

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III**



**POSIBLE PAPEL DE LA MELATONINA EN LA INDUCCIÓN  
DE OBESIDAD POR DIETA HIPERCALÓRICA : EFECTOS  
METABÓLICOS EN RATAS MACHO**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**María Judith Ríos Lugo**

Bajo la dirección de las doctoras

Ana Isabel Esquifino Parras

Pilar Cano Barquilla

Vanesa Jiménez Ortega

**Madrid, 2011**

ISBN: 978-84-694-6476-2

©María Judith Ríos Lugo, 2010

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III**



**“POSIBLE PAPEL DE LA MELATONINA EN LA INDUCCIÓN DE  
OBESIDAD POR DIETA HIPERCALÓRICA: EFECTOS  
METABÓLICOS EN RATAS MACHO”**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**María Judith Rios Lugo**

**Bajo la dirección de**

**Dra. Ana Isabel Esquifino Parras**

**Dra. Pilar Cano Barquilla**

**Dra. Vanesa Jiménez Ortega**

**Madrid, 2010**



**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III**  
**Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid**  
**Ciudad Universitaria S/N 28040, Madrid, España**  
**Tel. 34913941678**

**Dra. Ana Isabel Esquifino Parras**, Catedrática del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III. Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid.

**Dra. María del Pilar Cano Barquilla**, Profesor Ayudante Doctor del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III. Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid.

**Dra. Vanesa Jiménez Ortega**, Profesor Ayudante Doctor. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III. Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid.

HACEN CONSTAR: que el desarrollo de la presente memoria titulada “**POSIBLE PAPEL DE LA MELATONINA EN LA INDUCCIÓN DE OBESIDAD POR DIETA HIPERCALÓRICA: EFECTOS METABÓLICOS EN RATAS MACHO**”, presentada por María Judith Rios Lugo, ha sido realizado bajo nuestra dirección. en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III. De la Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid (UCM), y hallándose concluida autorizamos su presentación a fin de que sea juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que conste donde proceda, firmamos el presente documento en Madrid, a 10 de septiembre de 2010.

Fdo: Dra. Ana Isabel Esquifino Parras

Fdo: Dra. María del Pilar Cano Barquilla

Fdo: Dra. Vanesa Jiménez Ortega



## ***ABREVIATURAS***



## ABREVIATURAS

<b>AgRP</b>	Proteína relacionada Agouti
<b>AMPK</b>	Proteína quinasa dependiente de AMP cíclico
<b>ANOVA</b>	Análisis de Varianza
<b>ANUC</b>	Animalario Central de la Universidad Complutense
<b>ARC</b>	Núcleo arcuato
<b>CART</b>	Tránsito regulado por cocaína-anfetamina
<b>CCK</b>	Colecistoquinina
<b>cDNA</b>	Ácido desoxirribonucleico copia
<b>CE</b>	Colesterol Esterasa
<b>CO</b>	Colesterol Oxidasa
<b>ColS</b>	Colaboradores
<b>COX-2</b>	Ciclooxigenasa 2
<b>CT</b>	Thershold cycle o Ciclo umbral
<b>CTH</b>	Hormona adrenocorticotropa
<b>Ctrl</b>	Control
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>dNTP</b>	Desoxirribonucleótidos trifosfato
<b>E.E.M</b>	Error Estándar de la Media
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetracético
<b>GK</b>	Glicerol kinasa
<b>GLP</b>	Péptido similar al glucagón
<b>GPO</b>	glicerol 3-fosfato oxidasa
<b>i-NOS</b>	Enzima Oxido Nítrico Sintasa Inducible
<b>IR</b>	Receptor de insulina
<b>IRS-1</b>	Sustrato del receptor de insulina-1
<b>IRS-2</b>	Sustrato del receptor de insulina-2
<b>LepR</b>	Receptor de Leptina
<b>LH</b>	Hormona luteinizante
<b>LHA</b>	Área hipotalámica lateral
<b>MC3</b>	Receptor específico para melanocortina-3
<b>MC4</b>	Receptor específico para melanocortina-4

<b>MIF</b>	Intensidad de fluorescencia media
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>MT1</b>	Receptor de melatonina-1
<b>MT2</b>	Receptor de melatonina-2
<b>NPV</b>	Núcleo paraventricular
<b>NPY</b>	Neuropéptido Y
<b>NSQ</b>	Núcleo supraquiasmático
<b>°C</b>	grado centígrado
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>POMC</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>PMCH</b>	Precursor de pro-hormona concentradora de melanina
<b>POD</b>	Peroxidasa
<b>PCR</b>	Pro-opiomelanocortina
<b>PrRP</b>	Péptido regulador secretor de la prolactina
<b>PYY</b>	Péptido YY
<b>RIA</b>	Radioinmunoanálisis
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SNC</b>	Sistema nervioso Central
<b>TSH</b>	Hormona tirotropina
<b>UCM</b>	Universidad Complutense de Madrid
<b>UV/VIS</b>	Ultravioleta visible
<b>VM</b>	Núcleo hipotalámico ventromedial
<b>ZDF</b>	Zucker diabetic fatty rat
<b><math>\alpha</math>-MSH</b>	Hormona estimuladora de melanocitos-alfa
<b><math>\beta</math>-MSH</b>	Hormona estimuladora de melanocitos beta

## ***ÍNDICE***



# ÍNDICE

Página

---

Abreviaturas.....	i
<b>CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1. Control de la ingesta y el balance energético.....	3
1.1 Aspectos generales.....	3
1.2 Mecanismos reguladores de la ingesta.....	4
1.2.1 Regulación hipotalámica: genes implicados en la regulación de la ingesta .....	4
1.2.1.1 Neuropeptido Y (NPY).....	6
1.2.1.2 Proopiomelanocortina (POMC).....	8
1.2.1.3 Péptido-liberador de la prolactina (PrRP).....	10
1.2.1.4 Receptor de leptina (LepR).....	10
1.2.1.5 Receptor de Insulina (IR) y los sustratos del receptor de insulina (IRS-1 e IRS-2).....	11
1.2.2 Regulación periférica del apetito.....	12
1.2.2.1 Insulina.....	13
1.2.2.2 Leptina.....	13
1.2.2.3 Adiponectina.....	15
1.3 Obesidad.....	16
1.3.1 Aspectos generales.....	16
1.3.2 Modelos animales de obesidad.....	17
1.4. Ritmos biológicos.....	18
1.4.1 Ritmo circadiano.....	18
1.4.2 Fisiología del ritmo circadiano.....	20
1.4.3. Regulación circadiana del metabolismo.....	21
1.4.4 Melatonina.....	23

<b>CAPÍTULO 2. OBJETIVOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>27</b>
2.1 Objetivo global.....	30
2.2 Objetivos específicos.....	30
2.2.1 Bloque I.....	31
2.2.2 Bloque II.....	32
<b>CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
3.1 Instalaciones.....	37
3.2 Animales de experimentación.....	37
3.3. Dietas administradas.....	38
3.4 Tratamiento con melatonina.....	39
3.5 Sacrificio de los animales.....	39
3.6 Recogida de Muestras.....	40
3.7 Material de uso general.....	40
3.8 Medida de los niveles sanguíneos de glucosa.....	41
3.9 Medida de las concentraciones plasmáticas de colesterol, proteínas, triglicéridos y proteínas totales.....	42
3.10 Medida de las concentraciones plasmáticas de Insulina, leptina y adiponectina.....	46
3.11 Medida de las variaciones diarias de la expresión relativa de los genes NPY, POMC, PrRP, IR, IRS-1y 2.....	49
3.11.1 Aislamiento de RNA a partir de tejido.....	49
3.11.2 Cuantificación de la concentración de RNA.....	51
3.11.3 Retrotranscripción.....	51
3.11.4 PCR Cuantitativa a tiempo real.....	52
3.11.5 Sondas.....	54
3.11.6 Valoración de los resultados PCR Cuantitativa a tiempo real.....	55

3.12 Análisis estadístico.....	58
<b>CAPÍTULO 4. RESULTADOS.....</b>	<b>59</b>
Bloque 1.....	61
4.1 Efecto de un tratamiento con melatonina, durante nueve semanas, en ratas macho adultas, alimentadas con una dieta estándar de mantenimiento.....	61
4.1.1 Ingesta de alimentos y consumo de agua.....	61
4.1.2 Efecto de un tratamiento con melatonina, durante nueve semanas sobre la evolución semanal del peso.....	61
4.1.3 Efecto de un tratamiento con melatonina, durante nueve semanas, sobre los niveles medios de concentración de glucosa en sangre y colesterol, triglicéridos y proteínas totales en plasma, durante la fase luminosa y la fase oscura del fotoperiodo.....	62
4.1.4 Efecto de un tratamiento con melatonina, durante nueve semanas sobre las variaciones diarias de los niveles sanguíneos de glucosa.....	63
4.1.5 Efecto de un tratamiento con melatonina, durante nueve semanas sobre las variaciones diarias de las concentraciones plasmáticas de colesterol, triglicéridos y proteínas totales.....	64
4.1.6 Efecto de un tratamiento con melatonina, durante nueve semanas, sobre los niveles medios de concentración de hormonas en plasma, durante la fase luminosa y la fase oscura del fotoperiodo.....	68
4.1.7 Efecto de un tratamiento con melatonina, durante nueve semanas, sobre las variaciones diarias en los niveles de concentración plasmática de insulina, leptina y adiponectina.....	69
4.1.8 Efecto de un tratamiento con melatonina, durante nueve semanas, sobre los niveles de expresión génica relativa de genes, en hipotálamo medio basal, durante la fase luminosa y la fase oscura del fotoperiodo.....	72
4.1.9 Efecto de un tratamiento con melatonina, durante nueve semanas, sobre las variaciones diarias en la expresión génica relativa de NPY, POMC,	

PrRP, IR, LepR, IR, IRS-1 y 2.....	73
Bloque 2.....	83
4.2 Efecto de un tratamiento con melatonina, durante nueve semanas, en ratas macho adultas, alimentadas con una dieta estándar de mantenimiento.....	83
4.2.1 Ingesta de alimentos y consumo de agua.....	83
4.2.2 Efecto de un tratamiento con melatonina, durante nueve semanas sobre la evolución semanal del peso.....	83
4.2.3 Efecto de un tratamiento con melatonina, durante nueve semanas, sobre los niveles medios de concentración de glucosa en sangre y colesterol, triglicéridos y proteínas totales en plasma, durante la fase luminosa y la fase oscura del fotoperiodo.....	85
4.2.4 Efecto de un tratamiento con melatonina, durante nueve semanas sobre las variaciones diarias de los niveles sanguíneos de glucosa.....	86
4.2.5 Efecto de un tratamiento con melatonina, durante nueve semanas sobre las variaciones diarias de las concentraciones plasmáticas de colesterol, triglicéridos y proteínas totales.....	87
4.2.6 Efecto de un tratamiento con melatonina, durante nueve semanas, sobre los niveles medios de concentración de hormonas en plasma, durante la fase luminosa y la fase oscura del fotoperiodo.....	93
4.2.7 Efecto de un tratamiento con melatonina, durante nueve semanas, sobre las variaciones diarias en los niveles de concentración plasmática de insulina, leptina y adiponectina.....	93
4.2.8 Efecto de un tratamiento con melatonina, durante nueve semanas, sobre los niveles de expresión génica relativa de genes, en hipotálamo medio basal, durante la fase luminosa y la fase oscura del fotoperiodo.....	98
4.2.9 Efecto de un tratamiento con melatonina, durante nueve semanas, sobre las variaciones diarias en la expresión génica relativa de NPY, POMC, PrRP, IR, LepR, IR, IRS-1 y 2.....	99

<b>CAPÍTULO 5. DISCUSION.....</b>	<b>113</b>
Bloque 1.....	115
5.1 Administración de melatonina, durante 9 semanas, en ratas adultas alimentadas con dieta de mantenimiento estándar.....	115
A) Resumen e interpretación de resultados.....	115
B) Parámetros plasmáticos.....	115
C) Parámetros génicos.....	119
Bloque 2.....	125
5.2 Administración de melatonina, durante 11 semanas, en ratas adultas alimentadas con una dieta hipergrasa.....	125
A) Resumen e interpretación de resultados.....	125
B) Parámetros plasmáticos en ratas alimentadas con una dieta hipergrasa.....	125
C) Parámetros plasmáticos en ratas alimentadas con una dieta hipergrasa tratadas en paralelo con melatonina.....	129
D) Parámetros Génicos.....	131
E) Parámetros génicos en ratas adultas alimentadas con una dieta hipergrasa, tratados con melatonina en paralelo.....	134
<b>CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>137</b>
<b>CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>141</b>

---



## ***CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN***



## **1. Control de la ingesta y el balance energético**

### **1.1 Aspectos generales**

El comportamiento alimenticio y la regulación de la ingesta de nutrientes, es un fenómeno complejo influenciado en parte, por factores no regulados biológicamente, como son los cambios medioambientales (Zheng y cols, 2009), así como también por estímulos endógenos producidos por las reacciones que intervienen en el gasto energético y en su almacenamiento (Blevins y cols, 2010).

Desde hace relativamente pocos años, se ha comenzado a estudiar este comportamiento alimenticio, desde distintos puntos de vista: 1.- modificando la composición, calidad y cantidad de la dieta, añadiendo y/o restringiendo glúcidos, lípidos y proteínas, o utilizando combinaciones entre ellos (Boqué y cols, 2009), 2.- analizando los efectos que determinados estados fisiopatológicos producen en los mecanismos endógenos de regulación de la ingesta y el balance energético, debidos a situaciones de estrés (Chacón y cols, 2005; D'mello y cols, 2006), o patologías de origen metabólico como la diabetes (Mountjoy y cols, 2010), la anorexia (Chacón y cols, 2005; Asarian y cols, 2010), y 3.- factores externos o ambientales como el horario de comidas, el periodo entre ellas, la duración del día y la noche y la estación del año (Kremers y cols, 2006; Laposky y cols, 2008; Arble y cols, 2009; Cano y col, 2009; Ekmekcioglu y cols, 2010). Además, factores mecánicos como la distensión del estómago (Maljaars y cols, 2007), también pueden producir un desarreglo metabólico.

En los animales, el motivo fundamental de la ingesta de alimentos parece ser la satisfacción de las necesidades energéticas. Sin embargo, estudios recientes sugieren que el grado de saciedad puede variar también en función de la proporción de los macronutrientes presentes en el alimento (lípidos, proteínas o glúcidos) (Boqué y cols, 2009; Diéguez y cols, 2009), ya que la regulación de la ingesta depende no sólo del contenido calórico de la comida, sino de la procedencia de esa energía (Zheng y cols, 2009; Rolls y cols, 2009). Estudios realizados muestran que la sobrealimentación, conlleva el almacenamiento del 75% al 85% del exceso de energía procedente de los

glúcidos y del 90% al 95% de la procedente de las grasas (Wilson y cols, 2007; Diéguez y cols, 2009). El exceso en la ingesta de lípidos se almacena fundamentalmente en el tejido adiposo produciendo un incremento de la adiposidad y por tanto, obesidad (Hill y cols, 2009).

## **1.2 Mecanismos reguladores de la ingesta**

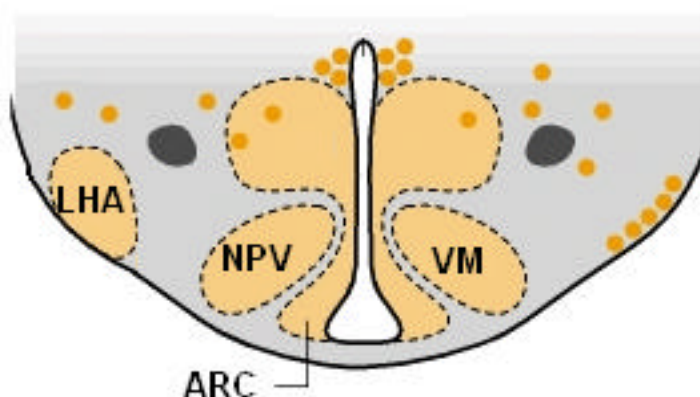
### **1.2.1 Regulación hipotalámica: genes implicados en la regulación de la ingesta**

Diversos estudios realizados, han demostrado que el mecanismo regulador del apetito se encuentra en el hipotálamo (Arora y cols, 2006; Lopaschuk y cols, 2010), dado que la lesión en áreas hipotalámicas, afecta al comportamiento alimenticio y la regulación del balance energético provocando un incremento o una disminución en el peso corporal (Schwartz, 2010; Sánchez-Lasheras y cols, 2010). Por lo tanto, el hipotálamo pone en marcha mecanismos neuronales específicos en función del estatus metabólico del organismo. Estos mecanismos de respuesta se activan en estados de déficit energético (vía orexigénica) o de abundancia energética (vía anorexigénica) (Schwartz, 2010).

Las principales áreas hipotalámicas que participan en la regulación de la conducta alimenticia son: el núcleo hipotalámico ventromedial (VM), cuya lesión produce un incremento en el apetito y la ingesta de alimentos, provocando así la obesidad; mientras que lesiones en el área hipotalámica lateral (LHA) producen una disminución en la ingesta y pérdida de peso; el núcleo paraventricular (NPV) que recibe información aferente de otros núcleos cerebrales y el núcleo arcuato (ARC) que es uno de los núcleos más importantes en el mecanismo de control del balance energético (Valassi y cols, 2008; Schwartz, 2010). Ver figura 1.

