and in constant darkness; which allows observing the influence of a desynchronization protocol in~~

the activity profiles. The objective of this study was to observe the variations and differences between the daytime and nighttime activity profiles under a protocol of advances and delays over two months. Nine mice were used in cages with infrared sensors for activity recording, within a controlled environment chamber, with lighting programmed according to the desynchronization protocol: two hours in advance per day for three days, 2 hours in delay per day for three days and a day in constant light. Differences were found in terms of the locomotor activity of the mice, and an evident desynchronization towards the fifth week of exposure to the protocol, with an increase in the records during the resting phase. With this, it is concluded that the irregular photoperiod does have a negative effect on the activity profile of *M. alstoni*, linked to a state of chronic Jet lag, due to the inability to synchronize the internal environment with the external environment. *M. alstoni* presents individuals that, under the same conditions, can develop obesity conditions, while other individuals in the same conditions remain thin. Exposure of thin animals to desynchronization protocols that promote the development of obesity, or compare it to the behavior of mice in a pre-existing state of obesity, it would allow to compare the effects of desynchronization towards metabolically vulnerable individuals.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Introducción General

Desde la aparición de las primeras formas de vida en nuestro planeta, los movimientos de rotación y traslación del planeta han proporcionado al ambiente una ritmicidad en las condiciones de luz, ~~oscuridad~~ y temperatura. Además, la inclinación del eje terrestre dio paso a la presencia de estaciones y, consecuentemente, a distintas duraciones entre el día y la noche. La exposición a estos cambios constantes ha acompañado el desarrollo, aparición y extinción de la basta cantidad de organismos que han habitado este planeta, siendo observable hoy en día en fenómenos de migraciones, periodos de reproducción guiados por la estacionalidad, o los hábitos de actividad, alimentación y reposo de los organismos (Gillette y Tishckau, 1999). El estudio de los ritmos biológicos se establece como relativamente nuevo, pues no ha sido sino en los últimos 30 años que ha ganado importancia, sin embargo, los inicios de la cronobiología datan del siglo XVIII, con el astrónomo Jean Jacques d'Ortus de Mairan, quien obtuvo sus primeras observaciones a partir de los movimientos diarios de las hojas de Mimosa. Sus experimentos consistieron en privar a la planta de luz solar, y logró demostrar que las hojas oscilaban de igual forma, aun estando en condiciones de oscuridad constante, lo que dio indicios de un ciclo con ritmicidad endógena. Sin embargo, no fue hasta el siglo XX cuando se inicia formalmente la investigación cronobiológica

con científicos como Wilhelm Pfeffer, Erwin Bünning, Karl von Frisch, Jürgen Aschoff, Colin Pittendrigh, y Arthur Winfree, considerándoseles como los pioneros en esta nueva rama de la biología.

1.2. Los ritmos biológicos

Se define como ritmos biológicos a los fenómenos que ocurren dentro de un sistema orgánico/biológico con una ocurrencia en intervalos regulares (Mora y Sanguinetti, 1995). La adaptación hacia las condiciones temporales del medio ha propiciado una compleja regulación fisiológica que lleva a los organismos a una mayor supervivencia, y debe de tomarse en cuenta que los ritmos biológicos no son parte de una respuesta a las condiciones ambientales ni constituyen un fenómeno casual, pues estos ritmos se encuentran conservados en los distintos niveles de organización biológica, y permiten la existencia de un orden temporal interno para la optimización de los procesos metabólicos y energía destinada a los procesos fundamentales del organismo (Camargo, Vargas, 2014). El hecho de que estos ritmos sean internos significa que son generados por el propio organismo y existen en ausencia de las variables o estímulos externos, es aquí donde surge una de las principales características de dichos ritmos: en condiciones de luz u oscuridad y temperaturas constantes, es observable la frecuencia propia del ciclo (en curso libre). De acuerdo a la frecuencia de los ritmos en relación a un día, se clasifican en tres categorías:

Ritmos Ultradianos: ritmos con una duración menor a 20 h, como los estados del sueño, frecuencia cardíaca y respiratorias, y la actividad del cerebro a través de un encefalograma. Es decir, ritmos que ocurren varias veces en un día.

Ritmos Circadianos: con una duración aproximada a las 24 h (entre 22 y 26 h). Un ejemplo de estos ritmos son el ciclo sueño-vigilia, la temperatura corporal y las fases de actividad locomotora e ingesta, o sea, ritmos con duración de un día.

Ritmos Infradianos: estos presentan una duración mayor a las 28 h, y un ciclo puede durar desde varios días, hasta meses. Ejemplos son los periodos de hibernación, fenómenos migratorios y el ciclo menstrual. Estos son ritmos que precisan de varios días para completar un ciclo.

La cronobiología ha asignado los siguientes parámetros para definir un ritmo biológico, con base en una función sinusoidal (Vitaterna, Takahashi, Turek, 2001):

- **Periodo:** Que es el intervalo de tiempo que le toma repetirse a la variable en cuestión.
- **Valor medio o mesor:** Valor alrededor del cual oscila la variable en un ajuste matemático ~~sinusoidal~~ cosenoidal.
- **Amplitud:** Este valor es obtenido a partir de la diferencia entre el valor máximo ~~ye~~ el mínimo de la variable o en algunos casos desde ~~entre~~ el valor medio.
- **Fase:** esta se define como el punto de referencia en una escala de tiempo establecida, que permite indicar el inicio entre una oscilación y la anterior.

Normalmente, se determina *acrofase* al momento en que la variable alcanza el valor máximo.

- Cambio de fase: parámetro que permite visualizar el corrimiento temporal de fase en respuesta a un estímulo externo.

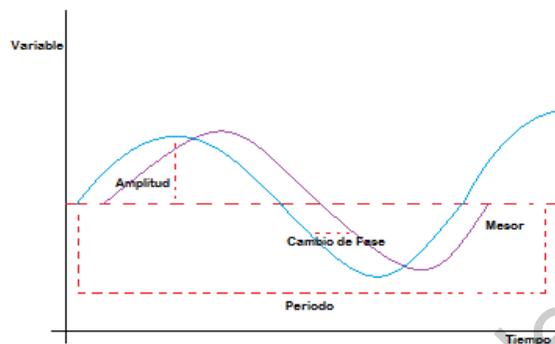


Figura 1. Esquematización de los Parámetros del Ciclo Circadiano

1.3. Los Ciclos Circadianos

Para la cronobiología, el estudio de los ciclos circadianos, ha tomado mayor importancia al presentar implicaciones en los procesos metabólicos, funciones fisiológicas, etológicas, reproductivas y, más recientemente, en fenómenos patológicos en mamíferos (Camargo, Vargas, 2014).

Estos ciclos han sido estudiados en diversos taxas, como en bacterias fotosintéticas, hongos de los géneros *Chlamydomonas* y *Neurospora* (Salichos y Rokas 2010), además de plantas, en las cuales se manifiestan regulando la apertura y cierre de

estomas, por ejemplo, la apertura de las flores durante el día y el cierre de las mismas al caer la noche; también, en plantas crasuláceas la fotosíntesis se realiza durante el día, y la fijación de CO₂ durante la noche, y la expresión de genes, a través de la producción de metabolitos implicados en rutas metabólicas complejas (Tanikagi *et al*, 2019); y en animales (unicelulares y multicelulares, vertebrados e invertebrados), dando pauta a una gran diversidad de especies de hábitos diurnos, nocturnos y crepusculares.

Además de ser de carácter endógeno y de presentar un libre curso en condiciones constantes, los ciclos circadianos cuentan con dos características adicionales de igual importancia:

El ciclo día-noche, o luz-oscuridad, ejerce una mayor influencia sobre los organismos como sincronizador (también llamado *zeitgeber*). Otros factores también pueden intervenir como moduladores del ciclo, tales como la intensidad de la actividad o ejercicio, interacciones sociales (Eban, Bloch, 2012) e incluso el horario de alimentación y los ciclos de la temperatura. Este último factor (temperatura), ha ganado mayor importancia al ser capaz de alterar las fases del ciclo sin modificar la velocidad del mismo (Vitaterna, *et al*, 2001). Es aquí donde entra la tercera característica de los ciclos circadianos: el periodo del ritmo circadiano compensa la temperatura, proceso que se refiere a la capacidad que tiene el reloj interno de funcionar sin cambios importantes en su periodo ante temperaturas estables y fisiológicamente permisivas en el organismo (Buhr y Takahashi, 2013); la compensación corrige la propensión natural en que la tasa de

las reacciones bioquímicas en el organismo aumente o disminuya de forma proporcional a la temperatura, otorgando así al sistema de la flexibilidad necesaria para que la duración del ciclo circadiano se mantenga a pesar de las condiciones ambientales (Vitaterna, *et al*, 2001; Eban y Bloch, 2012). Para que la compensación se considere efectiva, la tasa a la que aumentan los procesos bioquímicos en el organismo, con un aumento de 10 °C, debe permanecer igual, o lo más cercana a 1. Es decir $Q_{10} \sim 1$.