1985.

El núcleo arcuato contiene poblaciones de neuronas que co-expresan neuropéptido Y (NPY), Péptido relacionado Agouti (AgRP), pro-opiomelanocortina (POMC) (precursor de la melanocortina) y el transcripto regulado por cocaína-anfetamina (CART).



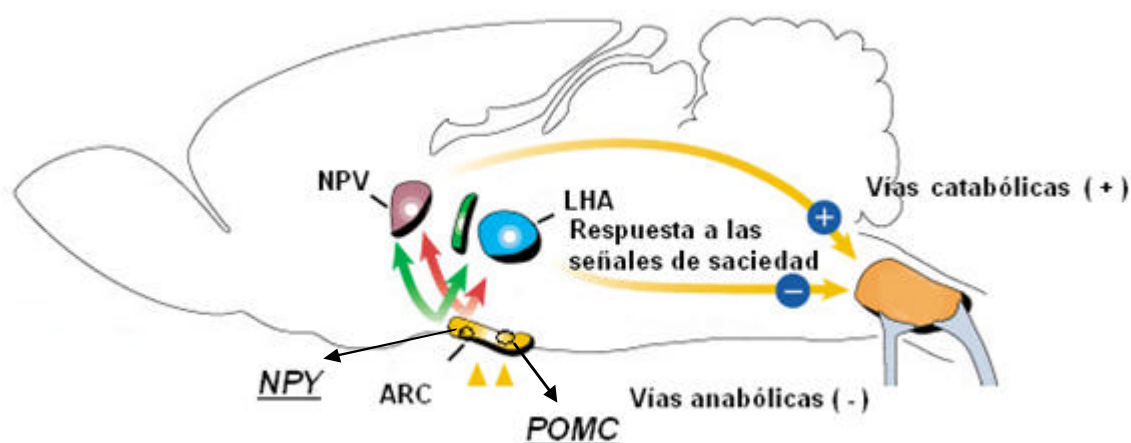
**Figura 1.** Se muestran los principales núcleos hipotalámicos, relacionados en el control del apetito, en la ratona. Núcleo Arcuato (ARC), núcleo hipotalámico ventromedial (VM); área hipotalámica lateral (LHA), núcleo paraventricular (NPV). Figura modificada de Hough y cols, 1985.

En este núcleo, tanto la vía orexigénica, donde se encuentran implicados los neuropéptidos NPY/AgRP, como la vía anorexigénica con los neuropéptidos POMC y CART, tienen conexiones recíprocas con otras áreas hipotalámicas, así como por ejemplo con el núcleo paraventricular (PVN), en donde existen receptores específicos para melanocortina (MC3 y 4) (Arora y cols, 2006), receptores de leptina (LepR) (Blevins y cols, 2009) y receptores de insulina (IR), (Valassi y cols, 2008; Sánchez-Lasheras y cols, 2009), entre otros.

Es importante destacar que el hipotálamo, además de recibir estímulos aferentes de otras áreas del sistema nervioso central (vaginales y catecolaminérgicas) (Valassi y cols, 2008; Kageyama y cols, 2010), también integra señales hormonales metabólicas endógenas (Valassi y cols, 2008). Tales señales, como son, la insulina, la leptina, el péptido similar al glucagón (GLP), los glucocorticoides, así como estímulos hormonales gastrointestinales (greлина, péptido YY y colecistoquinina) completan el mecanismo de regulación de la ingesta y el gasto energético (Näslund y cols, 2007; Valassi y cols, 2008; Schwartz, 2010).

En el presente estudio, se analizaron concretamente los principales neuropéptidos implicados en la regulación de la ingesta, el NPY, por la vía orexigénica y el POMC, por la vía anorexigénica, como se muestra en la figura 2. Sin embargo, diversos estudios realizados, han descrito un número elevado

tanto de neuropéptidos orexigénicos como anorexigénicos implicados en la neuroregulación de la ingesta del alimento, los cuales se mencionan en la tabla 1. También se estudiaron los receptores de Leptina (LepR), así como el de insulina (IR) y los sustratos del receptor de insulina (IRS-1 y 2). A continuación se describe con detalle sus funciones en la regulación de la ingesta y el balance energético.



**Figura 2** Se muestran los núcleos hipotalámicos interconectados por redes neuronales. Los circuitos originados en esta área cerebral tienen un papel especializado en la homeostasis energética. Imagen modificada de Swartz 2000.

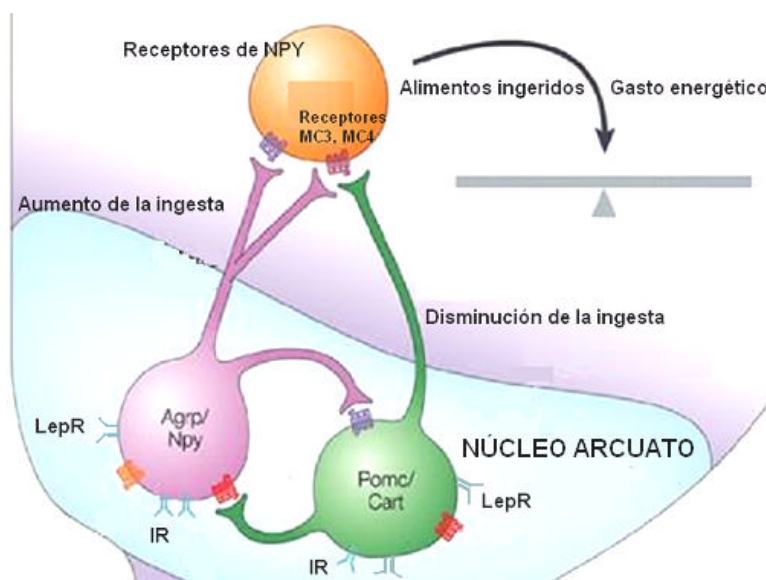
### 1.2.1.1 Neuropéptido Y (NPY)

Péptido orexigénico, que se caracteriza por ser el factor clave de la vía anabólica efectora. En la figura 2, se detalla el mecanismo de acción del neuropéptido en la regulación de la ingesta del apetito. El NPY se sintetiza en los cuerpos celulares del núcleo arcuato del hipotálamo y es transportado axonalmente al núcleo paraventricular donde se encuentra en concentraciones elevadas (Sato y cols, 2010; Chee y cols, 2010).

El NPY, también es secretado por la glándula suprarrenal y el sistema nervioso simpático, aunque como no cruza la barrera hematoencefálica (Sato y cols, 2010), no se le relaciona con el control de la ingesta a nivel central, sino que está relacionado con otras funciones (Blevins y cols, 2009; Kaczynska y cols, 2010).

Estudios previos realizados en ratas, mostraron que la inyección de NPY, a nivel hipotalámico, estimula la ingesta produciendo hiperinsulinemia y resistencia periférica a la insulina (Arora y cols, 2006; Chee y cols, 2010). Asimismo, disminuye el gasto de energía e induce simultáneamente la síntesis de enzimas lipogénicas, tanto en el hígado como en el tejido adiposo blanco (Blevins y cols, 2009; Chee y cols, 2010). Por otra parte, el ARNm para el NPY se sobre expresa en el hipotálamo de ratones obesos ob/ob (ratones con mutación en el gen de la leptina, que hace que carezcan de dicha hormona) y en ratones en ayuno (Beck y cols, 2000). Estudios realizados con anterioridad, demuestran que la deficiencia de NPY es capaz de revertir la obesidad y la sobrealimentación en los ratones ob/ob (Naveilhan y cols, 2002).

El NPY expresa receptores de insulina y leptina (Schwartz y cols, 2000), que al unirse con sus respectivos ligandos, generaría una respuesta orexigénica, ya que, la unión de las hormonas insulina como leptina, inhibirían la actividad del NPY inhibiendo así el apetito (Figura 3).



**Figura 3.** Esquema general, de los principales neuropéptidos y receptores específicos involucrados en el control de la ingesta y el balance energético. Figura modificada de Schwartz y Morton, 2001.

El NPY, además es activado por las señales originadas por la depleción de los depósitos de grasa corporal, como ocurre en el ayuno o en la diabetes

*mellitus* no controlada y en aquellas otras circunstancias que se asocian a pérdida de peso debido a las que se pierde el mecanismo de retroalimentación negativa ejercida por la insulina y la leptina a nivel hipotalámico (Valassi y cols, 2008; Beck y cols, 2008). Es por ello que la expresión del gen NPY aumentaría en las neuronas del núcleo ARC y su secreción sobre el NPV, aumentando con ello el apetito para intentar recuperar el peso corporal (Riley y cols, 2009). Este efecto se explicaría en base a cambios en la expresión de los genes que codifican los receptores hipotalámicos para leptina e insulina que están presentes en este tejido (Cowley y cols, 2001).

### 1.2.1.2 Proopiomelanocortina (POMC)

El neuropéptido anorexigénico POMC tiene una distribución limitada, con solo dos poblaciones neuronales descritas, en el núcleo arcuato y en el tracto solitario (Mountjoy y cols, 2010). Al igual que el NPY, la POMC se sintetiza en los cuerpos celulares del núcleo arcuato del hipotálamo y es transportado axonálmemente al núcleo paraventricular (Figura 2). (Ko y Takahashi, 2006; Sato y cols, 2010; Chee y cols, 2010).

Estudios realizados en hipotálamo de rata, demuestran cómo, una vez que la leptina se une a su receptor específico en estas neuronas, se produce la activación del gen que codifica para POMC, desencadenando la generación de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) y  $\beta$ -lipotrofina (Mountjoy y cols, 2010). La  $\beta$ -lipotrofina se transforma en  $\gamma$ -lipotrofina,  $\beta$ -endorfina y la hormona estimuladora de melanocitos beta ( $\beta$ -MSH); mientras que la ACTH se transforma en hormona estimuladora de melanocitos-alfa ( $\alpha$ -MSH).

Todos estos péptidos generados por el gen de la POMC, se ven involucrados en la regulación del apetito, actuando directamente en la vía anorexigénica (Kim y cols, 2000; Mountjoy y cols, 2010). La síntesis neuronal de estos péptidos aumenta en respuesta a las señales de incremento del grado de adiposidad que llegan al cerebro (Sánchez-Lasheras y cols, 2010). Los agonistas de la acción de la  $\alpha$ -MSH, suprimen la ingesta mientras que sus antagonistas sintéticos causan el efecto opuesto (Williams y cols, 2000; Valassi y cols, 2008; Sánchez-Lasheras y cols, 2010).

Las neuronas de la POMC poseen receptores de insulina y leptina (Schwartz y cols, 2000), que al unirse con sus respectivos ligandos, generan una respuesta anorexigénica (Figura 3).

**Tabla 1.** Otros neuropéptidos y receptores específicos involucrados en el control de la ingesta y el balance energético.

Neuropéptidos implicados en la regulación del apetito					
	Neuropéptido	Aminoácidos	Sintetizado	Función	Activación
Orexigénicos	<b>Péptido relacionado Agouti (Agr-P)</b>	132	Núcleo arcuato del hipotálamo (ARC)	Antagonista de los receptores de melanocortina (MC3 y MC4)  Produce hiperfagia, hiperglicemia, insulina-resistente. Concentraciones altas en obesos	Activado por POMC. Aumenta la activación neuronal AgrP/NPY, aumentando la expresión de mRNA también. Es Inhibido por la leptina. (Arora y cols, 2006; Hannibal y cols, 2006; Lopaschuk y cols, 2010)
	<b>Hormona Concentradora de Melanina (MCH)</b>	19	Zona del hipotálamo lateral	Precursor de prohormona concentradora de melanina (PMCH)	En ayuno, su expresión disminuye en presencia de leptina. (Jovanovic y cols, 2010; Kalra y cols, 2010)
	<b>Galanina</b>	29	Núcleo arcuato del hipotálamo (ARC)	Estimula la secreción de CHR y NPY  Aumenta la ingesta de lípidos.	En la disminución de la leptina y cuando hay alto contenido de grasas. (Arora y cols, 2006; Lopaschuk y cols, 2010)
	<b>Orexinas</b>	O-A 33 O-B28	Zona del hipotálamo lateral	Estimula la ingesta de comida, retardando las señales de saciedad	Inhibidas por la leptina (mediante receptores), activadas por la ghrelin y por la hipoglucemia. (Hannibal y cols, 2006; Kalra y cols, 2010)
Anorexigénicos	<b>Hormonas liberadoras de corticotropina (CRH)</b>	41	Neuronas del núcleo paraventricular (NPV)	Disminuye el apetito, Inhibiendo el control del apetito, disminuyendo el peso corporal.  Implicada en la anorexia asociada a insuficiencia adrenal  Descenso en la intensidad de la señal de CRH, incrementa la acción de los glucocorticoides, llevand a un aumento de peso, provocando obesidad.	Estimula la secreción de ACTH. Su expresión aumenta por acción de la leptina y la insulina. (Arora y cols, 2006; Sánchez-Lasheras y cols, 2010)
	<b>Transcriptasa relacionada con la cocaína-anfetamina (CART)</b>	No ha sido caracterizado	Núcleo arcuato del hipotálamo (ARC)	Control de la homeostasis de la ingesta, Supresor del apetito Contribuyendo a la regulación de la ingesta de nutrientes y al mantenimiento del peso corporal	Se ha observado un incremento de su síntesis neuronal en respuesta a un aumento de señales del adipocito en el cerebro principalmente en núcleo arcuato. (Arora y cols, 2006; Lopaschuk y cols, 2010)

### **1.2.1.3 Péptido-liberador de la prolactina (PrRP)**

El gen que codifica para el PrRP, identificado en 1998, se localiza principalmente en el bulbo raquídeo y en el hipotálamo (núcleos dorsomedial y paraventricular; implicados ambos en la regulación del apetito), donde además se expresan los receptores a través de los cuales el péptido ejerce sus efectos (Ibata y cols, 2000; Takayanagi y cols, 2008). Los efectos del PrRP son múltiples, entre los que destacan el aumento de la secreción de prolactina (Seal y cols, 2000; Samson y cols, 2000), gonadotropinas, testosterona (Seal y cols, 2000), ACTH y oxitocina (Samson y cols, 1998; Matsumoto y cols, 2000;).

El PrRP se ha relacionado con la regulación del apetito, siendo uno de los péptidos anorexigénicos descritos más recientemente (Lawrence y cols, 2002; Onaka y cols, 2010). Parece que sus efectos sobre el apetito están mediados por los cambios en los niveles circulantes de leptina (Ellacott y cols, 2002), así como también por su implicación en la regulación de algunos neuropéptidos anorexigénicos, como la  $\alpha$ -MSH y la neurotensina; ya que se ha demostrado que la administración de PrRP incrementa la síntesis y secreción de dichos neuropéptidos, provocando una disminución en la ingesta (Lawrence y cols 2000).

Estudios previos, muestran que la administración periférica de colecistoquinina (CCK) (hormona periférica que induce a la reducción de la ingesta alimenticia) provoca un aumento en la expresión de PrRP (Takayanagi y cols, 2008), por lo que se establece que el PrRP, se suma a la red de señales involucradas en la regulación del apetito con efecto anorexigénico, tanto a nivel central (Onaka y cols, 2010), como a nivel periférico (Lawrence y cols, 2002). Sin embargo, existen trabajos que muestran un efecto contrario del PrRP, donde se sugiere un posible efecto inhibitor sobre la secreción de CART, que es un péptido anorexigénico y por tanto aumentaría el apetito (Seal y cols, 2000; Lawrence y cols, 2002).

### **1.2.1.4 Receptor de leptina (LepR)**

El receptor de leptina (LepR) es una proteína de membrana homóloga al receptor de la familia de las citoquinas, identificado en 1995 por Tartaglia y

colaboradores. Tartaglia y cols, mostraron la existencia de este receptor en los plexos coroideos de ratón (Tartaglia y cols, 1997).

Se ha demostrado que las formas largas del receptor, predominan en el hipotálamo, mientras que las formas cortas se encuentran mayoritariamente en tejidos periféricos (Leshan y cols, 2006). Estos últimos se relacionan con el transporte de la leptina, así como también, con la regulación del sistema inmune (Tartaglia y cols, 1997).

A nivel central, el LepR, se encuentra en los plexos coroideos, hipocampo, cerebelo, corteza cerebral (Myers y cols, 2009; Ring y Zeltser, 2010), y en regiones hipotalámicas, tales como el núcleo arcuato (Leininger y cols, 2009), en el núcleo paraventricular y ventromedial, (Leshan y cols, 2006; Myers y cols, 2009; Ring y Zeltser, 2010). En cuanto a los tejidos periféricos se encuentra en páncreas (Tudurí y cols, 2009), corteza adrenal (Malendowicz y cols, 2007), tejido adiposo y tracto gastrointestinal (Anubhuti y cols, 2008), entre otros.

Mutaciones específicas en el gen del receptor de leptina se asocian con obesidad ya que codificarían un receptor mutado que aunque uniese la hormona (dependiendo de la mutación) no se produciría la señal intracelular (Mammes y cols, 2001). Sin embargo, hay que señalar la existencia de datos discordantes que muestran efectos opuestos (Yiannakouris y cols, 2001; Wauters y cols, 2001).

#### **1.2.1.5 Receptor de Insulina (IR) y los sustratos del receptor de insulina (IRS-1 e IRS-2)**

El receptor de insulina es una proteína alostérica que posee 2 subunidades alfa que se encargan de ejercer un efecto regulador de la actividad enzimática de este receptor y 2 subunidades beta que conforman la actividad enzimática del mismo (Thirone y cols, 2006). Los receptores de insulina se encuentran expresados ampliamente, en neuronas de áreas hipotalámicas involucradas en la regulación del control y balance de la ingesta (Porte y cols, 2005). La unión de la insulina a sus receptores, reduce la ingesta y el peso corporal provocando un efecto anorexigénico (Porte y cols, 2005). Así como la leptina, la insulina, ha demostrado afectar a la expresión de otros

neuropéptidos reguladores de la homeostasis energética en el hipotálamo (Valassi y cols, 2008).

La insulina inicia una serie de efectos metabólicos al unirse a sus receptores y activar a la tirosina quinasa intrínseca. Este hecho lleva a la fosforilación de una variedad de proteínas de acoplamiento que incluyen al sustrato del receptor de insulina (IRS) (Porte y cols, 2005; Plum y cols, 2006). Las proteínas IRS fosforiladas ejercen su función como proteínas de acoplamiento para varias moléculas efectoras. La activación de estas últimas, inicia cascadas de señalización que conducen a la activación de múltiples efectores, transmitiendo así, la señal de insulina a una serie de vías intracelulares que regulan la diferenciación celular, el crecimiento, el ciclo vital y el metabolismo energético (Plum y cols, 2006).

Debido a su papel en la señalización de la insulina, los IRS-1 y 2, han sido considerados péptidos primarios involucrados en el inicio y desarrollo de trastornos metabólicos, como la diabetes tipo 2 y la obesidad (Capeau y cols, 2005).

Estudios realizados en ratones transgénicos, han demostrado que muchas de las respuestas a la insulina, especialmente las que se encuentran asociadas al metabolismo energético y al crecimiento, son mediadas por IRS-1 e IRS-2 (Kido y cols, 2000). Concretamente, IRS-1 parece mediar principalmente los efectos tróficos de la insulina, mientras que IRS-2 está más involucrado con los efectos metabólicos de la hormona. En ratones con depleción de IRS-2 en células beta del páncreas y en áreas cerebrales que incluyen el hipotálamo, incrementa el apetito (Choudhury y cols, 2005). Cuando se disminuye la expresión de IRS-1, los individuos presentan un riesgo alto de desarrollar diabetes tipo 2 (Capeau y cols, 2005; Choi y cols, 2010).

### **1.2.2 Regulación periférica del apetito**

Los metabolitos procedentes de carbohidratos, proteínas y grasas pueden actuar modulando la ingesta alimentaria. La glucosa, es el metabolito energético más importante en el SNC.

Parece evidente asumir que puede actuar directamente a través de receptores específicos por diferentes mecanismos como los niveles de insulinemia o el tamaño de las reservas de glucógeno (teoría glucostática)

(Chaput y cols, 2009). Igualmente, existen receptores en el SNC regulados por los niveles circulantes de metabolitos procedentes de la grasa como los ácidos grasos, glicerol y 3-hidroxiacetil-CoA (teoría lipostática) (Salinas y cols, 2005). Históricamente, el control de la ingesta a corto plazo ha sido basado en la teoría glucostática, mientras que la teoría lipostática estaría implicada en el control de peso a largo plazo (Jiménez y cols, 2001). Sin embargo, diversos estudios realizados, han descrito un número elevado de hormonas metabólicas, implicadas en el control del balance energético (Tabla 2). Dichas hormonas actúan a nivel central, provocando efectos en la vía orexigénica o anorexigénica, según su procedencia.

En el presente trabajo, se estudiaron las hormonas insulina, leptina y adiponectina. A continuación se describe con detalle sus funciones en la regulación de la ingesta y el balance energético.

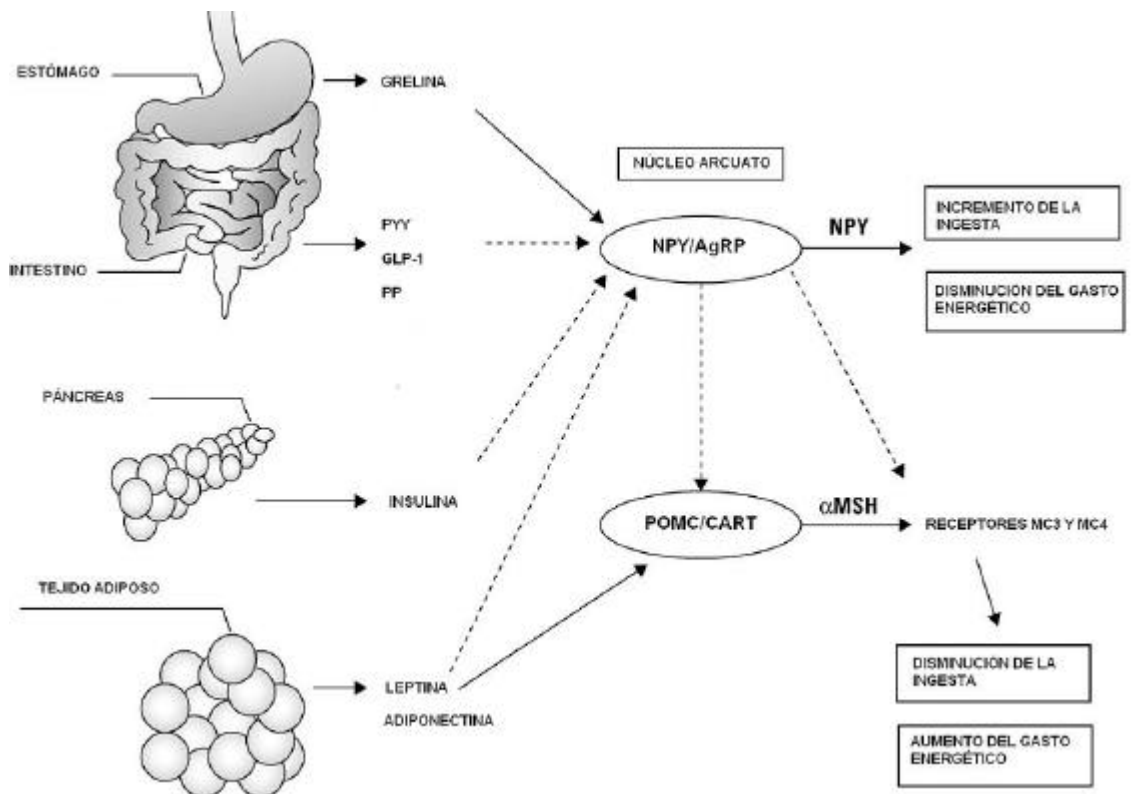
### 1.2.2.1 Insulina

La insulina es una hormona sintetizada y secretada por el páncreas y es transportada al cerebro por el sistema cardiovascular donde activa las vías neuronales anorexigénicas, provocando una reducción en la ingesta de alimentos. Tanto los niveles plasmáticos de la insulina como los de la leptina pasan al sistema nervioso central, en proporción a sus niveles plasmáticos. Los receptores de la insulina, se expresan en neuronas de primer orden (NPY/AgRP y POMC/CART) de áreas cerebrales involucradas en la regulación y el control de la ingesta y del balance energético del organismo (Figura 4). La administración de esta hormona en ratas, provoca un efecto anorexigénico, reduciendo la ingesta de alimentos, mientras que la deficiencia de dicha hormona, produce el efecto contrario (Sánchez-Lasheras y cols, 2009).

### 1.2.2.2 Leptina

Esta hormona es sintetizada y secretada por el adipocito en proporción al contenido de grasa corporal, así como la expresión de mRNA es proporcional al volumen del adipocito. La leptina, al igual que la insulina, al unirse a su receptor a nivel hipotalámico, activa neuronas hipotalámicas provocando un efecto anorexigénico, reduciendo la ingesta de comida e

incrementando el gasto de energía (Figura 4). Esto lleva como resultado a la reducción de tejido graso, así como a una normalización del depósito de glucosa sensible a insulina. Estudios hechos en ratas diabéticas indican que la deficiencia de leptina produce hiperfagia, siendo uno de los factores claves a nivel periférico en la inducción de obesidad (Suzuki y cols, 2010). La leptina influye en múltiples sistemas neuroendocrinos a través de un receptor (LepR), que activa una respuesta en cascada de JAK-STAT, afectando tanto a la síntesis de péptidos anorexigénicos, como de orexigénicos (Jovanovic y cols, 2010). La leptina contribuye a la homeostasis energética, en parte por disminución del mRNA del NPY, ya que la unión a su receptor en estas neuronas, bloquea la vía orexigénica, provocando así una inhibición del apetito (Kalra y cols, 2010). Estudios recientes muestran que la leptina actúa también a través de otros mecanismos independientes del NPY (Kalra y cols, 2008; Hill y cols, 2010).



**Figura 4.** Se muestran los principales órganos involucrados en la regulación de la ingesta alimenticia, las líneas continuas indican la activación de las vías orexigénicas, mientras que las

líneas discontinuas, muestran la activación de las vías anorexigénicas, Figura modificada de Arora 2008.

### 1.2.2.3 Adiponectina

Hormona sintetizada y secretada a la circulación por los adipocitos (Duvnjak y cols, 2009; Matsuzawa y cols, 2010). Sus funciones principales son: estimular la oxidación de ácidos grasos, disminuir los niveles plasmáticos de triglicéridos (Sumarac-Dumanovic y cols, 2009) y mejorar el metabolismo de la glucosa al aumentar la sensibilidad a la insulina (Matsuzawa y cols, 2010; Fischer y cols, 2010). La adiponectina también está involucrada en el control del balance energético, siendo una señal de adiposidad, al igual que la leptina. Estudios realizados en ratas, muestran que receptores específicos, se expresan en neuronas de NPY y POMC, en el núcleo arcuato (Guillod-Maximin y cols, 2009). La adiponectina, se une a través de dichos receptores, a la red del sistema neuronal en el hipotálamo (Yamauchi y cols, 2003, 2007), influyendo en el balance del control de la ingesta (Figura 4) (Guillod-Maximin y cols, 2009). El tratamiento con adiponectina, a nivel central, en hipotálamo de rata, induce la activación de la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico (AMPK) (Fischer y cols, 2010). Estudios realizados por el grupo de Guillod-Maximin, refuerzan también el papel que desempeña la hormona en el control de la ingesta y el balance energético.

Tabla 2. Principales hormonas, involucradas en el control de la ingesta.

Hormonas involucrada en la regulación del apetito					
	Péptido	Aminoácidos	Sintetizado	Función	Activación
Orexigénicos	Grelina	28	Secretado por las células oxínticas del estómago, y en menos proporción por intestino, páncreas, riñón, placenta.	Efecto en el SNC . Regulación de la hormona adenocorticotropa (ACTH) y prolactina. Regulación de metabolismo lipídico, glucosa, secreción ácida y motilidad gástrica. Regulación de la función cardíaca y reproducción.	Se incrementan los niveles en el ayuno. Aumenta el apetito y la ingestión de alimentos. (Schwartz y cols, 2009; Sumarac-Dumanovic y cols, 2009)
	Péptido YY (PYY)	36	Porción distal del tracto digestivo, en las células L del intestino.	Inhibe la liberación del NPY Estimula producción de fragmento del POMC. Posee afinidad por los receptores AGRP. Reduce el hambre y el consumo de alimentos. Involucrado en el control glucémico.	Activado principalmente por la ingesta de grasas . PYY suprime la producción de grelina (Valassi y cols, 2007; Blevins y cols, 2009).
	Colecistokinina (CCK)	Variable (4-8)	Tracto gastrointestinal	Se presenta en múltiples formas activas. Inhibe el vaciado gástrico. Posee un papel importante en el control del tamaño de la ingesta.	Activado principalmente por la ingesta de grasas. (Sumarac-Dumanovic y cols, 2010)
Anorexigénicos	Péptido similar al glucagón (GLP-1)	Variable (36-37)	Células L del intestino	Aumenta la secreción de insulina y suprime la secreción del glucagón Incrementa la masa de las células beta y la expresión del gen de la insulina Suprime la ingesta de alimento	Aumenta la ingesta de alimentos (carbohidratos, proteínas y lípidos) (Valassi y cols, 2007; Schwartz y cols, 2009; )

### 1.3 Obesidad

#### 1.3.1 Aspectos generales

La obesidad es una patología de creciente importancia, dado que se ha convertido en epidemia de nuestro tiempo y por tanto, en un problema sanitario de primera magnitud. Según estimaciones actuales, en un futuro inmediato más de un 30% de la población total de los países desarrollados serán obesos (Young y cols, 2010). La OMS calcula que en 2015 habrá aproximadamente

2300 millones de adultos con sobrepeso y más de 700 millones con obesidad (OMS, 2009), por lo que en estos momentos la obesidad, es considerada como el problema principal relacionado con alteraciones en la alimentación, desplazando a la anorexia nerviosa y a la bulimia (Salihu y cols, 2009).

La obesidad es definida como el almacenamiento de energía en forma de grasa en el tejido adiposo, que no guarda una proporción con el depósito proteico ni de carbohidratos siendo el resultado de un desequilibrio entre la ingesta y el gasto energético (Hajer y cols, 2008), La obesidad, es una enfermedad multifactorial, en la que se producen alteraciones en una gran variedad de hormonas metabólicas y neuropéptidos centrales implicados en la regulación de la ingesta y en el balance energético (Kalra y cols, 2010).

La obesidad se explica, al menos en parte, por cambios en la ingesta de alimentos o por un descenso en el gasto energético (Lopaschuk y cols, 2010), así como también, se ha relacionado con un gran número de patologías, tales como dislipidemia, diabetes de tipo 2, resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia, hipertensión, enfermedades cardiovasculares, cálculos biliares, colecistitis, gota, osteoartritis, apnea obstructiva del sueño y otros problemas respiratorios, así como con algunos tipos de cáncer (Arora y cols, 2006; Agrawal y cols, 2010; Park y cols, 2010).

### 1.3.2 Modelos animales de obesidad

Actualmente, existen diversos modelos experimentales para el desarrollo de obesidad en animales de experimentación, principalmente mediante modificación genética o por administración de dietas modificadas. El ratón Agouti (A<sup>vy/a</sup>) es el modelo de obesidad de tipo genético más descrito (Dolinoy y cols, 2008). En este modelo genético de obesidad, los animales son portadores del alelo obeso 1 (A<sup>VY</sup>) con insuficiencia en la mutilación del alelo A<sup>vy</sup>, con el consiguiente desarrollo de obesidad derivada por el bloqueo de las señales de saciedad moduladas por la insulina y leptina a nivel hipotalámico.

El segundo modelo de obesidad genético más descrito, es el de la rata Zucker (fa/fa) o ZDF (Zucker Diabetic Fatty Rat), aludiendo a su característico fenotipo obeso, fue publicada por el grupo de Zucker en 1961 (Zucker y cols, 1961). Se caracteriza por la presencia de una mutación "fatty" (fa), tal que los

animales homocigotos para el alelo *fa* (receptor de la leptina que no desempeña su función), son obesos desde edades tempranas de vida (semanas 3 y 5 de vida). Para la semana 14, su composición corporal consta de más de un 40% de lípidos (Zucker y cols, 1961).

Sin embargo, a la hora de decidir el modelo a utilizar por este experimento en particular, nos hemos decantado por el uso de una dieta modificada, concretamente hemos administrado una dieta hipergrasa (35% de contenido en grasa), que supone un elevado porcentaje de ingesta de lípidos, frente al resto de macronutrientes. Consideramos que este modelo de desarrollo de obesidad, ya descrito anteriormente por el grupo (Cano y cols, 2008), se ajusta más a la realidad del desarrollo de obesidad en nuestra sociedad, como es el consumo excesivo de grasas frente a otros macronutrientes, obviando algunos de los inconvenientes generados por el consumo de una dieta de cafetería.

### 1.4 Ritmos biológicos

Los ritmos biológicos se definen como la repetición de eventos y/o fenómenos a intervalos regulares o períodos de tiempo (Cermakian y cols, 2009). Esta periodicidad o ritmicidad biológica está asociada a las variaciones ambientales periódicas sobre la tierra, conocidas como ciclos geofísicos (García Fernández y cols, 1998; Cardinali y Cols, 2007). Los cambios anuales o estacionales y la duración del día, son consecuencia de la traslación de la tierra respecto al plano de la órbita (Cardinali y Cols, 2007; Haffen, 2009). Todos los organismos vivos presentan una conducta rítmica en sus funciones fisiológicas y bioquímicas. Esta ritmicidad puede adoptar diferentes periodos o ritmos, dependiendo del cambio ambiental al que se ajuste.