1.4. Reloj Maestro

Para que el sistema circadiano funcione de forma adecuada, debe de existir una coordinación entre los ritmos de las actividades celulares y tisulares; de otra forma, las funciones dentro del organismo estarían desacopladas y el gasto energético para mantenerlas sería insostenible. Existe un orden o jerarquía entre los distintos ritmos y existe un reloj maestro o marcapasos circadiano, el cual recibe las señales externas, se ajusta a ellas y regula los ritmos resultantes de forma directa o a través de la sincronización de osciladores periféricos. Los osciladores periféricos, a diferencia del marcapasos, pueden no presentar todas las características de éste (Saini, *et al*, 2019). Los osciladores circadianos se mantienen mediante una maquinaria molecular con base en los ritmos de retroalimentación de la expresión de distintos genes reloj y sus proteínas, con un ciclo aproximado a las 24 horas, conocida como la maquinaria molecular del reloj circadiano.

Estos procesos se han estudiado con una mayor profundidad en organismos unicelulares como cianobacterias y dinoflagelados, en insectos como la mosca de

la fruta, (*Drosophila sp*), y en mamíferos a través de modelos biológicos basados principalmente en roedores como ratas y ratones (Saini, *et al*, 2019).

En mamíferos, el reloj maestro, o marcapasos circadiano, se encuentra en células específicas en el hipotálamo, específicamente, en la región del Núcleo Supraquiasmático (NSQ) (Vitaterna *et al*, 2001).

1.5. El Núcleo Supraquiasmático

El NSQ se localiza en la región antero ventral del hipotálamo, al costado del tercer ventrículo, justo sobre el quiasma óptico (Welsh, *et al*, 2010). Se sabe que, en ratones, posee cerca de 10,000 neuronas, en dos subdivisiones anatómicas: la región de un núcleo ventral, que recibe y procesa los estímulos retíales, y la región de una envoltura dorsal, la cual cubre parcialmente y recibe información desde el núcleo (Abrahamson, y Moore, 2001). El tercer ventrículo divide al núcleo en dos regiones: dorsomedial, la cual es la principal zona de eferencias (salidas) del NSQ, y ventrolateral, zona de aferencia (entradas) del tracto retino-hipotalámico (TRH) (Guadarrama *et al*, 2014).

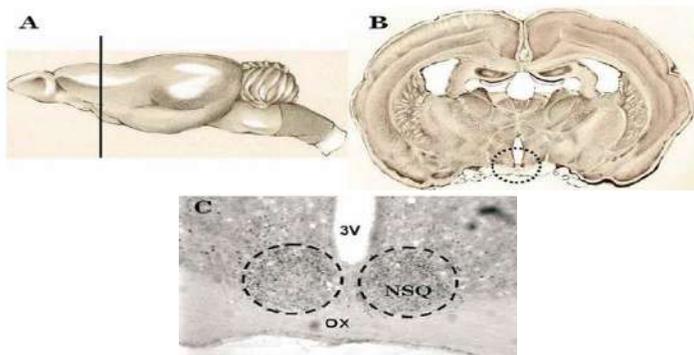


Figura 2. El Núcleo Supraquiasmático

Representación de un corte coronal del cerebro en ratas, señalándose en (A) el sitio de corte, y en B la región donde se localiza el NSQ. (C) Fotomicrografía del NSQ con marcaje de células inmunoreactivas para C-Fos, y su relación con el quiasma óptico (OX). (Guadarrama et al., 2014).

La aferencia del TRH se origina en las células ganglionares de la retina, se sabe que las vías de este tracto funcionan de manera independiente a las vías de la percepción visual (Guadarrama *et al*, 2014). Los fotorreceptores de la retina que poseen melanopsina se caracterizan por poseer una alta sensibilidad a la luz, pues es a partir de estas células que la luz ambiental es detectada, y a partir de la cual el reloj endógeno es sincronizado principalmente (Aguilar *et al*, 2004).

La principal eferencia del NSQ es la vía multisináptica hacia la glándula pineal, que controla la secreción de la melatonina (Guadarrama *et al*, 2014), la proyección hacia el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN), que a su vez proyecta sus axones neuronales hacia el Nervus Coronarii, cuyos axones se fusionan con la glándula pineal a través del polo distal superior de esta. En el NSQ se han encontrado

diferentes subtipos neuronales peptidérgicos, que sintetizan y liberan vasopresina, péptido vasoactivo intestinal y péptido liberador de gastrina. Además, GABA (ácido gamma-aminobutírico) y glutamato son los principales neurotransmisores encontrados en las terminaciones sinápticas emitidas en las neuronas del NSQ. A través de este circuito es que el NSQ controla la principal ruta de regulación de la melatonina (Fig 3) (Guadarrama *et al*, 2014; Aguilar *et al*, 2004).

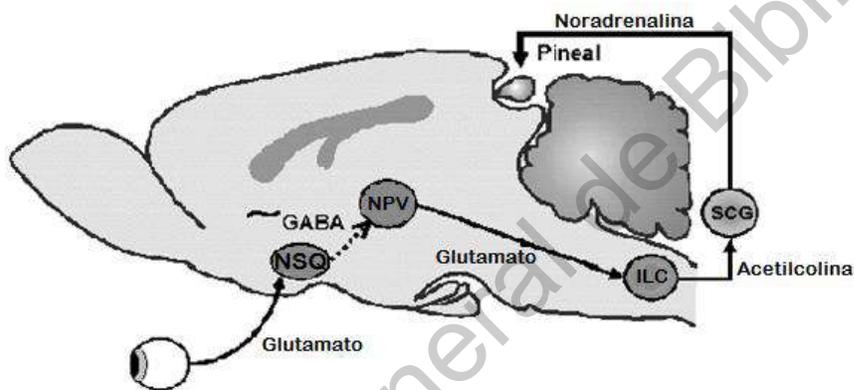


Figura 3. Vía multisináptica del NSQ hacia la glándula pineal.

Representación esquemática de la vía multisináptica de subyacente del control fótico y circadiano de la síntesis de melatonina en la glándula pineal. El glutamato secretado por el tracto retino hipotalámico estimula las neuronas gabaérgicas del NSQ, que a su vez inhiben los estímulos para la secreción de melatonina del NPV. ILC: Columnas intermediolaterales de la médula espinal. SCG: Ganglio Cervical superior (Modificada de Ganguly *et al.*, 2002).

Comentado [M1]: Usa el mismo formato en los pies de figura, de preferencia no uses fuente itálica

1.6. El Reloj Circadiano Molecular

Las bases del marcapasos y los osciladores periféricos circadianos se encuentran en la expresión cíclica de genes conocidos como “genes del reloj circadiano”. En la actualidad se ha identificado cerca de 10 genes que participan en la regulación circadiana, formando 2 circuitos principales (Vitaterna, *et al*, 2001; Buhr y Takahashi, 2013):

El primer circuito, de retroalimentación positiva, se produce a partir de la expresión de los genes *Clock* y *Bmal1*, cuyas proteínas *CLOCK* y *BMAL1*, forman en el citoplasma un heterodímero que regresa al interior del núcleo (transloca) e interactúan con los sitios de regulación de la expresión de genes (E-BOX) del ADN (5'-CACGTT-3') y promueven la transcripción de los genes blanco: *Per* 1, 2 y 3, y *Cry* 1 y 2. Posteriormente en el citoplasma, las proteínas *PER* y *CRY* son capaces de formar heterodímeros, que son fosforilados por una Caseín-Cinasa-1 ϵ (*CKI ϵ*) para ingresar al núcleo e inhibir la transcripción de *Clock* y *Bmal1*. La degradación de *PER* y *CRY* ocurre gradualmente a lo largo de las 24 horas, comenzando aproximadamente a partir de la segunda mitad del día, lo cual es uno de los puntos clave para reiniciar el circuito.

Siendo descrito como un segundo circuito de retroalimentación negativa, el heterodímero de *CLOCK/BMAL1* también inicia la transcripción de los genes *Rev-erb* α/β y *ROR* α/β , a través de la transcripción de un gen receptor huérfano nuclear *Rev-erb*. Una vez en el núcleo, *REV-ERB* se une al promotor de *BMAL1* y reprime

su transcripción. A la vez, PER y CRY también inhiben la transcripción de *Rev-erb*, permitiendo la transcripción de *Bmal1* una vez más. $ROR\alpha$, en ausencia de REV-ERB, promueve la expresión de *Bmal1* y activa su transcripción.

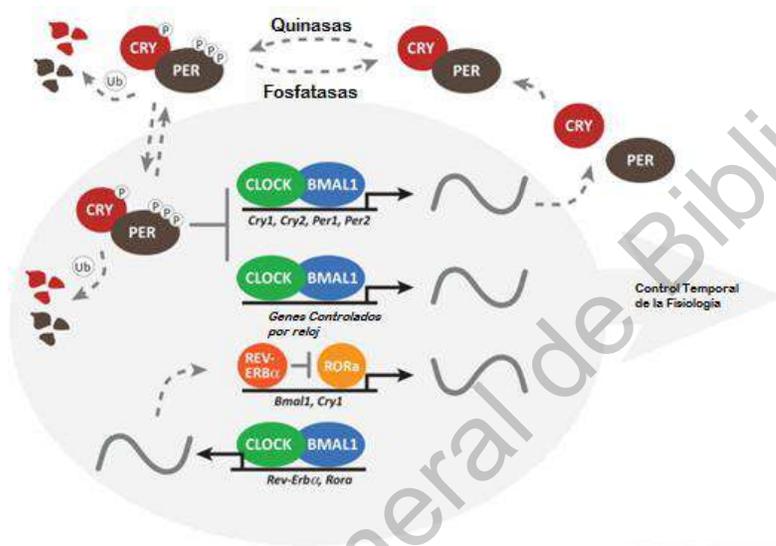


Figura 4. Principales Componentes del Reloj Molecular.

Representación esquemática del control temporal de la fisiología a través del reloj molecular en mamíferos y sus dos principales ciclos de retroalimentación. Las proteínas CLOCK y BMAL1 inician el ciclo de retroalimentación positiva. El heterodímero CLOCK y BMAL1 interviene también en el ciclo de retroalimentación negativa al promover la expresión de los genes *Rev-erb α/β* y *RORα/β*. (Modificado de Partch et al., 2014).

1.7. Los efectos de la Luz como sincronizador

Aunque el reloj es endógeno y capaz de autorregularse, en condiciones naturales no manifiesta oscilaciones espontáneas, pues es necesario que éste se sincronice o ajuste según las condiciones de un ambiente geofísico, manteniendo así una estrecha relación con el mismo. La luz en forma de ciclos de luz-oscuridad, cuya fase oscura se denomina *escotofase* y la fase nocturna *fotofase*, es el agente sincronizador que más se ha caracterizado y uno de los más potentes y confiables *zeitgebers* (Salazar *et al*, 2006).

En el momento en que la señal lumínica es percibida por las células ganglionares de la retina (utilizando la melanopsina como fotopigmento), la señal se transduce y es guiada hacia el NSQ a través del RHT en forma de actividad eléctrica (Guadarrama *et al*, 2014). Al final de la vía de los axones, la actividad eléctrica inducida por la luz promueve la liberación de glutamato que estimula los receptores ionotrópicos NMDA en las neuronas del NSQ, induciendo la sincronización fótica del reloj a través de la entrada de calcio (Guadarrama *et al*, 2014; Salazar *et al*, 2006). La intervención de quinasas, fosfatasas y proteasas permite establecer las cascadas de señalización que darán lugar a la sincronización. Estas cascadas son detonadas a través de receptores de membrana que terminarán en la expresión de los genes de reloj, particularmente de los genes *Per 1* y *2* (Dunlap, 1999). A través de los estímulos lumínicos, el ritmo endógeno es capaz de alterarse de forma "fase-dependiente": los efectos son observados en momentos determinados del día establecido.

1.8 Sincronizadores no fóticos

A pesar de que se tiene a las señales lumínicas como el sincronizador más importante, existe también una serie de señales capaces de sincronizar los ritmos circadianos como el acceso al alimento, todas aquellas señales del ambiente que sincronizan un reloj circadiano y que que no corresponden a estímulos luminosos son considerados sincronizadores no-fóticos, entre los cuales destacan el acceso al alimento, la temperatura ambiental e interacciones sociales.

1.8.1. Alimentación/Ingesta

La disponibilidad del alimento en horarios restringidos se caracteriza por un incremento en la actividad del organismo en un periodo de tiempo anticipado a la disposición del alimento (Carneiro y Araujo, 2012; Wams *et al*, 2017). En roedores nocturnos con un NSQ intacto se ha observado que, en anticipación al alimento, la actividad locomotora aumenta incluso si la disponibilidad del alimento es durante la fase diurna. Este comportamiento fue reportado por Curt Paul Richter en 1992 (citado en Carneiro y Araujo, 2012), y que de igual modo, en ratones con lesiones en el NSQ, el acceso restringido de forma periódica al consumo de agua y alimento modificó el ritmo circadiano de corticoides en sangre y temperatura corporal de los animales.

Los osciladores dirigidos por alimento (food entrained oscillators, FEO, por sus siglas en inglés), son capaces de dirigir la producción de hormonas cuyo efecto se ve reflejado a través de la actividad anticipatoria al alimento, principalmente. Dichos factores hormonales modificados por el periodo de ingesta han sido identificados:

corticosterona, insulina, grelina, leptina, ácidos grasos, glucagón, glucocorticoides y hormonas tiroideas, entre otros (Silver y Balsam, 2010).

1.8.2. Temperatura

La temperatura puede ser un sincronizador muy fuerte bajo condiciones ambientales donde la exposición a la luz sea poca o muy débil (Refinetti, 2015). En este caso, la influencia de la temperatura en los ritmos circadianos es tal que los cambios en la misma pueden afectar la fase del ciclo sin alterar sustancialmente la velocidad de éste; de modo que el ciclo podría iniciar antes o después sin alterarse la longitud (Vitaterna, *et al*, 2001). Se ha documentado que la temperatura como sincronizador tiene un mayor efecto en especies ectotermas que homeotermas, como los mamíferos, y que en estos últimos, su efecto es mayor en condiciones constantes que en ciclos de Luz-Oscuridad (Wams *et al*, 2017; Refinetti, 2015).

1.8.3. Actividad/Excitación Conductual Inducida

Este es uno de los estímulos no fóticos más estudiados. La actividad locomotora generalmente es inducida a través de la exposición de los animales a ruedas para correr, movimiento o agitación de las jaulas como tal, o la administración de soluciones salinas o farmacológicas. En animales en oscuridad constante, estos estímulos producen un cambio de fase durante el día subjetivo (Caldelas *et al*, 2005). En el caso inyección con solución salina, se ha observado en hámsteres un tamaño considerable en el cambio de fase y en la sensibilidad del mismo, con una

efectividad máxima en el día subjetivo al tiempo circadiano CT 08 y CT 10 (Caldelas *et al*, 2005).

A nivel molecular, se cree que los estímulos que incrementan la actividad o excitación conductual tienen un efecto opuesto sobre la maquinaria molecular, es decir; el reajuste de fase del reloj circadiano del hámster durante el día subjetivo, parece estar mediado por el neuropéptido Y y la actividad locomotora, ambos, parecen inhibir la expresión del ARN mensajero de *Per1* y *Per2* en el NSQ (Yannielli, *et al*, 2002).

1.9. Patrones de Actividad

Puesto que desde su aparición en la escala evolutiva la mayoría de los mamíferos han sido de carácter nocturno, se cree que los sistemas circadianos de especies nocturnas se encuentran mejor preservados que en las especies diurnas o crepusculares, que presentan mayor variabilidad en sus ciclos; también se ha observado que algunas especies presentan hábitos alternados, como lo es con *A. russatus*, ratón dorado africano, cuyo patrón de actividad incluye hábitos diurnos y nocturnos, y se cree que se debe a la competencia interespecífica y a una optimización de los recursos del ambiente. Además, la información de la que se dispone acerca del comportamiento de las especies en el campo es muy escasa, definiéndose más como observaciones casuales que experimentales, en las que

podría existir un enmascaramiento en los ritmos de actividad observada (Kronfeld y Tamar, 2008).

1.9.1. Patrones de Actividad en el Laboratorio

En condiciones experimentales, la mosca *D. melanogaster* y algunas especies y cepas de roedores han sido los modelos biológicos más utilizados para estudios de sincronización debido a su fácil manejo *in vivo*, que permiten observar los distintos fenotipos circadianos entre especies silvestres y cepas mutantes (Cascallares *et al*, 2018; Paladino *et al*, 2013).

Para registrar los patrones de actividad, es necesario que los organismos sean mantenidos en condiciones constantes, aislados de las señales externas, ya sea en cámaras de ambiente controlado o en constante oscuridad para observar los ritmos en curso libre, que generalmente son menores a 24 horas; o en condiciones de luz-oscuridad artificiales que emulen el ambiente o la situación experimental.

Para observar la respuesta de los relojes endógenos ~~a través de la actividad locomotora~~ de los organismos, en ratones, y roedores en general, una respuesta conductual de valor crítico es la actividad locomotora, la cual es ~~entonces~~ registrada a través de dispositivos de conteo que reconocen los movimientos del organismo por periodos de tiempo establecidos en intervalos (cada 3, 5 y 10 minutos, por ejemplo). La actividad registrada es, y representada ~~as después dentro de en~~ una actograma, donde cada línea es un día de registro y las barras verticales representan la actividad acumulada durante cada intervalo. Generalmente, dentro del mismo actograma se alinean dos días de forma consecutiva, siendo el segundo

graficado de nueva cuenta en la línea siguiente para facilitar la comprensión del mismo. Al identificar los patrones de actividad del mismo, se pueden discernir entonces las fases de actividad (alfa) y de reposo (rho). El tiempo de diferencia entre el ritmo externo y la sincronización del ritmo interno, que se reflejaría en la actividad locomotora, es definida como *ángulo de fase* (Ψ). Una sincronización correcta es caracterizada por una diferencia de ángulos de fase estables entre dos ritmos sincronizados (Jud *et al*, 2005).