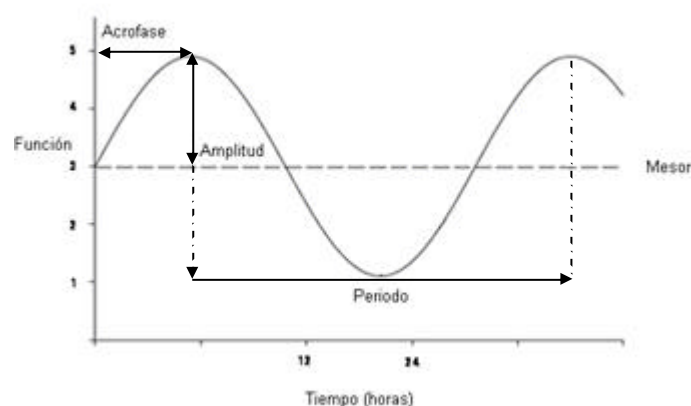
#### 1.4.1 Ritmo circadiano

Son oscilaciones de las variables biológicas a intervalos regulares de tiempo, que se repiten cada 24 horas (Halberg, 1995) Estas oscilaciones diarias de procesos biológicos están reguladas, tanto por el reloj endógeno o marcapasos central, situado en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo (NSQ), como por osciladores secundarios en los tejidos periféricos. (Schulz y

cols, 2009). Los genes del reloj y las proteínas producidas por dichos genes, constituyen los componentes moleculares del oscilador endógeno que, por retroalimentación positiva o negativa generan esos ritmos. En el mecanismo circadiano, están incluidos la retina, la glándula pineal (que es un oscilador diario, productor de melatonina) y el núcleo supraquiasmático (NSQ), que se localiza en el hipotálamo anterior (Schibler 2007; Schulz y cols, 2009).

Los componentes del ritmo circadiano se analizan mediante una función sinusoidal, se detallan en la figura 5 (Cardinali and cols, 1998; García Fernández y cols 1998):

- *Periodo*, es el intervalo de tiempo entre dos puntos iguales del ritmo, es decir, la duración de un ciclo completo.
- *Valor medio o mesor*, es la media aritmética de todos los valores obtenidos dentro de un ciclo. Valor alrededor del que oscila la variable.
- *Amplitud*, es la diferencia entre el valor máximo y el valor medio de una oscilación, durante el periodo.
- *La fase*, es el valor de una variable en un momento dado. Para caracterizar la fase normalmente se determina la acrofase o el momento en el que la variable alcanza el valor máximo, describiendo la relación entre dos o más ritmos. La representación de las acrofases del ritmo se denomina mapa de fases e indica la relación temporal entre los distintos procesos fisiológicos, apareciendo con una secuencia característica dentro de un ciclo.



**Figura 5.** Parámetros que definen un ritmo. La duración del ciclo completo (periodo) es aproximadamente de 24 h. La amplitud, una medida del grado de variación dentro de un ciclo,

es la diferencia entre el valor máximo y el valor medio, o mesor. Modificada de Daniel P. Cardinali y cols, 1998.

### 1.4.2 Fisiología del ritmo circadiano

El núcleo supraquiasmático en el hipotálamo es el encargado de regular los mecanismos rítmicos que regulan los procesos fisiológicos (Yan y cols, 2009; Dibner y cols, 2010). Este núcleo posee redes múltiples con el resto del sistema nervioso central. Gracias a esta comunicación neuronal, el núcleo supraquiasmático ejerce la función sincronizadora del organismo (Liu y cols, 2007). Los niveles circulantes de las hormonas cronobióticas y metabólicas llegan al núcleo supraquiasmático por vía sanguínea y ello le permite reaccionar espontáneamente a dichos cambios hormonales por lo que se establece un mecanismo de retroalimentación de doble vía (Figura 6). Además, el núcleo supraquiasmático reacciona a los cambios medioambientales ajustando las variaciones hormonales, que modulan el mecanismo de homeostasis (Dibner y cols, 2010).

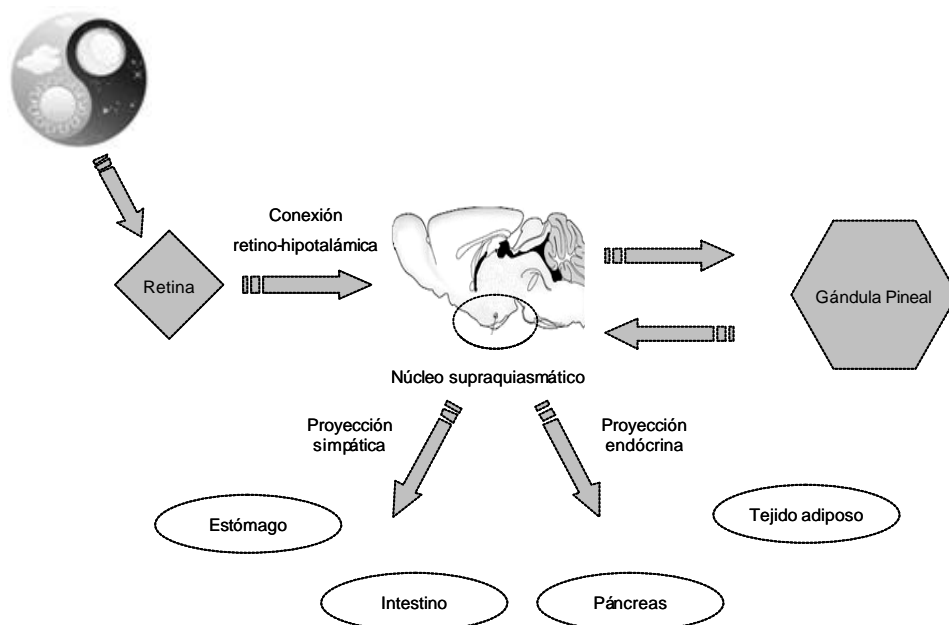


Figura 6. Se muestran los principales componentes del ciclo circadiano.

Estos mecanismos homeostáticos, se llevan a cabo cuando el hipotálamo recibe aferencias desde la retina, que es el órgano que transforma la luz solar

en señales neuroquímicas mediante células fotosensibles (Berson y cols, 2007). El impulso generado, es transmitido a través del nervio óptico hasta el núcleo supraquiasmático a través del tracto retino-hipotalámico. Al recibir el estímulo, las células del núcleo supraquiasmático expresan ciertas proteínas de membrana de forma transitoria. Esto afecta el umbral eléctrico de activación neuronal, favoreciendo así, una máxima frecuencia de descarga al mediodía, con una disminución a medianoche (Schulz y cols, 2009). Esta información, junto con las aferencias que parten desde otros centros nerviosos, como los núcleos del Raffe y la lámina intergeniculada del tálamo (información no fótica) es integrada en el NSQ, del que parten señales hacia otras regiones cerebrales y órganos periféricos para modular otros ritmos circadianos.

Otras señales como la temperatura o la intensidad de los campos magnéticos que operan en el lugar que viven los organismos de estudio, también modulan la actividad del núcleo supraquiasmático (Korkmaz y cols, 2009; Bonnefont y cols, 2010). Recientemente se ha demostrado que los horarios y la cantidad y calidad de la comida ingerida, también forman parte de las señales externas que modifican la actividad del NSQ (Martínez-Soriano y cols, 2002; Webb y cols, 2009; Verwey y cols, 2009; Escobar y cols, 2009).

### 1.4.3 Regulación circadiana del metabolismo

Varios procesos metabólicos importantes, tales como el comportamiento alimenticio y el metabolismo de lípidos, muestran un patrón circadiano (Kaasiky y cols, 2004; Chacón y cols, 2005; van der Steen y cols, 2006; Bechtold y cols, 2008; Cano y cols, 2009; Ríos-Lugo, 2010). Ello se basa en el comportamiento rítmico de algunos genes involucrados en la lipogénesis, el catabolismo de lípidos y la gluconeogénesis (Schibler y cols, 2007; Lopaschuk y cols, 2010). Los mecanismos reguladores de los ritmos del reloj endógeno se ven afectados directamente por las señales periféricas reguladoras del metabolismo energético procedentes del tejido graso, estómago y/o páncreas, debido a la modificación en los patrones alimenticios (Arora y cols, 2006; Bechtold, 2008). De hecho, se han relacionado genes del reloj como el Rev-erb o el Rora, con la lipogénesis, el catabolismo de lípidos y/o la gluconeogénesis, así como con la secreción de leptina e insulina (Duez y cols, 2008).

Cambios en los patrones alimenticios, producen alteraciones en la secreción de neuropéptidos centrales, implicados en la regulación de la ingesta de alimentos (neuropéptidos NPY, AgRP, POMC y CART) (Arora y cols, 2006; Valassi y cols, 2008; Neary y cols, 2009). Estudios realizados en ratones mutantes con depleción de uno de los genes del reloj (CLOCK), a los que se les suministró una dieta hipergrasa, presentaron hiperfagia, hiperlipidemia, hiperglucemia y obesidad. Características asociadas al síndrome metabólico (Turek y cols, 2005; Challet y cols, 2009).

De este manera, la implicación del reloj biológico en el metabolismo energético y el control del apetito, demuestra que la alteración de los mecanismos temporales dependientes del reloj central y de los relojes periféricos, ejercen un papel fundamental en el desencadenante de enfermedades como la obesidad (Kaneko y cols, 2009). Por lo tanto, la reparación o la compensación del mecanismo de homeostasis en los ritmos circadianos, podría desempeñar un papel importante en el desarrollo de terapias (Xie y cols, 2009), que prevengan la evolución de la obesidad a estadios tan graves que requieran cirugía o que muestren enfermedades asociadas importantes.

En nuestro laboratorio se ha desarrollado un modelo experimental de obesidad, en ratas macho adultas de la cepa Wistar mediante la administración, durante 11 semanas, de una dieta comercial con un 35% de grasa, que proporciona un componente energético mayoritario en lípidos. Ello, produce en estos animales, una alteración marcada en los mecanismos secretores circadianos de hormonas hipofisarias como la prolactina, LH y TSH (Cano y cols, 2008). Mas aún, se observó una alteración en la expresión del gen de prolactina en animales obesos (Cano y cols, 2010), que sería responsable en parte, de los efectos mostrados por esta hormona sobre el metabolismo de los lípidos, ya que la hiperprolactinemia, se asocia con el sobrepeso (Esquifino y cols, 1997). Estos resultados indican que los mecanismos temporales circadianos alterados a nivel del eje hipotálamo-hipofisario (NPY) o tejido adiposo (leptina y adiponectina) forman parte del mecanismo de instauración de la obesidad.

#### **1.4.4 Melatonina**

La melatonina, es una hormona secretada principalmente por la glándula pineal que regula el reloj endógeno (Reiter y cols, 2010). No se almacena en el lugar de síntesis y se secreta directamente tanto al líquido cefalorraquídeo, como al sistema cardiovascular (Ganguly y cols, 2002; Reiter y cols, 2010). Se sintetiza, siguiendo un patrón circadiano con niveles circulantes más elevados durante la fase oscura del fotoperiodo y mínimos durante la fase luminosa (Vandewalle y cols, 2009), de tal forma que mantiene informado al individuo de las variaciones luz/oscuridad (Challet y cols, 2007; Vandewalle y cols, 2009). Además del ritmo diario secretor de esta hormona, aparecen cambios estacionales y circa-anales que la implican como un factor central en la regulación de los procesos rítmicos (Verwey y cols, 2009).

La síntesis de melatonina no es exclusiva de la glándula pineal, y es también producida por las células de la retina, cuerpo ciliar, cerebro, médula ósea, placenta, testículos, ovarios y piel entre otros. Sin embargo, la producción extrapineal de la misma tiene una acción exclusivamente local.

La melatonina se secreta al torrente sanguíneo y actúa sobre receptores MT1 y MT2 en diversos tejidos, lo que permite transmitir ritmicidad a estructuras que se encuentran fuera de la barrera hematoencefálica (Jockers y cols, 2008). De hecho, la melatonina modula los ritmos circadianos en vertebrados inferiores y en mamíferos (Ko y cols, 2006; Reid y cols, 2009; Dibner y cols, 2010; Mor y cols, 2010) a través de sus efectos sobre el reloj circadiano central y a su mantenimiento en condiciones ambientales constantes (Dibner y cols, 2010). Además, el ritmo anual de melatonina parece jugar un papel determinante en el ajuste estacional de la reproducción, así como también en la conducta, y peso corporal de algunos mamíferos (Turek y cols, 2005; Korkmaz y cols, 2009; Kaneko y cols, 2009). Esta hormona produce el desencadenamiento de la capacidad reproductora y la maduración gonadal, produciendo efectos endocrinos, en el control del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (Hannibal y cols, 2006; Tsutsui y cols, 2010).

Es importante destacar, que esta hormona se distribuye ampliamente, mostrando una mayor afinidad por la propia pineal y por el hipotálamo, así como por ciertos órganos endocrinos (ovarios, testículos, corteza adrenal,

tiroides, etc). Su vida media varía según los autores entre 20-40 minutos (Boutin y cols, 2005), lo que indica que es una hormona de acción rápida.

Aunque el hipotálamo es probablemente el lugar primario donde la melatonina ejerce su función cronobiótica en el reloj endógeno central (Bonfont y cols, 2010) y en la actividad del sistema endocrinológico (Reiter y cols, 2010), esta hormona también puede actuar periféricamente ejerciendo funciones específicas (Tsutsui y cols, 2009; Revel y cols, 2009).

Algunos de los efectos más importantes que se conocen de la melatonina son:

- a) Transductor neuroendocrino: integra señales neuronales procedentes de la retina, dependientes de la duración e intensidad de la iluminación ambiental y en respuesta sintetiza y libera al torrente circulatorio señales hormonales para la sincronización de numerosos ritmos circadianos (Reiter y cols, 2009).
- b) Efecto neuroprotector. Las acciones antioxidantes de la melatonina se observan en diversos niveles, incluida la atenuación de la formación de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno por efectos antiexcitatorios y antiinflamatorios. Esto no se restringe a la capacidad del barrido de radicales libres de la melatonina, sino que existen efectos de promoción de la actividad de enzimas antioxidantes y de disminución de la actividad de enzimas prooxidantes (Korkmaz y cols, 2009; Jiménez-Ortega y cols, 2009). Ello ha permitido el desarrollo de estudios que muestran el efecto protector de la melatonina en situaciones patofisiológicas, como la exposición a metales pesados (Lahiri y cols, 2004; Poliandri y cols, 2006; Radogna y cols, 2009), obesidad (Ríos-Lugo y cols, 2010), hiperglucemia y diabetes (Sartori y cols, 2009).
- c) Efecto antiinflamatorio. La melatonina mejora la inflamación bloqueando los factores transcripcionales e inhibiendo la activación transcripcional de citoquinas proinflamatorias como pueden ser TNF-alfa y la interleuquina IL-1 y también las enzimas inflamatorias COX-2 e iNOS (Rodríguez y cols, 2007; Chahbouni y cols, 2010). Se ha demostrado un efecto antiestrés marcado (Khan y cols, 1990; Reiter y cols, 2009), ya

que normaliza la respuesta inmunológica y opioide, alteradas en la obesidad (Maestroni y cols, 1988; Cardinali y cols, 2008; Kalpakcioglu y cols, 2009; Chahbouni y cols, 2010).

La obesidad es un problema multipotencial en el que intervienen mecanismos de estrés oxidativo y alteraciones cronobiológicas, como mencionábamos con anterioridad (Korkmaz y cols, 2009; Escobar y cols, 2009; Verwey y cols, 2009), por lo que los efectos descritos para la melatonina sugieren su posible utilidad en los tratamientos de obesidad.



## ***CAPÍTULO 2. OBJETIVOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL***



### Generalidades

Entre los modelos experimentales desarrollados recientemente para el estudio de la obesidad, que se describen en la introducción, el grupo ha elegido inducirla mediante la administración de una dieta comercial hipergrasa (dieta estándar con 35% de grasa) ya que de esta forma se asegura que la dieta ingerida contenía siempre el mismo porcentaje tanto de contenido en carbohidratos, proteínas y micronutrientes, valores que con una dieta de cafetería pueden variar mucho dependiendo del menú (Brandt y cols, 2010). La mayor parte de la información de que se dispone, en los modelos de obesidad descritos, es puntual, y por lo tanto, la información es incompleta, puesto que, los parámetros implicados en la regulación de la ingesta siguen patrones específicos de secreción y/o concentración circadiana (Cano y cols, 2009), como son la leptina, grelina, insulina, glucosa, etc. (Cano y cols, 2008; 2009).

Hasta la fecha no existen tratamientos que resuelvan este problema. Se están empleando, con cierto éxito, cirugías de alto riesgo (reducción de estómago, derivación biliopancreática...etc). Sin embargo, el análisis post cirugía de un grupo elevado de pacientes, indica que entre el 15% y el 20% de ellos vuelven a engordar, por lo que se hace imprescindible encontrar los mecanismos implicados en el desarrollo y mantenimiento de la obesidad, que permitan desarrollar terapias alternativas.