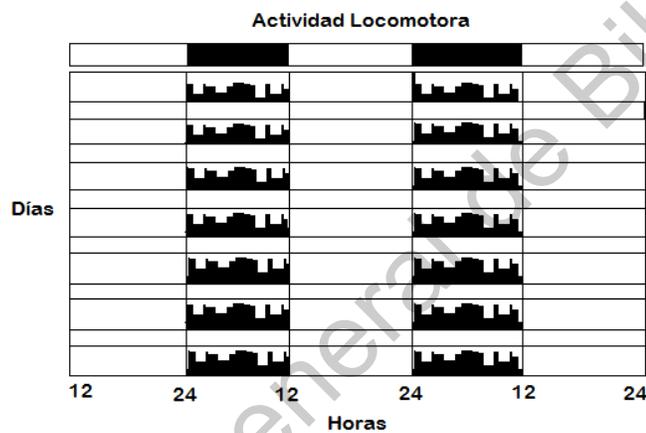


Figura 5. Actograma.

Representación esquemática de un actograma de actividad locomotora de un animal nocturno en periodos de 12 horas de Luz y 12 Horas de Oscuridad. Las barras verticales representan la actividad acumulada por cada intervalo. La barra blanca y negra arriba indica la fase de luz y oscuridad respectivamente.

1.10. Desincronización Circadiana

Al existir una comunicación exitosa entre el reloj central, osciladores y señales ambientales, el organismo en general es capaz de funcionar correctamente y dar como resultado adaptaciones temporales, sociales y reproductivas (Kronfeld y Tamar, 2008). La presencia de cualquier falla o problema en el sistema circadiano puede dar paso a la existencia de una gran variedad de alteraciones en las funciones del organismo, fisiológicas y psicológicas. De igual modo, no se descarta que afecciones metabólicas puedan ser las causas de la desincronización del sistema (Casiraghi *et al*, 2016).

Las alteraciones en la sincronización circadiana, generalmente, deben de presentar 1) inhabilidad parcial o completa de procesar los ciclos de luz y oscuridad (como en los casos de ceguera y/o senescencia), 2) o conflictos entre la fase circadiana y la fase de LO; ya sea por alteraciones endógenas (genéticas) o exógenas (migraciones, cambios estacionales, etc) (Golombek, *et al*, 2013).

En la actualidad, el ser humano, que es principalmente diurno, ha desarrollado un ritmo de vida que propicia la aparición de alteraciones en los ritmos biológicos, causando un desfase temporal que podría generar alteraciones a la salud y a la conducta. Un ejemplo recurrente es el cambio brusco en zonas horarias, que provocan un fenómeno conocido como *jet-lag*, caracterizado por un conflicto entre el tiempo interno y el externo, es decir, un conflicto entre los ritmos biológicos y el nuevo ciclo de luz y oscuridad; los ciclos internos necesitan acoplarse dependiendo

de cada sistema, es decir, los ritmos de actividad locomotora no se sincronizarán con la misma eficiencia que los ritmos de temperatura o melatonina.

Otra de las situaciones más recurrentes de alteración de los ciclos es observada en empleos con turnos rotatorios o de horario nocturno de forma fija. En esta situación el reloj biológico y el externo entran en conflicto en cuanto al ciclo diurno y la fase activa y de ingesta del trabajador. La desincronización interna deriva en una reducción de las horas de sueño debido a la alteración al ciclo biológico interno. Similar al *jet-lag*, desencadenan padecimientos gastrointestinales y cardiovasculares como lo son la obesidad y diabetes, un deterioro en las facultades mentales tales como memoria, irritabilidad, estrés, depresión y ansiedad (Paladino *et al*, 2013).

Los modelos animales mantenidos en protocolos que emulan las condiciones de *jet lag*, luz constante e incluso horarios de actividad forzada en fases inversas (que podría extrapolarse a las condiciones de rotación de turnos en humanos) son empleados para estudiar el papel de la desincronización circadiana en el desarrollo de distintos padecimientos.

1.11. *Neotomodon alstoni*: El ratón de los volcanes

Neotomodon alstoni es una especie de roedor múrido perteneciente a la subfamilia Neotominae, endémica a la faja neovolcánica transversal de la zona central de México, de donde deriva su nombre común. Su hábitat se conforma principalmente

por bosques de pino y zonas de pastizal dentro de los mismos, con altitudes de 2600 m a 4600 m, con registros en los estados de Morelos, Veracruz y el Estado de México, además de registros recientes en el estado de Hidalgo (García-Becerra *et al.*, 2012). *N. alstoni* se encuentra en la categoría de riesgo menor según la UICN, y con poblaciones estables a la fecha (Álvarez, Castro, 2016). Sus hábitos alimenticios parecen no variar de semillas e insectos independientemente de la estación del año. Los individuos adultos alcanzan una longitud nasoanal de 100 a 130 mm, y la cola de 80 a 105 mm, y con un peso de 40 a 50 g. Presentan un pelaje denso y de color grisáceo en la región dorsal, mientras que en la región ventral es blanco, y orejas casi lampiñas (Ayala Guerrero, *et al.*, 1998). Además, *N. alstoni* se desarrolla y reproduce de forma favorable al ser mantenido en cautiverio, alcanzando un rango de vida de hasta 5 años.

Como otros modelos de roedores, *N. alstoni* presenta una estructura locomotora con un ritmo circadiano estable en condiciones de movimiento libre en jaula o con rueda de actividad, en condiciones de oscuridad constante. Además, presenta un ritmo circadiano de actividad locomotriz muy preciso (23.5h a 23.9 h), variando apenas por minutos (Miranda *et al.*, 2016), y se ha observado, mediante el uso de pulsos de luz, que posee una mayor fotosensibilidad para desarrollar retrasos de fase durante la noche subjetiva temprana que en la noche subjetiva tardía. Al sincronizar con nuevos fotoperiodos, se reporta que el inicio y el final de la fase activa se llevan a cabo a velocidades distintas (Miranda *et al.*, 2019)



Figura 6. *Neotomodon alstoni*. (Foto tomada de internet).

Al ser mantenidos en cautiverio (4-7 meses) o criados en vivarios, y alimentados *ad libitum* con una dieta estándar para roedores, algunos individuos de esta especie son capaces de desarrollar obesidad mientras otros individuos pueden permanecer delgados, lo que implica factores genéticos para la obesidad aún no definidos, lo que podría verse como una ventaja, pues en otras especies es necesaria la administración de dietas hipercalóricas o manipulación genética.

[El estudio de los efectos de la desincronización circadiana en mamíferos se ha basado en el efecto de distintos protocolos de iluminación sobre distintos modelos de roedores \(revisado en .. ver artículo de Golombek\). El ratón de los volcanes *N. alstoni* presenta susceptibilidad a desarrollar problemas de obesidad en condiciones](#)

de cautiverio sin requerir dietas hipercalóricas. Los ratones obesos presentan cambios significativos en los patrones de actividad respecto a los animales delgados y en su capacidad de seguir fotoperiodos distintos a 24 horas (Miranda-Anaya et al, 2019). Los organismos que no desarrollan espontáneamente la obesidad, son candidatos para tratar de entender si una alteración en el fotoperiodo induce cambios en su conducta motora que a mediano plazo, que permita vincular lo que se ha observado en los animales obesos.

2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1. Objetivo General

Determinar si la exposición a un protocolo de iluminación irregular, con base en avances y retrasos tiene impacto sobre el ritmo circadiano de actividad locomotora en *Neotomodon alstoni*.

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar las diferencias entre los ratones no expuestos a un fotoperiodo irregular y aquellos expuestos a un protocolo de desincronización circadiana en:
 - A) actividad total, diurna y nocturna.
 - B) actividad durante avances y retrasos.

C) peso e ingesta antes y después de la desincronización.

- Comparar la variación de los parámetros anteriores en función al tiempo de desincronización a lo largo de dos meses.

2.3. Hipótesis

Los patrones de actividad y reposo del ritmo circadiano de actividad locomotora en *Neotomodon alstoni* se verán afectados de forma negativa en estructura y distribución de actividad por la exposición crónica a un fotoperiodo irregular asociado a una desincronización circadiana.

3.1. Animales

Se utilizaron 16 ratones *N alstoni*, machos adultos de 8-16 meses de edad, de *N alstoni*, que nacieron y fueron criados en condiciones de laboratorio, en las instalaciones del bioterio de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de México y que posteriormente fueron transportados y aclimatados a las condiciones de l laboratorio de cronobiología en la UMDI juriquilla. Se utilizaron 8 ratones como control y 8 como grupo experimental. Los ratones se aclimataron en un periodo de luz y oscuridad constante (12:12), con temperatura constante (24 ± 1 °C) y humedad relativa (50%), en jaulas individuales con lechos de viruta de madera. El aseo de las jaulas se hizo de forma semanal, durante la fase diurna del sistema. Fueron alimentados con dieta regular para roedores (Purina 5000) y agua *ad libitum*.

3.2. Peso e Ingesta

En el caso del peso corporal e ingesta, el grupo experimental fue su propio control, realizándose la toma de datos antes y después del fotoperiodo de desincronización. Los ratones fueron pesados al término de la primera semana de desincronización y al término de la última semana del protocolo. La manipulación se realizó durante la fase diurna, y se llevó a cabo al transportar los ratones de las jaulas de acrílico a la vascula contenidos en recipientes plásticos pesados previamente y restados al peso final.