Trabajos previos del grupo, anteriormente mencionados, demostraron que los ritmos circadianos de los parámetros analizados, que incluyen hormonas hipofisarias y hormonas metabólicas (Cano y cols, 2008; Cano y cols, 2009) están modificados, indicando la existencia de alteraciones en los mecanismos temporales del individuo. En este sentido, el grupo ha mostrado que la concentración de melatonina en la pineal de animales obesos está marcadamente reducida con respecto a los valores obtenidos en animales control (Cano y cols, 2009). Esta disminución en la amplitud del ritmo podría estar relacionada con una menor capacidad discriminativa de las dos fases del fotoperiodo como ocurre en animales envejecidos (Esquifino y cols, 2007). Teniendo en cuenta que la melatonina está involucrada en el mecanismo de información de las variaciones temporales externas e internas que llegan al reloj endógeno, es de crucial importancia que se normalicen los niveles

circulantes de melatonina, y alcancen valores similares a los del grupo control. Por ello, la administración de melatonina en los animales obesos podría mejorar el ajuste temporal de sus funciones fisiológicas y por tanto prevenir y/o revertir las alteraciones del mecanismo cronobiológico que modula el metabolismo, que se observan en estados de obesidad. Ello redundaría en una mejora de la calidad de vida de estos individuos.

### 2.1 Objetivo global

El objetivo global de este trabajo es analizar si la melatonina previene los cambios cronobiológicos en los ritmos de hormonas metabólicas y en el mecanismo regulador de la ingesta, a nivel del hipotálamo medio basal, de ratas adultas alimentadas con una dieta hipergrasa, tratadas en paralelo con la hormona pineal.

### 2.2 Objetivos específicos

El objetivo global puede desglosarse en los objetivos específicos siguientes:

- a) Analizar si la administración de 25 microgramos/mL de melatonina (en el agua de bebida, durante nueve semanas) a ratas macho adultas, alimentadas con una dieta de mantenimiento estándar, podría modificar los ritmos circadianos de las hormonas metabólicas y el mecanismo regulador de la ingesta a nivel del hipotálamo medio basal.
- b) Estudiar si la administración de 25 microgramos/mL de melatonina (en el agua de bebida durante once semanas) a ratas macho adultas, alimentadas con una dieta hipergrasa, podría normalizar los ritmos circadianos de las hormonas metabólicas y el mecanismo regulador de la ingesta a nivel del hipotálamo medio basal previamente alterados por la dieta hipergrasa.

Para la consecución de estos objetivos se desarrollan los diseños experimentales que se describen a continuación:

**2.2.1 Bloque I: Efecto de un tratamiento con melatonina, durante 9 semanas, sobre el peso corporal, ingesta, concentración plasmática de parámetros metabólicos y expresión génica relativa de neuropéptidos hipotalámicos, implicados en el control de la ingesta, en ratas adultas alimentadas con una dieta de mantenimiento estándar.**

### ***Objetivos***

Analizar el peso corporal y la ingesta en ratas macho adultas alimentadas con una dieta de mantenimiento estándar tratadas o no con 25 microgramos/mL de melatonina en el agua de bebida durante 9 semanas.

Estudiar las variaciones diarias de la concentración sanguínea de glucosa en ratas macho adultas alimentadas con una dieta de mantenimiento estándar tratadas o no con 25 microgramos/mL de melatonina en el agua de bebida, durante 9 semanas.

Estudiar los niveles plasmáticos de colesterol, triglicéridos y proteínas, en ratas macho adultas alimentadas con una dieta de mantenimiento estándar tratadas o no con 25 microgramos/mL de melatonina en el agua de bebida, durante 9 semanas.

Estudiar los niveles plasmáticos de insulina, leptina y adiponectina, en ratas macho adultas alimentadas con una dieta de mantenimiento estándar tratadas o no con 25 microgramos/mL de melatonina en el agua de bebida, durante 9 semanas.

Analizar la expresión génica relativa en función del tiempo de los neuromoduladores POMC, NPY, receptor de leptina, IR, IRS-1, IRS-2, en el hipotálamo medio basal en ratas macho adultas alimentadas con una dieta de mantenimiento estándar tratadas o no con 25 microgramos/mL de melatonina en el agua de bebida, durante 9 semanas.

### ***Diseño experimental***

El estudio se ha realizado en ratas macho de la cepa Wistar, a las que se les suministra una dieta de mantenimiento estándar tratadas o no con melatonina (25µg/mL) en el agua de bebida.

Nueve semanas después, ocho animales por horario y grupo se sacrificaron por decapitación en intervalos de 4 horas durante un ciclo de 24 horas, empezando a las 09:00 h (09:00, 13:00, 17:00, 21:00, 01:00 y 05:00 horas).

Inmediatamente después de su sacrificio se analiza el contenido de glucosa en sangre, se recoge la cabeza sobre hielo seco e inmediatamente después se extrae el hipotálamo mediobasal que se mantiene en RNA later y se almacena a -80°C hasta su análisis posterior. Además, se recoge plasma de la sangre troncular después de centrifugar la sangre a 3.000 rpm, durante 15 min y se almacena a -20°C, hasta su análisis.

En el hipotálamo mediobasal se analizará la expresión génica de los neuropéptidos POMC y NPY, y de los receptores de leptina, e insulina mediante PCR cuantitativa a tiempo real. Asimismo, se analizará la expresión de los sustratos para el receptor de insulina el IRS-1 y el IRS-2 mediante PCR cuantitativa a tiempo real.

En los plasmas se determinará los niveles plasmáticos de colesterol, triglicéridos, proteínas, insulina, leptina y adiponectina mediante las técnicas descritas en materiales y métodos.

Se analizarán los resultados utilizando los tests estadísticos descritos en materiales y métodos.

### **2.2.2 Bloque II: Efecto de un tratamiento con melatonina, durante 11 semanas, sobre el peso corporal, ingesta, concentración plasmática de parámetros metabólicos y expresión génica relativa de neuropéptidos hipotalámicos, implicados en el control de la ingesta, en ratas adultas alimentadas con una dieta hipergrasa.**

#### **Objetivos**

Analizar el peso corporal y la ingesta en ratas macho adultas alimentadas con una dieta hipergrasa, tratadas o no con 25 microgramos/mL de melatonina en el agua de bebida durante 11 semanas, comparados con el grupo control, alimentado con la dieta estándar de mantenimiento.

Estudiar las variaciones diarias de la concentración sanguínea de glucosa en ratas macho adultas alimentadas con una dieta hipergrasa, tratadas o no con 25 microgramos/mL de melatonina en el agua de bebida, durante 11 semanas comparados con el grupo control, alimentado con la dieta estándar de mantenimiento.

Estudiar los niveles circulantes de colesterol, triglicéridos y proteínas, en ratas macho adultas alimentadas con una dieta hipergrasa, tratadas o no con 25 microgramos/mL de melatonina en el agua de bebida, durante 11 semanas, comparados con el grupo control, alimentado con la dieta estándar de mantenimiento.

Estudiar los niveles circulantes de insulina, leptina y adiponectina, en ratas macho adultas alimentadas con una dieta hipergrasa, tratadas o no con 25 microgramos/mL de melatonina en el agua de bebida, durante 11 semanas, comparados con el grupo control, alimentado con la dieta estándar de mantenimiento.

Analizar la expresión génica relativa en función del tiempo de los genes de POMC, NPY, receptor de leptina, IR, IRS-1, IRS-2, en el hipotálamo medio basal en ratas macho adultas alimentadas con una dieta hipergrasa, tratadas o no con 25 microgramos/mL de melatonina en el agua de bebida, durante 11 semanas, comparados con el grupo control, alimentado con la dieta estándar de mantenimiento.

### *Diseño experimental*

El estudio se ha realizado en ratas macho de la cepa Wistar, a las que se les suministra una dieta hipergrasa tratadas o no con melatonina (25 µg/mL) en el agua de bebida y un grupo control alimentado con una dieta estándar de mantenimiento.

Once semanas después, ocho animales por horario y grupo se sacrificaron por decapitación en intervalos de 4 horas durante un ciclo de 24 horas, empezando a las 09:00 h (09:00, 13:00, 17:00, 21:00, 01:00 y 05:00 horas).

Inmediatamente después de su sacrificio se analiza el contenido de glucosa en sangre, se recoge la cabeza sobre hielo seco e inmediatamente

después se extrae el hipotálamo mediobasal que se mantiene en RNA later y se almacena a -80°C hasta su análisis posterior. Además, se recoge plasma de la sangre troncular después de centrifugar la sangre a 3.000 rpm, durante 15 min y se almacena a -20°C, hasta su análisis.

En el hipotálamo mediobasal se analizará la expresión génica de los neuropéptidos POMC y NPY y de los receptores de leptina, e insulina mediante PCR cuantitativa a tiempo real. Asimismo se analizará la expresión de los sustratos para el receptor de insulina el IRS-1 y el IRS-2 mediante PCR cuantitativa a tiempo real.

En los plasmas se determinarán los niveles plasmáticos de colesterol, triglicéridos, proteínas, insulina, leptina y adiponectina mediante las técnicas descritas en materiales y métodos. Se analizarán los resultados utilizando los test estadísticos descritos en materiales y métodos.

## ***CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS***



### 3.1 Instalaciones

**Facultad de Medicina, de la Universidad Complutense de Madrid (UCM).** El desarrollo de la presente tesis, así como el tratamiento de las muestras, su estudio y su análisis, se han realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III, de dicha facultad.

**Animalario Central (ANUC) de la Facultad de Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid (UCM).** El manejo de los animales ha sido realizado en el animalario de la Facultad de Ciencias Biológicas, el cual dispone de instalaciones adecuadas para el manejo de animales de experimentación y quirófanos donde llevar a cabo el sacrificio y recogida de muestras, todo ello de acuerdo con las guías internacionales para el mantenimiento y cuidado de animales (NIH, 1996).

### 3.2 Animales de experimentación

Se han utilizado ratas macho de la cepa Wistar, adultas de dos meses de edad, suministradas por Harlan Ibérica (IBERICA, S.L., Barcelona, España). Los animales se alojaron en jaulas de metacrilato de 42x23x14cm, en grupos de 4 animales por jaula. Los animales se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura ( $23^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ ), y humedad relativa (60%). Los ciclos de luz - oscuridad fueron constantes (12:12h). A continuación se menciona la distribución de los grupos experimentales.

#### ***Animales alimentados con dieta control de mantenimiento tratados o no con melatonina en el agua de bebida***

**Grupo I (Control).** Formado por ratas macho de la cepa Wistar (8 animales por horario; 09:00, 13:00, 17:00, 21:00, 01:00 y 05:00 horas) a las que se les suministra una dieta de mantenimiento y agua de bebida (con etanol al 0.015% en el agua de bebida). En este grupo se incluyen tanto los animales tratados durante 9 semanas, como los animales tratados durante 11 semanas, ya que no hay diferencias, por la duración del tratamiento con la hormona pineal, en los parámetros analizados en este estudio.

**Grupo II (Melatonina).** Formado por ratas macho de la cepa Wistar (8 animales por horario; 09:00, 13:00, 17:00, 21:00, 1:00 y 05:00 horas) a las que se les

alimenta con una dieta de mantenimiento, y se les trata con melatonina (25µg/mL) en el agua de bebida, durante 9 semanas.

***Animales alimentados con una dieta control de mantenimiento o una dieta alta en grasa, tratados en paralelo o no con melatonina en agua de bebida***

*Grupo III (Control dieta hipergrasa).* Formado por ratas macho de la cepa Wistar (8 animales por horario; 09:00, 13:00, 17:00, 21:00, 01:00 y 05:00 horas) a las que se les alimenta con una dieta hipergrasa (35% proveniente de origen graso), y agua de bebida (etanol al 0.015%), durante 11 semanas.

*Grupo IV (Dieta hipergrasa tratados con melatonina).* Formado por ratas macho de la cepa Wistar (8 animales por horario; 09:00, 13:00, 17:00, 21:00, 01:00 y 05:00 horas) a las que se les alimenta con una dieta hipergrasa (35%, proveniente de origen graso), y agua de bebida con melatonina (25µg/mL), durante 11 semanas.

### **3.3 Dietas administrada**

Se utilizaron dietas comerciales con características específicas, todo ello, para conseguir el grado de obesidad necesario en las ratas, para la realización del experimento. Con la dieta con alto contenido en grasa, se aseguró un alto consumo de grasa (35%) frente al que aporta una dieta control de mantenimiento (4%). Para ello, se utilizó una dieta especial alta en grasa (Harlan interfauna, IBERICA, S.L. Barcelona, España) y una dieta de control de mantenimiento (A04/A04C/R04 Safe, Scientific Animal Food and Engerineering). Ambas dietas han sido utilizadas con anterioridad en estudios realizados por nuestro grupo de investigación (Cano y cols, 2009).

La dieta de mantenimiento, o dieta control, es una dieta balanceada nutricionalmente, con las cantidades requeridas para cubrir las necesidades de proteínas, carbohidratos, vitaminas y minerales, además, esta dieta aporta un bajo contenido en calorías provenientes de grasas (Tabla 3).

La dieta con alto contenido en grasa ofrece a los animales una cantidad alta de calorías provenientes de materia grasa, con esta dieta aseguramos un aumento del incremento del peso de los animales en poco tiempo (Tabla 3).

**Tabla 3.** Se muestra el contenido calórico aportado por las dietas comerciales utilizadas en el presente estudio (Kcal/gr de alimento ingerido).

	Dieta	
	Control	Hipergrasa
Contenido calórico (Kcal/gr)	2,9	5,4

El alimento y la bebida, se suministraron *ad libitum* y se midió cada dos días. El control de peso de los animales se llevó a cabo dos veces por semana.

### **3.4 Tratamiento con melatonina**

La melatonina se suministró por vía oral, en el agua de bebida (SIGMA, polvo =98% (TLC), M5250), con una concentración de 25µg/mL. La preparación se realizó a partir de una solución stock en etanol al 50 %. La concentración final de etanol en el agua de bebida fue de 0.015%. Los animales control de ambas dietas, recibieron etanol al 0.015% en el agua de bebida, logrando así eliminar diferencias entre los grupos. El alimento y la bebida se suministraron *ad libitum*. La bebida se midió cada dos días; así como también la comida. Los animales se pesaron dos veces por semana.

### **3.5 Sacrificio de los animales**

Los grupos control y melatonina (animales alimentados con dieta control de mantenimiento con o sin administración de melatonina en agua de bebida), se sacrificaron por decapitación a los 63 días de tratamiento.

Los grupos control, así como los grupos dieta grasa y dieta grasa con melatonina (animales alimentados con dieta control de mantenimiento y dieta alta en grasa con y sin administración de melatonina en agua de bebida), se sacrificaron por decapitación a los 77 días de tratamiento.

El sacrificio de los animales se realizó sin anestesia previa, evitando posibles modificaciones en la secreción de hormonas, cada cuatro horas, durante un periodo de 24 horas.

### **3.6 Recogida de Muestras**

La sangre troncular se recogió en tubos de poliestireno con EDTA al 6% como anticoagulante. Se centrifugó a 1500 g durante 15 minutos a 4° C, siendo decantado el plasma y almacenado a -20° C hasta su análisis.

Posteriormente, se procedió a la apertura del cráneo para acceder al hipotálamo mediobasal, el cuál fue extraído al momento y conservado en RNA later (Quiagen, 76154), evitando así la degradación o síntesis de RNA después de extraído el tejido.

### **3.7 Material de uso general**

Agua destilada

Agua Milli Q.

Tubos de polipropileno

Vórtex

#### ***Balanza***

Balanza de precisión Salter, modelo HX-100, con una sensibilidad de  $\pm 0.0001g$ .

#### ***Centrífugas***

Centrífuga refrigerada (Beckman, modelo GS-6R) para tubos de RIA y Falcons de 15 y 50mL, la centrífuga refrigerada de alta velocidad (Kontron Instruments, modelo Centrikon T-42K) para eppendorfs, una centrífuga Eppendorf, modelo minispin, para pulsos de centrifugación y, por último, la centrífuga Beckman Coulter, modelo Allegra 25R para placas de 96 pocillos.

#### ***Espectrofotómetro***

Se empleó el espectrofotómetro de la marca Perkin-Elmer, mod. Lambda Bio UV/VIS para determinación de proteínas, el espectrofotómetro de Eppendorf, Biophotometer para cuantificar ácidos nucleicos y el espectrofotómetro de placas de Thermo Electron Corporation, modelo Varioskan.

#### ***pHmetro***

El pHmetro empleado fue de la marca CRISON, modelo MicropH 2001, con un electrodo incorporado INGLOD.

#### ***Homogeneizador***

Se utilizó el equipo de lisis Fast-Prep, especializado en la extracción de DNA, RNA y Proteínas de tejidos. Fast- Prep se utilizó con una matriz de lisis tipo D, (esferas de cerámica de 1.4 mm de diámetro, específico para muestras de plantas y animales.

***Autoclave***

Marca Selecta, modelo Autotester-G.

***Termociclador Eppendorf***

Las PCRs a tiempo real fueron realizadas en el sistema de Applied Biosystems, modelo 7300 Real Time. El termociclador MJ Research, modelo PTC-100

***Cubetas de electroforesis***

Cubeta de la casa Sigma-Aldrich.

***Fuentes de alimentación de electroforesis***

Marca Gaoc, modelo G-201 serie B.

***Transiluminador ultravioleta***

Suministrado por Bio Rad.

***Contador de Radiactividad***

Contador de Pacisa, modelo Cobra autogamma.

***Pipeta graduada***

Con volúmenes de 0-2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 1000, 5000, 10,000  $\mu$ L.