Para la medición de la ingesta se retiraron los pellets de alimento en las charolas y en su lugar se colocaron hileras pellets ensartados con alambre, a manera de brochetas fabricadas con los mismos, de modo que fuera fácil el manejo para poner y quitar de la jaula, y poder pesar la diferencia consumida. Los ratones tuvieron acceso consumían desólo a las brochetas, las cuales se colocaron durante por 24 horas que y fueron pesadas antes de ser introducidas en las jaulas y después de ser retiradas. La ingesta se calculó a partir del promedio entre las diferencias de los pesos iniciales y finales de las brochetas, posteriormente dividido entre el peso del ratón al momento de la muestra.

3.3. Actividad Locomotriz

El registro de actividad locomotriz se realizó a través de un sistema de cruce de sensores infrarrojos, en juegos de tres sensores por caja individual, que permitió registrar el movimiento de los ratones entre los sensores. El sistema de sensores se acopló a un software de recolección y archivo de datos, los cuales eran sumados

y registrados cada 10 minutos. El sistema de sensores infrarrojos, fue desarrollado por la Universidad Tecnológica de Querétaro (UTEQ). El sistema de registro permitió el monitoreo actividad de las 9 jaulas diferentes, que se distribuyeron dentro de una cámara de ambiente controlado (CONVIRON, Adaptis 1000).

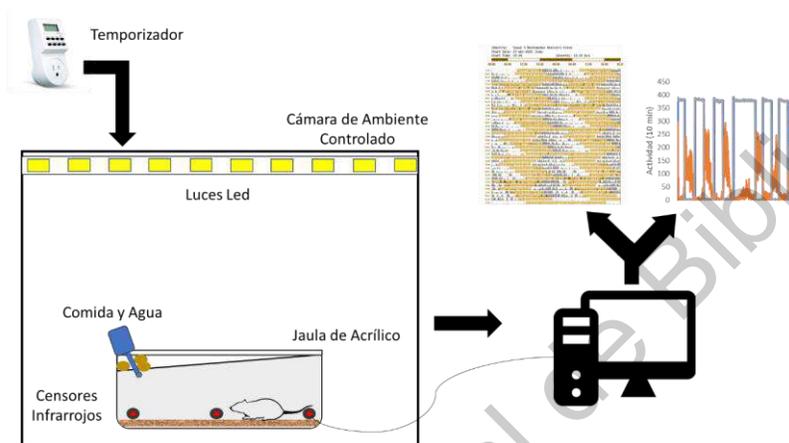


Figura 7. Sistema de Registro.

Diagrama de los elementos que conformaron el hábitat de los ratones y el sistema de registro de actividad.

3.4. Protocolo de desincronización

Los ratones se separaron en grupo control (n=7) y en el grupo experimental (n=9). El grupo control se mantuvo en protocolo de LO 12:12, por siete días, con una intensidad lumínica aproximada de 300-350 lx, a través del uso de tiras de luz LED blanca, cuyo encendido y apagado fue controlado por un temporizador doméstico programado con dicho fotoperiodo (12:12).

Los ratones del grupo experimental fueron aclimatados también por un periodo de LO 12:12 por siete días, posteriormente, los ratones fueron expuestos a un fotoperiodo con tres días de retraso (Lun, Mar, Mi), a los cuales el ciclo LO 12:12 se recorrió 2 horas por día; un día de luz constante (Jueves); y tres días de avance (Vi, Sá, Do), donde el ciclo 12:12 retrocedió 2 horas por día (tabla 1) (fig 8).

Tabla 1. Cronograma de desincronización utilizado para *N. alstoni*.

Día	Inicio Fase Luminosa	Inicio Fase Oscura
<i>Lunes</i>	6	18
<i>Martes</i>	8	20
<i>Miércoles</i>	10	22
<i>Jueves</i>	12	00
<i>Viernes</i>	6	18
<i>Sábado</i>	4	16
<i>Domingo</i>	2	14

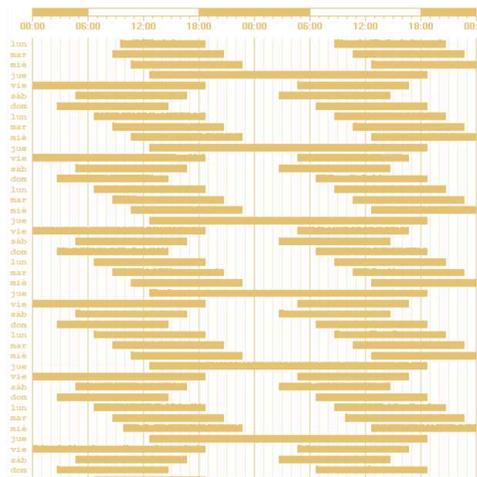


Figura 8. Protocolo de Iluminación.

Representación gráfica del protocolo de iluminación, siendo las barras negras los periodos de la fase de luz.

3.5. Análisis de Datos

Los registros de actividad locomotora se analizaron a partir de los datos organizados en Excel (Microsoft Office) para evaluar la magnitud de la actividad separada en condiciones específicas del protocolo: actividad total diaria, actividad total en fase diurna o nocturna, luego por segmentos de protocolo en que solo se inducía a avances o retrasos de fase. Los datos fueron además graficados en forma de forma gráfica mediante actogramas a partir de los cuales se evaluaron los periodos y cambios de fase de forma individual, utilizando el Software ActView®. Para las pruebas estadísticas de comparación de medias se realizaron Análisis de Varianza de una vía, seguidas por pruebas de contraste de Tuckey mediante el Software PRISM®. Con el fin de observar un cambio en el progreso de la exposición a mitad

del protocolo. sSe analizaron los datos de las Ssemanas 1, 3 y 5 de registro de los ratones en condiciones experimentales.

Actogramas

La figura 9 muestra tres actogramas representativos del progreso del ritmo circadiano de actividad locomotriz en ratones expuestos al fotoperiodo experimental. Las barras amarillas en cada actograma indican la fase de luz en cada ciclo. La actividad locomotriz se muestra en forma de histograma, en barras de promedios de actividad en 10 minutos. Se notan respuestas contrastantes entre los tres actogramas, principalmente en el tiempo que permanecen activos tanto de día como de noche. El inicio de actividad en el actograma (a) sigue el apagado de la luz a lo largo de las cinco semanas mientras que el de la derecha mantiene la actividad en la fotofase (c) y una repuesta intermedia en (b).

Comentado [M2]: Hay que arreglar la secuencia de las figuras. En esta te puse un par más de actograms que te deben permitir platicar sobre la variabilidad de los datos. Qué mas puedes platicar de lo que se muestra en esta figura?

Actividad Total:

Al comparar las medias de actividad total de los ratones con respecto al grupo control, no se detectó una diferencia significativa entre los segmentos de muestreo de actividad locomotora analizados ($p>0.05$) (fig. 10, tabla 2). Sin embargo, existe una tendencia en los animales expuestos al protocolo de desincronización a reducir la actividad la primer semana de exposición, que gradualmente alcanza para la quinta semana la magnitud semejante a la de la control.

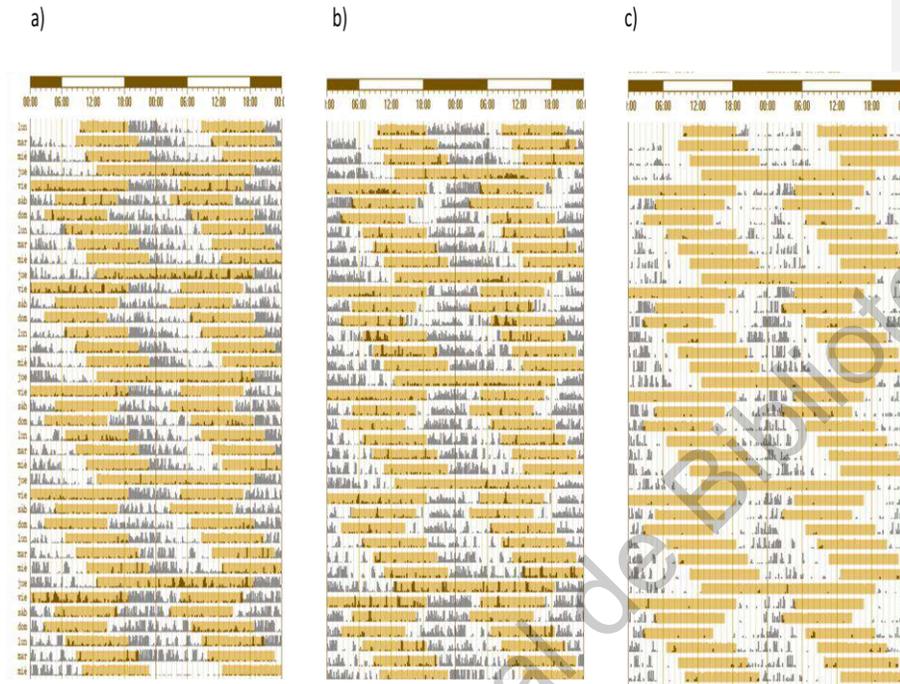


Figura 9. Actogramas de tres ratones en protocolo de desincronización.

En amarillo la fase de luz de cada ciclo. En negro el perfil de actividad diario en forma de histograma. Cada barra representa el promedio de actividad en 10 min.

Actividad Total:

Figura 10. Actividad Total del grupo control y experimental entre grupo control (CTL) y tiempo de exposición a desincronización circadiana en las semanas 1, 3 y 5 (DCS).

Con formato: Izquierda

Tabla 2. Prueba de Comparaciones Múltiples de Tuckey, entre el grupo control contra el grupo experimental, y entre las 3 semanas de desincronización.

Number of families	1				
Number of comparisons per family	6				
Alpha	0.05				
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
total CTL vs. DCS1	105.1-125.7 to 335.9	No	ns	0.6054A-B	
total CTL vs. DCS3	44.88-185.9 to 275.7	No	ns	0.9508A-C	
total CTL vs. DCS5	18.73-212.1 to 249.6	No	ns	0.9961A-D	
DCS1 vs. DCS3	-60.22-255.3 to 134.9	No	ns	0.8336B-C	
DCS1 vs. DCS5	-86.37-281.5 to 108.7	No	ns	0.6265B-D	
DCS3 vs. DCS5	-26.15-221.2 to 168.9	No	ns	0.9829C-D	

Al comparar las medias de actividad diurna, se observó que no existen diferencias significativas entre los grupos control y experimental en general, sin embargo, al comparar dentro del mismo grupo experimental, los ratones durante la semana 1 y la semana 5 de desincronización sí presentan diferencias significativas (ANOVA, $p=0.02$) (fig 11), y es posible observar cómo la actividad es menor durante la semana 1 y aumenta hacia la semana 5, indicando un estado de alerta más elevado durante la que debería ser la fase de reposo.

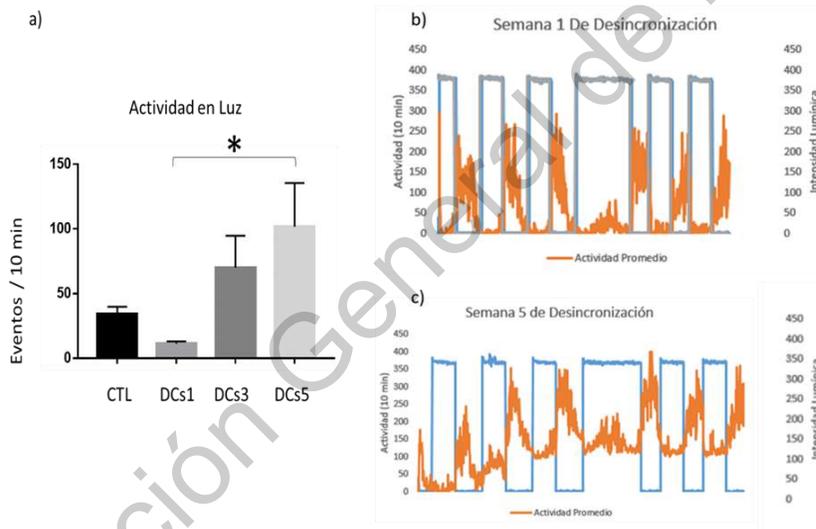


Figura 11. Diferencias en actividad diurna.

(a) La actividad total durante las 3 semanas es mucho más notoria en la semana 5, donde existe una desincronización mucho más marcada. (b y c) perfiles de actividad promedio. Diferencias entre semana 1 y 5. * indica diferencias entre grupos ($p < 0.05$)

Actividad nocturna:

Similar a la fase diurna, al comparar las medias de los registros nocturnos, sí se encontró ~~existe~~ una diferencia ~~existen~~ significativa entre las tres semanas de desincronización y la actividad del grupo control ($p < 0.05$; $p = 0.0002$) (fig 12). Es observable un aumento en la tendencia de la actividad hacia la semana 5, incluyendo las fases de reposo, sin perder del todo el ritmo del ciclo.

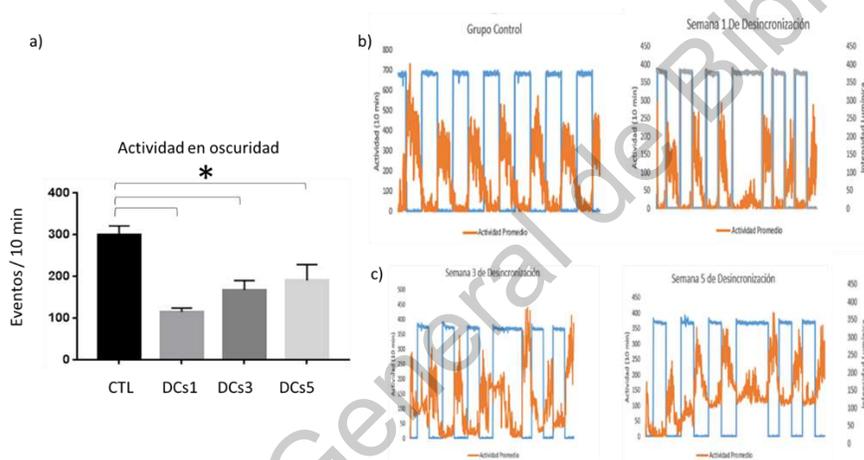


Figura 12. Diferencias en actividad en fase nocturna.

Es observable la tendencia a la desincronización, y un aumento de la actividad antes y después de la fase de iluminación continua en la quinta semana. *indica diferencias entre grupos ($p < 0.05$)

Actividad durante Avances y retrasos:

En cuanto a las comparaciones entre grupos respecto al promedio de actividad diurna durante los segmentos en que el fotoperiodo causa avances (figura 12 a) o retrasos (Fig 13 b), no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$, ANOVA), aunque se mantiene la tendencia de incrementos observada en el análisis del promedio total durante las tres semanas de desincronización. La comparación del promedio de actividad nocturna durante los segmentos en que el fotoperiodo causa avances (figura 14 a) o retrasos (Fig 14 b), tampoco se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$, ANOVA). al realizar las pruebas de ANOVA, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$), al igual que en la prueba de contraste de Tuckey posterior (fig 13 y 14). Aunque, de nueva cuenta, se observa un aumento hacia la semana 5 del protocolo, y durante la fase diurna (fig 12).

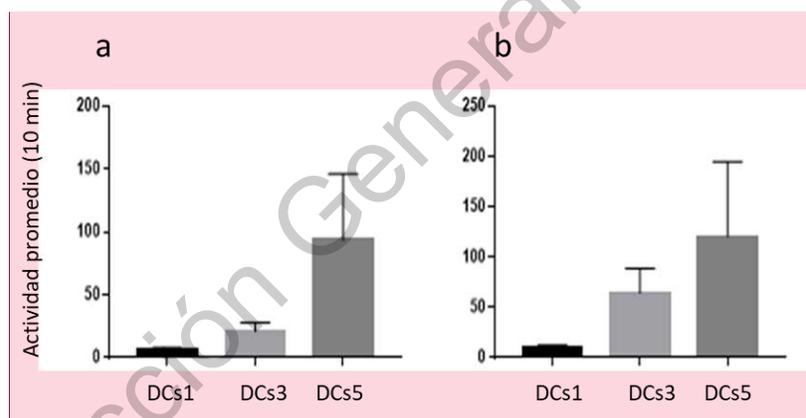


Figura 13. Comparación del promedio de actividad diurna (eventos por cada 10 min) durante las fases del protocolo de iluminación de avances y retrasos.

Con formato: Fuente: (Predeterminada) +Cuerpo (Calibri)

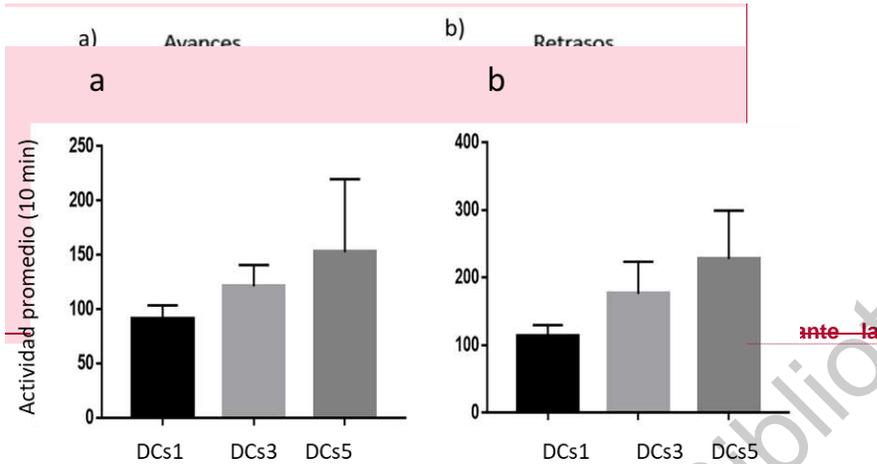


Figura 14. Comparación del promedio de actividad nocturna ante los Avances y Retrasos del protocolo de desincronización circadiana.