***Pipeta multicanal***

Con volúmenes de 0-20, 20-200, 25-300 $\mu$ L.

**3.8 Medida de los niveles sanguíneos de glucosa**

La determinación de glucosa en sangre se realizó el día del sacrificio de los animales, para ello se utilizaron tiras reactivas y un dispositivo portátil.

***Fundamento***

El principio de la prueba esta basado en la reacción glucosa-oxidase/peroxidase. Cada tira reactiva contiene una área verde: o-Tolidine 18.0  $\mu$ g, APAC 0.59  $\mu$ g, Glucosa Oxidase 0.24 U, Peroxidase 4.6 U y área azul: TMB 17.2  $\mu$ g, Glucosa Oxidase 0.17 U, Peroxidase 3.0 U. La tira reacciona al tener contacto con la sangre, mediante el dispositivo se obtiene la

concentración de glucosa en mg/dL, esta técnica ha sido utilizada y puesta a punto por nuestro grupo de investigación (Cano y cols 2009).

### ***Material y reactivos***

Spectronic Accu - chek sensor ROCHE, USA.

Tiras de diagnóstico Accu - chek sensor, ROCHE, U.S.A

Muestra de sangre

### ***Procedimiento***

Se toma la muestra de sangre, y se aplica en el área indicada de la tira reactiva, dentro del glucómetro. Para controlar la precisión y el funcionamiento del glucómetro, se utiliza un chip correspondiente al lote específico para las tiras.

## **3.9 Medida de las concentraciones plasmáticas de colesterol, proteínas, triglicéridos y proteínas totales**

### ***Medida de colesterol plasmático***

La determinación de colesterol en plasma se realizó utilizando un kit comercial de análisis de concentración de colesterol (80106 de Materlab) y un analizador bioquímico multicanal.

### ***Fundamento***

La técnica está basada en la secuencia de varias reacciones enzimáticas. En una primera fase, se hidrolizan los ésteres de colesterol presentes en el plasma a colesterol y ácidos grasos libres por la enzima colesterol esterasa (CE). A continuación se oxida el colesterol por la enzima colesterol oxidasa (CO), obteniendo como producto colesteno y agua oxigenada. Esta última reacciona con la peroxidasa (POD), produce un producto coloreado, el cual leído en absorbancia a 500nm, proporciona la concentración de colesterol en plasma de partida. La concentración se calcula

por el analizador bioquímico, utilizando un estándar de referencia (Materlab, 2010), a partir de la siguiente ecuación.

$$\text{Colesterol (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbancia de la muestra (nm)}}{\text{Absorbancia del estándar (nm)}} \left( \text{Concentración del estándar (mg/dL)} \right)$$

### **Material y reactivos**

Analizador bioquímico screenpoint

Cubetas 7064b30200026

Multicalibrador 95015-F

Tampón (Fosfato, 4-cloro fenol, triton 100X)

Enzimas: (Colesterol oxidasa (CO), colesterol esterasa (CE), peroxidasa (POD), 4-aminoantipirina

Estándar de colesterol total 80106 por Materlab.

Muestra de plasma

### **Procedimiento**

- 1.- Preparación de la solución enzimática; se añade el reactivo enzimático al tampón y se agita hasta su total disolución.
- 2.- Preparación del blanco; se agrega 1mL de la solución enzimática y 10µL de agua destilada.
- 3.- Preparación de la solución estándar; se obtiene agregando 1mL de la solución enzimática a 10mL de solución estándar.
- 4.- Preparación de la muestra; se adiciona 1mL de la solución enzimática en 10 µL de plasma.
- 6.- Se procede a leer en el analizador bioquímico, a 500nm de longitud de onda.

### **Medida de triglicéridos plasmáticos**

El análisis de triglicéridos en plasma se realizó utilizando un kit comercial (80019 de Materlab) y un analizador bioquímico multicanal.

### Fundamento

La prueba se basa en sucesivas reacciones enzimáticas. Los triglicéridos presentes en la muestra son catalizados por la enzima lipasa, produciendo glicerol y ácidos grasos libres. Una vez obtenidos los productos, antes mencionados, son catalizados a su vez, por la enzima glicerol cinasa (GK), obteniendo el glicerol 3-fosfato y  $O_2$ ; sobre este producto actúa la enzima glicerol 3-fosfato oxidasa (GPO), resultando como productos el 4-clorofenol y agua oxigenada. Este último producto reacciona con la peroxidada (POD), obteniendo una reacción colorimétrica; siendo este color, el equivalente a la absorbancia, que finalmente se calcula mediante el analizador bioquímico, haciendo uso de un estándar de referencia (Materlab, 2010)

$$\text{Triglicéridos (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbancia de la muestra (nm)}}{\text{Absorbancia del estándar (nm)}} \left( \text{Concentración del estándar (mg/dL)} \right)$$

### Material y reactivos

Analizador bioquímico screenpoint

Cubetas 7064b30200026

Multicalibrador 95015-F

Tampón (Cloro 4-fenol, cloruro de magnesio)

Enzimas: Lipasa, peroxidada (POD), glicerol 3 fosfato oxidasa (GPO), glicerol cinasa (GK)

Estándar de triglicéridos 80019 por Materlab.

Muestra de plasma

### Procedimiento

1. Preparación de la solución enzimática; se añade el reactivo enzimático al tampón y se agita hasta su total disolución.
2. Preparación del blanco; se realiza añadiendo 1mL de solución enzimática y 10  $\mu$ L de agua destilada.
3. Preparación del estándar; se obtiene incorporando 1mL de solución enzimática y 10 $\mu$ L del estándar en una cubeta.

4. Preparación de la muestra; se añade 1mL de la solución enzimática en 10µL de plasma en una cubeta.

5. Se procede a leer en el analizador bioquímico, a 500nm de longitud de onda.

### **Medida de proteínas plasmáticas totales**

El análisis de las proteínas totales en plasma se realizó utilizando un kit comercial de medición de proteínas totales (LP87016 de Materlab, analizador bioquímico multicanal).

### **Fundamento**

El principio de la prueba esta basado en la reacción de Biuret. El reactivo está conformado por hidróxido potásico (KOH) y sulfato cúprico (CuSO<sub>4</sub>), junto con tartrato de sodio y potasio (KNaC<sub>4</sub>O<sub>6</sub>·4H<sub>2</sub>O). El reactivo, de color azul, cambia a violeta en presencia de proteínas, y vira a rosa cuando se combina con polipéptidos de cadena corta. El Hidróxido de Potasio no participa en la reacción, pero proporciona el medio alcalino necesario para que tenga lugar. Este método colorimétrico permite determinar la concentración de proteínas de una muestra mediante espectroscopía ultravioleta-visible a una longitud de onda de 540 nm (para detectar el ión Cu<sup>2+</sup>) (Materlab, 2010).

$$\text{Proteinas totales (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbancia de la muestra (nm)}}{\text{Absorbancia del estándar (nm)}} \left( \text{Concentración del estándar (mg/dL)} \right)$$

### **Material y reactivos**

Analizador bioquímico screenpoint

Cubetas 7064b30200026

Multicalibrador 95015-F

Reactivo de Biuret: (hidróxido potásico (KOH), sulfato cúprico (CuSO<sub>4</sub>), tartrato de sodio y potasio (KNaC<sub>4</sub>O<sub>6</sub>·4H<sub>2</sub>O)

Estándar de proteínas totales (LP87016) por Materlab.

Muestra de plasma

### **Procedimiento**

1. Preparación del blanco; Se agrega 1mL del reactivo de Biuret y 1mL de agua desmineralizada.
2. Preparación del estándar; se realiza añadiendo 1mL del reactivo de Biuret y se agregan 20µL de la solución estándar.
3. Preparación de la muestra; se añade 1mL del reactivo de Biuret y se agregan 20µL de plasma en una celda.
4. Se procede a leer en el analizador bioquímico, a 540nm de longitud de onda.

### **3.10 Medida de las concentraciones plasmáticas de Insulina, leptina y adiponectina**

Los niveles plasmáticos de Insulina, leptina y adiponectina, se han determinado utilizando la técnica de inmunoensayo, mediante kits comerciales, utilizando el sistema Luminex 100™ IS, (Luminex Corporation, Osterhout. The Netherlands) y los kits Milliplex<sub>MAP</sub> (Millipore Corporation, Billerica, MA 01821, USA).

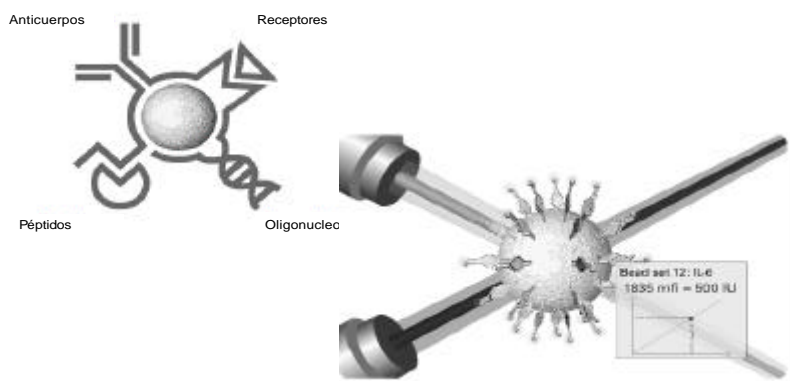
Los kits utilizados para la medida de hormonas en el presente estudio, han sido: #RGT-88K para insulina y leptina, y el kit RADPK-81K-ADPN para la medida de adiponectina. Los datos de fluorescencia han sido analizados mediante el software Master Plex™ QT. Todos los análisis se realizaron de acuerdo a los protocolos y especificaciones de los kits antes mencionados.

#### **Fundamento**

El método se basa en la utilización de microesferas, donde cada microesfera posee un color específico interno, el cual varía de un rojo hasta llegar a tonalidad verde. Se han definido 100 colores diferentes de microesferas, permitiendo así, que cada esfera se encuentre identificada por su color interno. Cada microesfera lleva unidos anticuerpos específicos para un analito. Cuando el analito presente en la muestra es capturado por la microesfera, se añade un anticuerpo marcado con biotina, que al ser incubado con streptavidina- ficoeritrina (L-SAPE), genera una reacción sobre la superficie de la esfera, que emite fluorescencia.

Para obtener las concentraciones hormonales, las microesferas pasan una a una, a través de dos tipos de láser; uno, que posee la función de excitar

el color interno, identificando así la microesfera; y un segundo láser que excita la ficoeritrina unida a la microesfera, obteniendo así la fluorescencia media (MFI). Esta fluorescencia obtenida; es convertida en concentración, haciendo uso de la curva estándar específica de cada analito (Figura 7).



**Figura 7.** Se muestra la reacción en la superficie de la esfera, antígeno-anticuerpo y su lectura, mediante el Luminex 100™. Figura de [www.luminex.com](http://www.luminex.com)

Esta técnica se ha puesto a punto y desarrollado por nuestro laboratorio de investigación, además a sido fuente instrumental en distintos trabajos (Cano y cols, 2009).

### **Material y reactivos**

Luminex 100™ IS, por Luminex Corporation

Líquido del sistema (Luminex # 40-50000)

Sonicador (Branson Ultrasonic Cleaner Model #B200)

Placa agitadora en orbital (Lab-Line Instruments Model #4625)

Bomba de aspiración (Millipore Vacuum Manifold Catalog #MSVMHTS00)

Base para placa (Millipore Catalog # MX-STAND)

kit comercial (Millipore, Watford, UK). Rat single plex Adiponectin (RADPK-81K-ADPN) y Rat Gut Hormone Panel (RGT-88K).

### **Preparación de reactivos**

Preparación de las microesferas; se sonica el vial que contiene las microesferas, se agita en vórtex durante 1 minuto, se añaden 150µL de cada microesfera y se lleva a un volumen final de 3mL con reactivo diluyente.

Preparación de los controles de calidad; se reconstituyen con 250µL de agua destilada, se invierte varias veces el vial hasta mezclar completamente. Después de 5-10 minutos en reposo, se transfiere a un tubo de polipropileno.

Preparación del tampón de lavado; se deja a temperatura ambiente el tampón de lavado (10X) y se mezcla. Se diluyen 30mL en 270mL de agua destilada.

Preparación de la solución matriz; se añade 1mL de agua destilada al vial y se mezcla (solo en el caso de insulina y adiponectina).

Preparación de los estándares; se añaden 250µL de agua destilada al stock de estándar, se invierte varias veces el vial, se deja reposar por 5 minutos, después se transfiere a un tubo de polipropileno y se realizan subsecuentes diluciones para obtener la siguiente curva estándar (Tabla 4).

**Tabla 4.** Concentraciones en pg/mL de las curvas de calibración utilizadas en la medición de insulina, leptina y adiponectina.

Curva estándar	Insulina, Leptina	Adiponectina
	(pg/mL)	(pg/mL)
1	68.5	488
2	205.8	1953
3	617.3	7813
4	1851.9	31250
5	5555.6	12500
6	16666.7	500000
7	50000	***

### **Procedimiento**

1. Humedecer los 96 pocillos de la placa con tampón de lavado.
2. Añadir 25µL de muestra, estándar y controles de calidad en los pocillos designados para cada analito.
3. Añadir los anticuerpos (microesferas), e incubar durante 16-18 horas, en agitación constante a 4°C.
4. Realizar dos lavados de la placa con tampón de ensayo.
5. Agregar 25µL del anticuerpo de detección en cada pocillo.
6. Incubar durante 1 hora, a temperatura ambiente y en agitación constante.

7. Sin lavar, agregar a cada pocillo, 25µl de la solución que contiene ficoeritrina-estreptomina.
8. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente, en agitación constante y protegido de la luz.
9. Lavar la placa 3 veces con tampón de lavado.
10. Añadir a cada pocillo 100 µL del líquido del sistema.
11. Inmediatamente leer en el aparato Luminex 100™ IS, aplicando las especificaciones y el protocolo de lectura, según el proveedor.

### **3.11 Medida de las variaciones diarias de la expresión génica de los neuropéptidos NPY, POMC y PrRP así como de los receptores de leptina e insulina y los sustratos intracelulares de insulina: IRS-1 y 2 en Hipotálamo Medio Basal**

#### **3.11.1 Aislamiento de RNA a partir de tejido**

Extracción de RNA hipotalámico. Los tejidos que se mantienen en RNA later a -80°C, se descongelan lentamente y se procede tal como lo especifica el protocolo de extracción de RNA (RNAeasy protect mini Qiagen 74104).

#### ***Fundamento***

El procedimiento empleado para la extracción y purificación de RNA se basa en la unión selectiva del RNA a una membrana de sílica-gel. Como primera fase, se procede al lisado (mediante el Fast Prep, utilizando la matriz D) y se homogeniza el tejido en un tampón con isocianato de guanidina como componente principal, con ese tampón se logra inactivar las RNasas y se favorece la solubilización de los componentes celulares; a continuación se añade etanol aportando las condiciones necesarias para que el RNA se una a la membrana de las columnas, mientras que los contaminantes son eluidos.

Con el objetivo de evitar la contaminación por DNA de la muestra, se lleva a cabo un tratamiento con DNAsa I (Quiagen 79254), dentro de la columna. Finalmente el DNA es eluido en agua libre de DNAsa.

#### ***Material y reactivos***

Kit de extracción de RNA (RNAeasy protect mini;Qiagen 74104).

Equipo homogenizador, Fast Prep 24, matriz D para homogenizar (Biomedicals Inc, U.S.A.).

Kit de DNasa ( Quiagen 79254).

Agua libre de DNA, RNA.

### **Procedimiento**

1. Lisar el tejido en 300  $\mu$ L de tampón RTL mediante el homogenizador Fast Prep 24 MP, utilizando la matriz D.
2. Clarificar el lisado mediante centrifugación durante 3 minutos a 10.000 rpm y transferir el sobrenadante a un tubo de polipropileno nuevo; añadir 300  $\mu$ L de etanol al 70%. Mezclar por inversión y transferir el contenido a una columna de extracción RNAeasy.
3. Centrifugar 15 segundos a 10.000 rpm, para lograr favorecer la adsorción del RNA sobre la columna, eliminando el resto de los componentes celulares.
4. Tratamiento con DNasa en la columna.  
Añadir 350  $\mu$ L del buffer RW1 y centrifugar 15 segundos a 10.000 rpm.  
Descartar el eluído y añadir 10  $\mu$ L de DNasa sobre 70  $\mu$ L de buffer RDD e incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente.  
Lavar la membrana con 350  $\mu$ L de tampón de lavado, centrifugar 15 segundos a 10.000 rpm, logrando descartar el eluído.
5. Eliminación de los contaminantes mediante centrifugaciones sucesivas con buffer RPE.  
Agregar 500  $\mu$ L de buffer RPE y centrifugar 15 segundos 10.000 rpm.  
Descartar eluído.  
Lavar dos veces la columna con 500  $\mu$ L de tampón RPE, descartando el eluído.  
Centrifugar 1 minuto a 10.000 rpm para secar la columna completamente.
6. El RNA adsorbido sobre la membrana de sílica es disuelto con 30  $\mu$ L de agua libre de RNAsas. Centrifugar 1 minuto a 10.000 rpm y conservar el eluído.
7. RNA total. Disponer el eluído sobre la membrana de la columna y someter a otra centrifugación de 1 minuto a 10.000 rpm. Añadir 10  $\mu$ L más de agua libre de RNasa y repetir la centrifugación.
8. Conservar el RNA extraído a  $-80^{\circ}$  C.