Comentado [M3]: La gráfica debe incluir las unidades en el eje de las Y (promedio de eventos por cada 10 min) Lo mismo aplica para la siguiente figura,

En el eje de las X debes cambiar la nomenclatura a DCS1 3 y 5

El formato de los títulos deben ser igual en ambas figuras

Number of families	1				
Number of comparisons per family	3				
Alpha	0.05				
Tukey's multiple comparisons test					
	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Av S1dia vs. Av S3dia	-14.74-119.6	to 90.16	No	ns	0.9387A-B
AvS1dia vs. AvS5dia	-86.91-191.8	to 17.99	No	ns	0.1225A-C
AvS3dia vs. AvS5dia	-72.17-177.1	to 32.72	No	ns	0.2301B-C

Number of families	1				
Number of comparisons per family	3				
Alpha	0.05				
Tukey's multiple comparisons test					
	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
rets1dia vs. rets3dia	-54.2-208.9	to 100.5	No	ns	0.6767A-B
rets1dia vs. rets5dia	-110.2-264.9	to 44.56	No	ns	0.208A-C
rets3dia vs. rets5dia	-55.98-210.7	to 98.76	No	ns	0.6595B-C

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Number of families	1
Number of comparisons per family	3
Alpha	0.05

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Ac Noch S1 vs. Av Noch S3	-29.66	-169.4 to 110	No	ns	0.8656A-B
Ac Noch S1 vs. Av Noch S5	-61.35	-201 to 78.36	No	ns	0.543A-C
Av Noch S3 vs. Av Noch S5	-31.69	-171.4 to 108	No	ns	0.8482B-C

Number of families	1
Number of comparisons per family	3
Alpha	0.05

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Ret Noch S1 vs. Ret Noch S3	-62.01	-234.2 to 110.2	No	ns	0.6619A-B
Ret Noch S1 vs. Ret Noch S5	-113.4	-285.6 to 58.77	No	ns	0.2591A-C
Ret Noch S3 vs. Ret Noch S5	-51.43	-223.6 to 120.8	No	ns	0.7523B-C

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Variaciones en Peso e Ingesta:

Al observar el registro del peso corporal de los ratones expuestos al protocolo de desincronización circadiana las respuestas fueron variables. La figura (15) muestra el promedio (\pm EE) del peso corporal (a) de cuatro ratones que siguieron este protocolo y su evolución a lo largo del experimento. A la derecha se muestra el promedio (\pm EE) del consumo relativo de alimento /g de peso corporal.

, es observable, en

Figura 15. Peso Corporal y Consumo promedio. Registro del peso corporal (a) de Neotomodon alstoni antes (Ctl) , en las tres etapas de evaluación del protocolo de desincronización. A la derecha, el consumo relativo (gramos de alimento/g de peso corporal). ~~la mayoría de los casos (el ratón 5 perdió 3 g), una tendencia hacia una pérdida de peso inicial, pero con una transición hacia un aumento de peso gradual conforme avanza el protocolo de desincronización (Fig 15).~~

5. Discusión

Neotomodon alstoni presenta ritmos circadianos de actividad locomotora muy estables, que muestran deterioro ante condiciones que implican desincronización circadiana como el estado de obesidad (Miranda et al, 2019). En el presente estudio se planteó la posibilidad de inducir una desincronización circadiana únicamente variando las características del fotoperiodo, a manera de horarios irregulares de luz y oscuridad que implicaran esfuerzos fisiológicos constantes para mantener una sincronización de ritmo circadiano de actividad locomotora.

En otros estudios se han usado protocolos de desincronización diversos entre los que destacan el jet-lag continuo y periodos de LO cortos o largos, e incluso la luz constante como factor desincronizador (revisado en Golombek et al, 2013). entre estos la actividad locomotora (Miranda et al, 2019). No hay diferencias estadísticas entre el grupo control y la primera semana de exposición al protocolo de fotoperiodo irregular del grupo experimental, sin embargo, las diferencias se vuelven notorias conforme se prolonga la exposición al fotoperiodo.

De manera general se muestra que al inicio hay una reducción en los niveles de actividad que progresivamente aumenta hasta ser semejante al control en el final del registro. El peso y el consumo de alimento también cambian pero no existe una clara relación entre estos cambios de actividad y conducta de ingesta con los cambios en los niveles de actividad observados.

De igual modo, la diferencia entre avances y retrasos es observable gráficamente, principalmente hacia el protocolo de retraso (V-D), después del periodo de luz continua. Esto, probablemente, debido a que ya existe una dificultad para sincronizar el ritmo interno con las señales externas (Paladino, *et al.*, 2013), y que podría explicar el aumento en la actividad durante las fases de reposo a partir de la tercera semana de desincronización.

Algunos parámetros que deberían ser considerados en siguientes estudios deben incluir si hay un desorden en las horas de ingesta, posiblemente mediante análisis de videograbaciones, además es necesario revisar si el protocolo implica variaciones fisiológicas no evaluadas en este trabajo, como es el caso de lo estudiado por (Tania, tesis de licenciatura)

La hipótesis original en este trabajo era que ~~La~~ exposición de animales delgados a protocolos de desincronización que propicie el desarrollo de obesidad, o compararlo al comportamiento de ratones en un estado preexistente de obesidad, permitiría vincular si la desincronización circadiana induce obesidad en este animal o si la obser4vada en los animales obesos, es consecuencia de factores distintos que promueven los desórdenes metabólicos.

~~comparar los efectos de la desincronización hacia individuos metabólicamente vulnerables.~~

Respecto a la desorganización circadiana en ratones obesos de ~~Además, se ha~~ a la deficiencia de la expresión de los receptores de leptina y ~~proopio~~melanocortina

(Pérez-Mendoza et al, 2017), de regulación hepática del metabolismo de lípidos (Pérez-mendoza et al 2018) y depresión de proteínas de reloj circadiano en diversos tejidos (Arellanes-Licea et al, 2021). Si existe un efecto equivalente en este protocolo de desincronización circadiana por fotoperiodo, podría evaluarse en los parámetros ya mencionados, lo que podría suponer, en el caso actual, que la exposición a este fotoperiodo irregular propicia un desequilibrio en la maquinaria molecular interna, y reflejando un impacto en la actividad locomotora e ingesta de *N. alstoni*.

El uso de modelos de roedores que presenten respuestas similares a aquellas obtenidas en humanos, es de gran importancia. En estudios con modelos distintos donde los individuos son sometidos a protocolos con una mayor cantidad de horas de avances y atrasos, se han reportado padecimientos metabólicos como obesidad, hipoglucemia e hiperglucemia y diabetes, además de aparición de ~~eáncer~~ y carcinomas, incluso, en animales con una o más patologías preexistentes, la exposición a dichos protocolos parecieran agravar los síntomas (Golombek *et al*, 2013; Miranda *et al*, 2019).

6. Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que:

1) El fotoperiodo irregular sí tiene un impacto negativo sobre los perfiles de actividad de *N. alstoni*, el cual tiende a disociarse o volverse irregular entre más se prolonga la exposición al fotoperiodo (Sem. 1 vs Sem 5).

~~2) No se nota efecto significativo en el consumo de alimento o en el cambio de peso.2) No existe una diferencia clara entre las primeras semanas de desincronización, durante las fases de reposo, y el grupo control, excepto durante las últimas semanas de exposición (semana 5), debido a la imposibilidad de los ratones de sincronizar el ritmo interno con el externo, desencadenando un estado de estrés constante donde el reposo durante la fase diurna es menor y hay un aumento en el peso de los individuos sin que esto signifique un aumento directo en la ingesta de los individuos.~~

Es importante ahondar en los resultados obtenidos, a través de estudios de procesos metabólicos como la síntesis de melatonina, síntesis de glucosa, lípidos, y los principales componentes moleculares del reloj endógeno antes y después del periodo de desincronización circadiana, con la finalidad de observar el desarrollo de patologías o la desorganización del reloj endógeno, para comprender posibles efectos a distintos niveles de organización biológica, y que permita observar la existencia de rasgos genéticos en *N. alstoni* que propicien el desarrollo de la obesidad.

7. Anexos



FACULTAD DE CIENCIAS

Facultad de Ciencias, UNAM
Cto. Exterior s/n, C.U., 04510
Ciudad de México, CDMX

CEARC
Oficio: CEARC/Bioética/02032020
Asunto: Dictamen/Proyecto/Investigación/PI202001002

Folio: PI_2020_01_002.

Nombre de la comisión: Comisión de Ética y Responsabilidad Científica de la Facultad de Ciencias.

Nombre del autor del protocolo: Dr. Manuel Miranda Anaya.

Título del proyecto: Efecto de la desincronización circadiana sobre la conducta y el metabolismo de ratones *Neotomodon alstoni*.

Fecha de recepción: 23 de enero de 2020.

Nombre de la institución y sede de la investigación: UMDI, Juriquilla, UNAM.

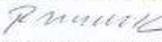
Estimado Dr. Manuel Miranda Anaya.

El subcomité de Bioética de la Comisión de Ética y Responsabilidad Científica de la Facultad de Ciencias revisó el protocolo arriba mencionado, de acuerdo a la información proporcionada, el comité resolvió que tanto la metodología como los procedimientos de la investigación cumplen con los lineamientos bioéticos relacionados con el uso y manejo de organismos de laboratorio.

Los miembros del comité dan un dictamen favorable sobre la investigación y las formas de aplicación de los procedimientos.

Dictamen: APROBADO

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, CDMX, a 2 de marzo de 2020.


Dr. Ricardo Noguera Solano
Coordinador de la Comisión de Ética Académica y Responsabilidad Científica de la Facultad de Ciencias, UNAM. cearc@ciencias.unam.mx



Referencias:



- mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. Brain Res. 2001; 916:172–91.
- Aguilar R.R., P., Guadarrama, C., Mercado., and J.L., Chávez. (2004). El núcleo supraquiasmático la glándula pineal en la regulación de los ritmos circadianos en roedores. TEMAS SELECTOS DE NEUROCIENCIAS III. UNAM.
 - Álvarez-Castañeda, S.T. and I., Castro-Arellano. (2016). Neotomodon alstoni. The IUCN Red List of Threatened Species.
 - [Arellanes-Licea EDC, Pérez-Mendoza M, Carmona-Castro A, Díaz-Muñoz M, Miranda-Anaya M. \(2021\) Obese Neotomodon alstoni mice exhibit sexual dimorphism in the daily profile of circulating melatonin and clock proteins PER1 and BMAL1 in the hypothalamus and peripheral oscillators. Chronobiol Int. 38\(4\):584.](#)
 - Ayala-Guerrero FJ, Ramos L, Vargas-Reyna G, Mexicano. 1998. Sleep Patterns of the Volcano Mouse (*Neotomodon alstoni alstoni*). Physiol. Behav. 64(4): 577.
 - Buhr E., and J. Takahashi. (2013). Molecular Components of the Mammalian Circadian Clock. En: Kramer A., and M. Mellow., Circadian Clocks. Handbook of Experimental Pharmacology. 217: 3-28. Berlin: Springer.

- Caldelas I., J.M. Chimal., G.M. Martínez, and R. Hudson. (2005). Non-photic circadian entrainment in mammals: A brief review and proposal for study during development. Biol. Rhythm Res. 36(1);23.
- Camargo, S.A., and R.V. Vargas. (2014). Ritmos biológicos, Cronobiología y Cronofarmacología: Un desafío para el profesional de Enfermería en la administración de medicamentos. Actual. Enferm. 17(1); 14-20.
- Carneiro B., and J.F. Araujo. (2012). Food Entrainment: Major and Recent Findings. Front. Neurosci. 7(83); 1-6.
- Cascallares, G., S., Riva, D. L., Franco, S., Risau-Gusman, and P. M., Gleiser. (2018). Role of the circadian clock in the statistics of locomotor activity in Drosophila. PLoS ONE. 13(8).
- Casiraghi, L.P., A. Alzamendi, A. Giovambattista, J.J, Chiesa and D. A., Golombek. (2016). Effects of chronic forced circadian desynchronization on body weight and metabolism in male mice. Physiol. Rep. 4(8).
- Chen AS, Marsh DJ, Trumbauer ME, Frazier EG, Guan XM, Yu H, Rosenblum CI, Vongs A, Feng Y, Cao L, Metzger JM, Strack AM, Camacho RE, Mellin TN, Nunes CN, Min W, Fisher J, Gopal-Truter S, MacIntyre DE, Chen HY, Van der Ploeg LH. Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass. Nat Genet. 2000 Sep;26(1):97.
- Dunlap J. C. (1999). Molecular Bases of Circadian Clock. Cell Press: Cell 96(2); 271.

- Eban-Rothschild A., and G. Bloch. (2012). Social Influences on Circadian Rhythms and Sleep in Insects. *Advances in Genetics*. 77 (1); 1.
- Ganguly, S., S. L., Coon, and D. C., Klein. (2002) Control of melatonin synthesis in the mammalian pineal gland: the critical role of serotonin acetylation. *Cell. Tissue Res.* (309):127.
- García, B. A., F. S. D., Hernández, M. G., Herrera, M. C., Aguilar, and R. G., Sánchez. (2012). Primer registro del ratón de los volcanes (*Neotomodon alstoni*) para el estado de Hidalgo, México. *Rev. Mex. Biodiv.* 83(2); 578.
- Golombek, D. A., L. P. Casiraghi, P. V. Agostino, N. Paladino, J. M. Duhart, S. A. Plano, and J. J. Chiesa. (2013). The times they're a-changing: Effects of circadian desynchronization on physiology and disease. *J. Physiol.* 107(4); 310.
- Gillette M. U., and S.A. Tischkau. (1999). Suprachiasmatic nucleus: The brain's circadian clock. *Recent Prog. Horm. Res.* (54); 35.
- Guadarrama, O.P., R. A. Ramírez, Madrid. S. A., Castillo R. C., Carrasco A. D., y R. R. Aguilar. (2014). Controladores del Tiempo y el Envejecimiento: Núcleo Supraquiasmático y Glándula Pineal. *Int. J. Morphol.* 32(2), 409.
- Hughes, A. T. L., and H. D., Piggins. (2012). Feedback actions of locomotor activity to the circadian clock. *Prog. Brain Res.* (199);305.
- Jud, C., I., Schmutz, G., Hampp, H., Oster, and U., Albrecht. (2005). A Guideline for analyzing circadian wheel-running behavior in rodents under different lighting conditions. *Biol. Proced. Online.* 7(1); 101.

- [Kronfeld, S. N., and D. Tamar. \(2008\). Activity patterns of rodents: the physiological ecology of biological rhythms. Biol. Rhythm Res. 39\(3\); 193.](#)
- [Miranda, A. M., A. V., Carmona, and C. A., Carmona. \(2016\). Effects of obesity on circadian photic entrainment of locomotor activity in wild mice Neotomodon alstoni. Biol. Rhythm. Res. 47\(4\): 529.](#)
- [Miranda, A. M., M. M., Pérez, C. R., Juárez-Tapia, and A., Carmona-Castro. \(2019\). The volcano mouse Neotomodon alstoni of central Mexico, a biological model in the study of breeding, obesity and circadian rhythms. Gen. Comp. Endocrinol. \(273\); 61.](#)
- [Mora, F. y A.M. Sanguinetti. \(1995\). Diccionario de neurociencias. Alianza editorial, Madrid.](#)
- [Paladino, N., J. M., Duhart, M. L. M., Fedele, and D. A., Golombek. \(2013\). Characterization of locomotor activity circadian rhythms in athymic nude mice. J. Circadian Rythms. 11\(2\).](#)
- [Partch, C. L., C. B., Green, and J. S.,Takahashi. \(2014\). Molecular architecture of the mammalian circadian clock. Trends in Cell Biol. 24\(2\), 90.](#)
- [Pérez-Mendoza M, Luna-Moreno D, Carmona-Castro A, Rodríguez-Guadarrama HA, Montoya-Gómez LM, Díaz-Muñoz M, Miranda-Anaya M. \(2017\). Neotomodon alstoni mice present sex differences between lean and obese in daily hypothalamic leptin signaling. Chronobiol Int. 34\(7\):956.](#)
- [Pérez-Mendoza M, Rivera-Zavala JB, Rodríguez-Guadarrama AH, Montoya-Gomez LM, Carmona-Castro A, Díaz-Muñoz M, Miranda-Anaya M. \(2018\).](#)

[Daily cycle in hepatic lipid metabolism in obese mice, *Neotomodon alstoni*: Sex differences. Chronobiol Int. 35\(5\):643.](#)

- [Refinetti, R. \(2015\). Comparison of light, food, and temperature as environmental synchronizers of the circadian rhythm of activity in mice. J. Physiol. Sci. 65\(4\); 359.](#)
- [Saini R., M. Jaskolski, and S. J. Davis. \(2019\). Circadian oscillator proteins across the kingdoms of life: structural aspects. BMC Biology. 17\(13\).](#)
- [Salazar J.A., L. Parra, S. Barbosa, P. Leff, y B. Antón. \(2006\). Sincronización Luminosa. Conceptos Básicos: Primera parte. Revista de Salud Mental. UNAM. 29\(2\); 11.](#)
- [Salichos L., and A. Rokas \(2010\). The diversity and evolution of circadian clock proteins in fungi. Mycologia. 102\(2\); 269.](#)
- [Silver R., and P. Balsam. \(2010\). Oscillators entrained by food and the emergence of anticipatory timing behaviors. Sleep Biol. Rhythms. 8\(2\); 120.](#)
- [Tanikagi Y., T. Higashi, K. Takayama, J. A. Nagano, M. Honjo, A. Tezuka, M. Kamitani, and H. Fukuda. \(2019\). Simplification of circadian rhythm measurement using species-independent time-indicated genes. Current Plant Biology. 19.](#)
- [Vitaterna H. M., J. Takahashi, and F. Turek. \(2001\). Overview of Circadian Rhythms. Alcohol Res. Health. 25\(2\); 85.](#)

- Wams E., S. J. Riede, I. Van der Laan, T. Bulte, and A. Roelof. (2017). Mechanisms of Non-Photic Entrainment. En: Kumar V., Biological Timekeeping: Clocks, Rhythms and Behaviour (395). India: Springer.
- Welsh D., J. Takahashi, and S. Kay. (2010). Suprachiasmatic Nucleus: Cell Autonomy and Network Properties. Annual Review of Physiology. (72); 551.
- Yannielli, P., J., McKinley, and M. Harrington. (2002). Is novel wheel inhibition of Per1 and Per2 expression linked to phase shift occurrence? Neuroscience, 112(3); 677.

Dirección General de Bibliotecas UAQ