### 3.11.2 Cuantificación de la concentración de RNA

La concentración de RNA se ha determinado midiendo la absorbancia de la muestra por espectrometría ultravioleta-visible, a 260nm de longitud de onda. Dado que las muestras se procesaron para una efectiva eliminación de DNA, se considera, que el valor de absorbancia es atribuible a la concentración de RNA.

Para la determinación, se han empleado cubetas de cuarzo libres de RNasas y tampón Tris-CL 10mM como blanco de la medida. La dilución de RNA empleada fue de 1:40 sobre un volumen final de 150µL de tampón Tris-CL 10 mM. Para las medidas realizadas, se considera que 1 unidad de absorbancia corresponde a 44µg/mL de RNA. Obteniendo la concentración de RNA total de cada muestra de la siguiente ecuación:

$$\text{RNA } (\mu\text{g/mL}) = 40 \left( \text{Absorbancia (260 nm)} \right) \left( \text{Factor de dilución} \right)$$

Con el fin de confirmar la integridad del RNA y descartar la contaminación con DNA genómico, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al X% (p/v) en tampón Tris-acetato-EDTA (TAE), tinción con bromuro de etidio (0.5 µg/ml EtBr) y exposición a luz UV.

### 3.11.3 Retrotranscripción

#### **Fundamento**

La retrotranscripción es un proceso molecular que implica la generación de una doble cadena de ácido desoxirribonucleico (cDNA) a partir de ácido ribonucleico mensajero (mRNA) de cadena simple. La enzima encargada de esta síntesis es la transcriptasa inversa, que requiere de un cebador o primer, que posea un extremo 3´OH desde donde comenzar la síntesis. En este estudio, se empleó el kit i Script de Bio-rad laboratories.

Los cebadores utilizados han sido hexa-deoxinucleótidos sintéticos con secuencias al azar (Invitrogen 48190-011), estos cebadores realizan la

hibridación donde encuentren complementariedad con el mRNA. De ahí que se los conozca como cebadores al azar.

### **Procedimiento**

La retrotranscripción se realizó a partir de 1 µg de mRNA para cada muestra. Dentro del proceso, se incluyeron controles negativos, (reacciones sin muestra), y controles positivos, (reacciones con muestra).

Para una reacción de un volumen de 20µL, se añade a cada tubo:

1 µg de RNA en un tubo con agua destilada, hasta llegar a un volumen final de 15 µL.

4 µL 5X iscript.

1 µL transcriptasa inversa.

Con un volumen final de 20 µL, procedemos a realizar la reacción en el termociclador Eppendorf con el programa detallado en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Se muestra la rampa de temperatura utilizada en la retrotranscripción de los genes en estudio

Retrotranscripción	
° Celsius	Tiempo (min)
25	5
42	30
85	5
72	0.5
4	5

Finalizada la reacción, se conserva el cDNA a 4° C para su posterior estudio génico.

### **3.11.4 PCR Cuantitativa a tiempo real**

#### **Fundamento**

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (Real-Time PCR) es actualmente el método más sensible, específico y exacto para la cuantificación de niveles de mRNA, tanto en células como en tejidos.

Este método, permite la detección directa del producto de amplificación (amplicones) durante la fase exponencial de la reacción, a través del empleo de

compuestos con propiedades fluorescentes que sólo emiten fluorescencia cuando el DNA está en forma de doble cadena. El incremento de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de producto formado. El ciclo en el que la amplificación comienza a ser exponencial se denomina ciclo umbral (“threshold cycle”, CT) y es el parámetro de medida de la expresión de un determinado gen. Así, cuanto mayor es el número de ciclos de PCR necesarios para alcanzar la fase exponencial de amplificación, es decir, a mayor  $C_T$  menor es el molde de partida.

Todo el procedimiento del manejo del tejido, comenzando por el lisado del tejido, aislamiento del RNA, cuantificación del RNA, la retrotranscripción y por último la realización de la PCR cuantitativa, se ha hecho según las especificaciones de los protocolos puestos a punto por nuestro grupo de investigación (Jiménez-Ortega, 2009).

#### **Material y reactivos**

Se utilizó el kit “2x Quantitect SYBR Green PCR Master mix” de Qiagen (204143), que incluye los siguientes compuestos:

- SYBR Green: fluoróforo que al unirse al DNA de doble cadena emite fluorescencia. Conocido también como “reporter”.
- Tampón, específico para la detección por SYBR Green.
- Mezcla de dNTP.

#### **Procedimiento**

Para la amplificación de los genes en estudio, se ha analizado cada muestra por triplicado en una placa de 96 pocillos específica para PCR. El volumen final es de 15  $\mu$ L, como lo muestra la Tabla 6. La amplificación de los genes se realizó según se describe en la Tabla 7, finalmente, se realiza la curva de disociación, la Tabla 8, muestra la rampa de temperatura.

**Tabla 6** Se muestran los reactivos utilizados, para la amplificación de los genes en estudio.

Preparación de la muestra a amplificar	
Sondas concentración final	0.3 $\mu$ M
Muestra de Cdna	25 ng
SYBR Green	1X
Agua libre de RNAsas.	Aforar a 15 $\mu$ L

Para descartar contaminación de los reactivos empleados con la secuencia a amplificar, se han incluido controles negativos (sin cDNA) en cada ensayo realizado.

**Tabla 7.** Condiciones de amplificación de los genes en estudio.

	Programa de amplificación	
	$^{\circ}$ Celsius	Tiempo (seg)
Desnaturalización	94	15
Unión	60	30
Extensión	72	30

**Tabla 8.** Rampa de temperatura para la obtención de la curva de disociación. Una vez terminada la reacción en cadena de la polimerasa, se valora la especificidad e identidad de los productos de la PCR a través de las curvas de disociación o “melting” (Ririe y cols, 1997).

Curva de disociación	
$^{\circ}$ Celsius	Tiempo (seg)
95	15
60	30
95	15

### 3.11.5 Sondas

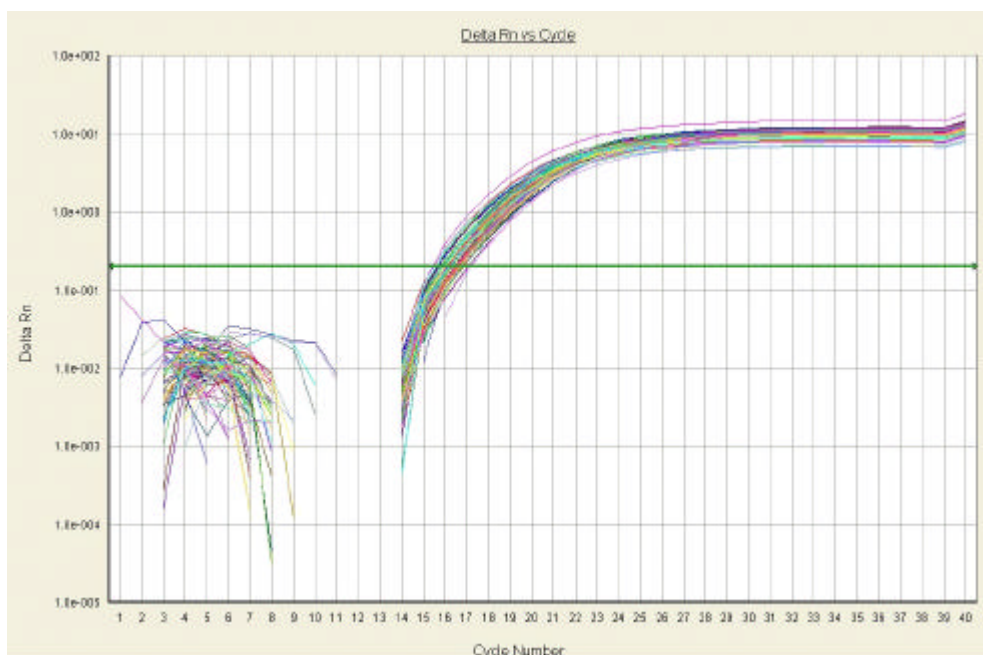
En la Tabla 9, se muestra la secuencia de los cebadores que se han utilizado para la determinación de los niveles de expresión de los distintos genes. Todos ellos, han sido provistos por Invitrogen y diseñados a partir del programa Primer3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi), The Whitehead Institute). La especificidad de los cebadores se confirmó a través del asistente del software BLAST (National Library of Medicine, Bethesda, MD).

**Tabla 9.** Se muestran las secuencias de los cebadores utilizados en este estudio.

Gen	Reacción en cadena
	Cebadores (Secuencia de nucleótidos)
$\beta$ -actina	5'-ccagatcatgtttgagacctcaa-3' 5'-ccagaggcgtacaggatagc-3'
Neuropeptido Y (NPY)	5'-tactccgctctgacacta-3' 5'-gggcatttctgtgctttct-3'
Proopiomelancortina (POMC)	5'-cgtgtgccttctgactcc-3' 5'-gactggctttccaagatac-3'
Receptor de leptina (LepR)	5'-cgtgtgccttctgactcc-3' 5'-gactggctttccaagatac-3'
Receptor de insulina (IR)	5'-tcttcaggcaatgggtct-3' 5'-gtggaggagatgtgggaaa-3'
Sustrato del receptor de insulina-1 (IRS-1)	5'-tgtccaagcaacaagaaag-3' 5'-acggttcagagcagaggaa-3'
(Sustrato del receptor de insulina-2 (IRS-2)	5'-ctaccactgagccaagag-3' 5'-ccagggatgaagcaggacta-3'

### 3.11.6 Valoración de los resultados PCR Cuantitativa a tiempo real

Como gen normalizador, o de referencia se empleó la  $\beta$ -Actina, gen cuya expresión es constitutiva, ya que, su expresión es la misma en distintos estados de desarrollo y diferentes tejidos del organismo, además su expresión no se ve modificada por el tratamiento en estudio. El calibrador ha sido el grupo control, por lo que el resultado obtenido, indica la expresión relativa o número de veces de inducción en la expresión del gen en los animales tratados frente a los controles. Figura 8



**Figura 8** Representación de la intensidad de fluorescencia normalizada resultante de la valoración de la expresión del gen de beta-actina bajo las condiciones detalladas anteriormente.

Para que este método sea válido, la eficiencia de la amplificación del gen de referencia y la del gen problema ha de ser aproximadamente la misma. La eficiencia de amplificación de cada uno de los genes se obtiene preparando diluciones seriadas del cDNA de partida y viendo cómo varía el valor de  $C_T$  para cada concentración de cDNA. Se representa el logaritmo de la concentración frente al  $C_T$  y se calcula la pendiente de la recta para cada una de las representaciones obtenidas. La ecuación que define la eficiencia de amplificación es:

$$\text{Eficiencia de amplificación} = \left[ \left( -10 / \text{pendiente} \right) \right]^{-1}$$

Según la ecuación, la eficiencia ideal de un 100% se obtiene con una pendiente de  $-3.322$ , lo que significa que el aumento de un ciclo de amplificación durante la fase exponencial de la reacción supone exactamente la duplicación del material amplificado.

Las eficiencias y pendientes que se obtuvieron al poner a punto la técnica han sido las siguientes:

- Para el gen de referencia de beta-actina; pendiente de  $-3,316$ , reflejo de un 100% de eficiencia.
- NPY, pendiente:  $-3,256$ ; eficiencia: 103%.
- POMC, pendiente:  $-3,3632$ ; eficiencia: 98%
- PrRP, pendiente:  $-3,2306$ ; eficiencia: 100%
- LepR, pendiente:  $-3,3122$ ; eficiencia: 105%
- IR, pendiente:  $-3,2936$ ; eficiencia: 97%
- IRS-1, pendiente:  $-3,3077$ ; eficiencia: 100%
- IRS-2, pendiente:  $-3,3445$ ; eficiencia: 99%

Si la eficiencia de amplificación del gen problema y el de referencia es aproximadamente la misma, la representación del logaritmo de cada dilución frente a la diferencia entre el  $C_T$  del gen problema y el de referencia en cada punto ( $\Delta C_T$ ) tendrá una pendiente  $<0.1$  y próxima a cero, siendo.

$$\Delta C_T = C_T (\text{gen estudio}) - C_T (\beta\text{-actina})$$

La representación logarítmica de la dilución del cDNA de partida frente al  $\Delta C_T$  de cada gen indica que la pendiente de la curva se aproxima a cero, por lo que la eficiencia de las amplificaciones es similar en todos genes y el método de comparación de  $\Delta C_T$  queda validado.

Una vez comprobado que las eficiencias son comparables, se aplicó la ecuación que permite la cuantificación de la expresión génica por el método de comparación de  $C_T$ :

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = \frac{2^{-\Delta C_{T1}}}{2^{-\Delta C_{T2}}}$$

Donde:

?  $C_T 1 = C_T \text{ gen problema} - C_T \text{ beta-actina de la muestra 1}$

?  $C_T 2 = C_T \text{ gen calibrador} - C_T \text{ beta-actina de la muestra 2}$

Cada valor de  $C_T$  es el promedio de los triplicados para cada muestra.

### **3.12 Análisis estadístico**

El análisis estadístico de los datos obtenidos en el estudio se ha llevado a cabo con el programa SPSS, versión 17.0 (SPSS Inc., Chicago, ILL). Se ha empleado un modelo factorial univariante, que analiza las variaciones en la media debidas al tratamiento, a la hora de sacrificio de los animales o a la interacción entre ambos factores.

En todos los análisis, el nivel de confianza para no rechazar la hipótesis nula fue mayor o igual al 95% ( $p < 0,05$ ); por debajo de ese nivel, rechazamos la hipótesis nula. Los valores que aparecen en este trabajo se expresan como la media  $\pm$  error estándar de la media (E.E.M).

## ***CAPÍTULO 4. RESULTADOS***



## Bloque 1

### **4.1. Efecto de un tratamiento con melatonina, durante nueve semanas, en ratas macho adultas, alimentadas con una dieta estándar de mantenimiento**

#### **4.1.1 Ingesta de alimentos y consumo de agua**

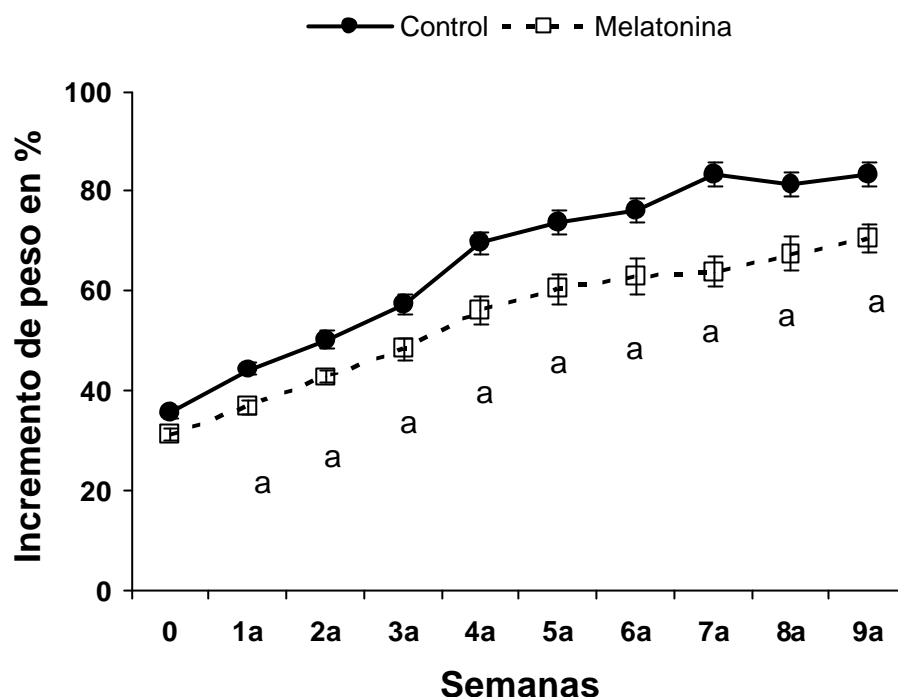
Tanto el grupo control, como el grupo melatonina ingirieron iguales cantidades de alimento ( $18 \pm 1$  y  $19 \pm 2$  gramos/día respectivamente), y por tanto la misma ingesta en grasas, carbohidratos y proteínas. De hecho, el contenido calórico total, aportado por la dieta, utilizada en este estudio, fue de 2,9 Kilocorías/gramo ingerido, tanto en animales controles como tratados con la hormona. Ello, nos permite garantizar, que la melatonina por sí misma produce efectos metabólicos en ratas alimentadas con una dieta estándar.

Tampoco se mostraron diferencias en la ingesta de agua; ya que ambos grupos tomaron el mismo volumen de agua por día ( $18 \pm 2$  y  $19 \pm 3$ /mL al día, control y tratado respectivamente).

#### **4.1.2 Efecto de un tratamiento con melatonina, durante nueve semanas sobre la evolución semanal del peso**

El incremento de peso en ratas macho Wistar, adultas, alimentadas con una dieta control de mantenimiento tras la administración de melatonina, durante nueve semanas, en el agua de bebida se muestra en la gráfica 1.

El grupo tratado con melatonina, muestra una disminución significativa en el incremento del peso frente al grupo control, a partir de la segunda semana, hasta el final del tratamiento. La melatonina indujo una disminución de hasta el 16% en el incremento del peso del grupo tratado, al compararlo con los valores del grupo control, 9 semanas después del inicio del tratamiento con la hormona.



**Gráfica 1.** Variación del incremento del peso, en ratas macho adultas, alimentadas con una dieta control, tratadas o no con melatonina durante 9 semanas. 48 animales por grupo, se sacrificaron por decapitación en intervalos de 4 horas durante un ciclo de 24 horas, empezando a las 09:00 horas. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el ANOVA de una vía, observándose una diferencia significativa <sup>a</sup>  $p < 0.01$  frente al control, valorado con la t de Student. Se muestran los valores de cada grupo, como la media  $\pm$  EEM.

#### 4.1.3 Efecto de un tratamiento con melatonina, durante nueve semanas, sobre los niveles medios de concentración de glucosa en sangre y colesterol, triglicéridos y proteínas totales en plasma, durante la fase luminosa y la fase oscura del fotoperiodo

En la Tabla 10, se muestra la concentración media de glucosa en sangre y colesterol, triglicéridos y proteínas totales en plasma, durante la fase luminosa y la fase oscura del fotoperiodo, en ratas macho adultas, tratadas o no con melatonina durante 9 semanas y alimentadas con una dieta de mantenimiento.

**Tabla 10.** Se muestran los valores medios  $\pm$  EEM de los niveles de concentración de glucosa en sangre y colesterol, triglicéridos y proteínas totales en plasma de los grupos estudiados, durante la fase luminosa y la fase oscura del fotoperiodo. Se representa en negritas las diferencias significativas entre los valores obtenidos en la fase luminosa y en la fase oscura del fotoperiodo de cada grupo.

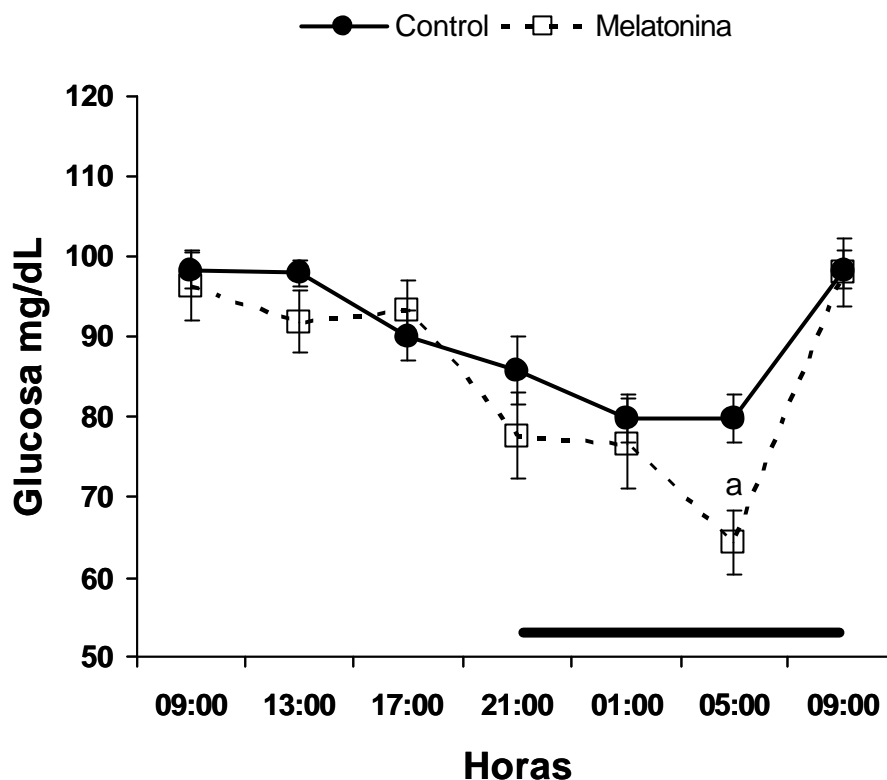
	Control		Melatonina	
	Día	Noche	Día	Noche
Glucosa mg/dl	<b>95,33 <math>\pm</math> 2,20</b>	<b>78,53 <math>\pm</math> 2,41</b>	95,46 $\pm$ 2,15	72,86 $\pm$ 3,12
Colesterol mg/dL	71,09 $\pm$ 4,34	63,28 $\pm$ 3,9	<b>60,63 <math>\pm</math> 2,88</b>	<b>70,80 <math>\pm</math> 3,75</b>
Triglicéridos mg/dL	183,88 $\pm$ 16,97	155,59 $\pm$ 30	<b>158,15 <math>\pm</math> 14,04</b>	<b>98,88 <math>\pm</math> 11,78</b>
Proteínas totales mg/dL	7,81 $\pm$ 0,21	7,36 $\pm$ 0,28	<b>7,38 <math>\pm</math> 0,187</b>	<b>6,92 <math>\pm</math> 0,129</b>

Estas diferencias se describen en cada uno de los apartados a continuación.

#### 4.1.4 Efecto de un tratamiento con melatonina, durante nueve semanas sobre las variaciones diarias de los niveles sanguíneos de glucosa

En la gráfica 2, se presentan los resultados del estudio de las variaciones diarias en los niveles de glucosa en sangre de ratas macho adultas, tratadas o no con melatonina durante 9 semanas y alimentadas con una dieta de mantenimiento. En ella, se observa una variación significativa de la concentración de glucosa a lo largo del día tanto en animales control como en animales tratados con melatonina ( $F=15,244$   $p<0,0001$  y  $F=8,788$   $p<0,001$ , respectivamente).

Se muestra, en ambos grupos experimentales, un patrón diario similar de los niveles de glucemia en sangre, con un mínimo de concentración a las 05:00 horas. En ambos grupos, los niveles plasmáticos de glucosa en la fase oscura disminuyen significativamente al compararlos con los datos obtenidos en la fase luminosa ( $F=55,003$   $p<0,001$  y  $F=35,546$   $p<0,001$ , grupo control y melatonina, respectivamente). Además, la administración de melatonina no modificó significativamente los valores medios de glucosa frente al grupo control.

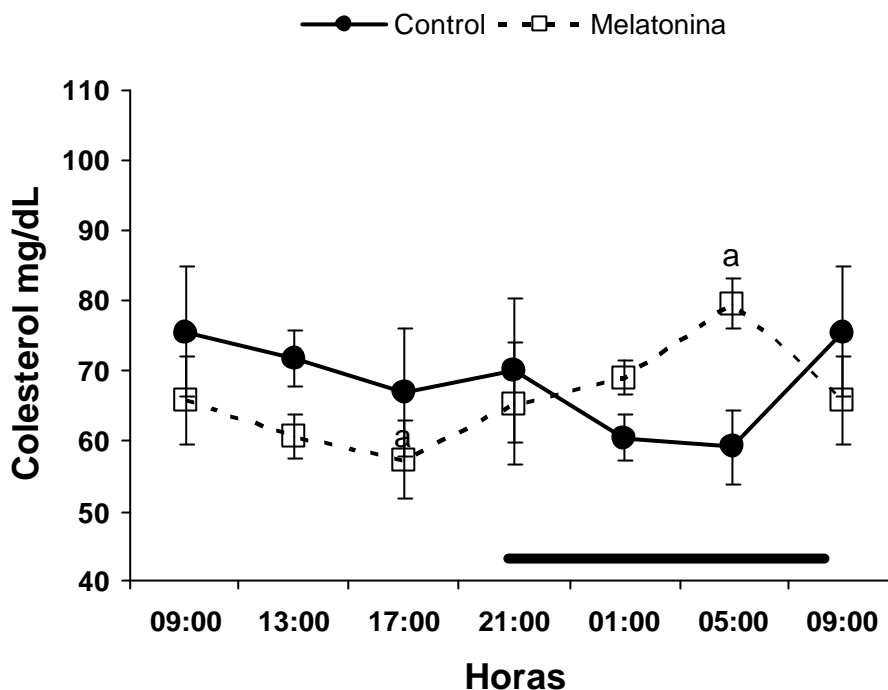


**Gráfica 2.** Patrón diario de los niveles de glucosa en sangre en ratas macho adultas, alimentadas con dieta de mantenimiento, tratadas o no con melatonina durante 9 semanas. 8 animales por horario y grupo, se sacrificaron por decapitación en intervalos de 4 horas durante un ciclo de 24 horas, comenzando a las 09:00 horas. La barra indica la duración del periodo de oscuridad. Se muestran los valores medios  $\pm$  EEM. Las letras indican la existencia de diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) de los valores de concentración de glucosa entre los dos grupos experimentales (<sup>a</sup> grupo control frente al grupo tratado con melatonina). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía.

#### 4.1.5 Efecto de un tratamiento con melatonina, durante nueve semanas sobre las variaciones diarias de las concentraciones plasmáticas de colesterol, triglicéridos y proteínas totales

##### *Variaciones diarias de las concentraciones plasmáticas de colesterol*

Las variaciones diarias de las concentraciones plasmáticas de colesterol, en el grupo control y en animales tratados con melatonina durante 9 semanas, se muestran en la gráfica 3.



**Gráfica 3.** Patrón diario de los niveles de colesterol en plasma de ratas macho adultas alimentadas con una dieta control de mantenimiento, tratadas o no con melatonina, durante 9 semanas. 8 ratas, por horario y grupo, se sacrificaron por decapitación en intervalos de 4 horas durante un ciclo de 24 horas, comenzando a las 09:00 horas. La barra indica la duración del periodo de oscuridad. Se muestran los valores medios  $\pm$  EEM. La letra indica la existencia de diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) de los valores plasmáticos de colesterol entre los grupos estudiados, en un punto horario (<sup>a</sup> grupo control frente al grupo tratado con melatonina). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía.

Los grupos estudiados, no mostraron variaciones significativas diarias en la concentración plasmática de colesterol. Sin embargo, el grupo melatonina muestra una tendencia en un aumento de los niveles circulantes de colesterol plasmático durante la fase oscura del fotoperiodo (con unos valores máximos a las 05:00 horas), mientras que en el grupo control se observa el efecto contrario (Tabla ).

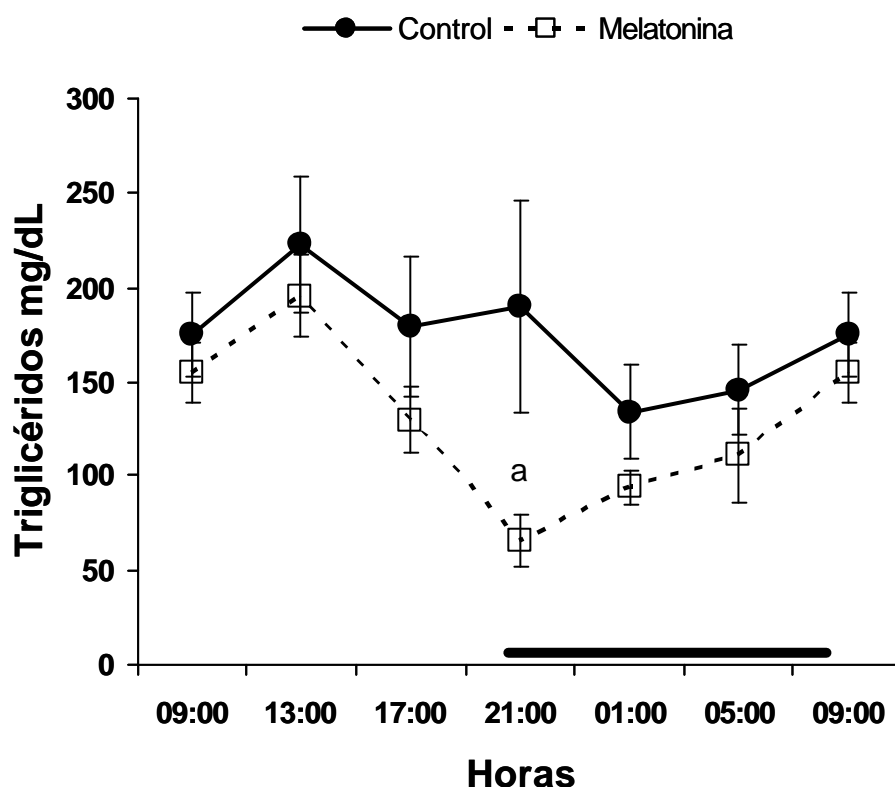
En el grupo control, los niveles plasmáticos de colesterol, no presentan diferencias significativas de los valores obtenidos en la fase luminosa del fotoperiodo con respecto al periodo oscuro. Sin embargo, en el grupo tratado con melatonina, se produce un aumento significativo de la concentración de los niveles plasmáticos de colesterol durante la fase oscura del fotoperiodo ( $F=4.614$   $p=0.042$ ), al compararlo con los valores obtenidos en la fase luminosa.

El tratamiento con melatonina, sin embargo, no modificó el valor medio diario de los niveles plasmáticos de colesterol con respecto al grupo control.

#### **Variaciones diarias de la concentración de triglicéridos en plasma**

El patrón diario de los niveles de triglicéridos en plasma de ratas macho adultas alimentadas con una dieta de mantenimiento y tratadas o no durante 9 semanas con melatonina se muestra en la gráfica 4.

El grupo control no presenta variaciones plasmáticas de triglicéridos a lo largo del día, mientras que el grupo tratado con melatonina sí presenta cambios diarios significativos ( $F=4,464$   $p=0,006$ ), con un mínimo a las 21:00 horas.

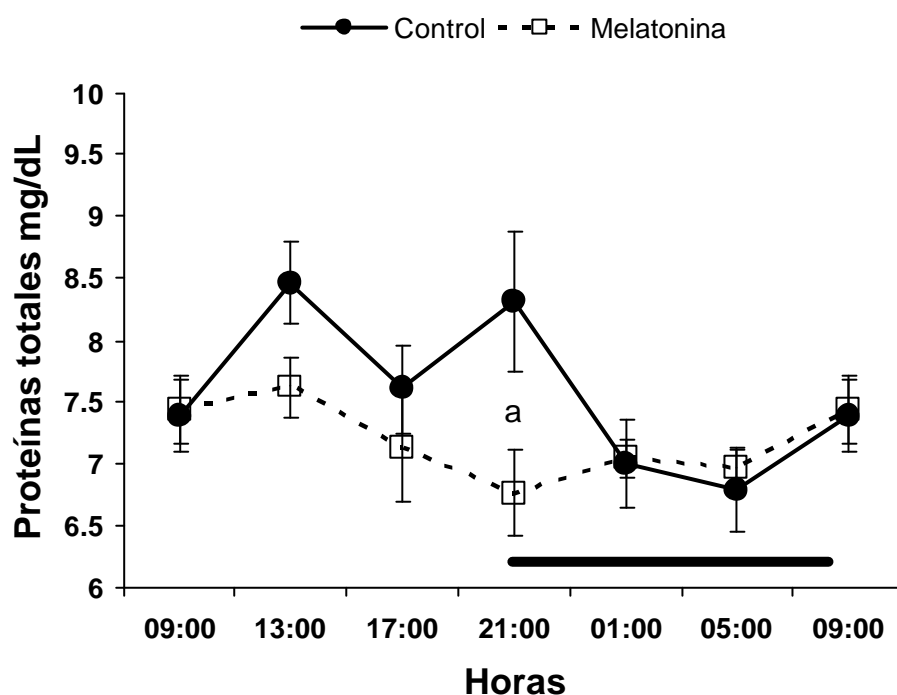


**Gráfica 4.** Patrón diario de los niveles de triglicéridos en plasma de ratas macho adultas alimentadas con una dieta control de mantenimiento, tratadas o no con melatonina durante 9 semanas. 8 ratas, por horario y grupo, se sacrificaron por decapitación en intervalos de 4 horas durante un ciclo de 24 horas, comenzando a las 09:00 horas. La barra indica la duración del periodo de oscuridad. Se muestran los valores medios  $\pm$  EEM. La letra indica la existencia de diferencias significativas ( $p<0,05$ ) entre los valores plasmáticos de triglicéridos de los grupos estudiados en un punto del horario (<sup>a</sup> grupo control frente al grupo tratado con melatonina). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía.

Los animales tratados con melatonina en el agua de bebida, presentan concentraciones plasmáticas de triglicéridos, inferiores durante la fase oscura, respecto a la fase luminosa ( $F=10,642$   $p=0,003$ ); no encontrándose diferencia, entre los valores medios de ambas fases del fotoperiodo, en el grupo control. Sin embargo, los niveles plasmáticos medios diarios de triglicéridos disminuyen significativamente en el grupo tratado con melatonina frente a los valores obtenidos en el grupo control ( $F=8,128$   $p=0,006$ ).

### Variaciones diarias en las concentraciones plasmáticas de proteínas totales

En la gráfica 5, se muestran las variaciones diarias de la concentración de proteínas totales en plasma de ratas macho adultas alimentadas con una dieta control, tratadas o no con melatonina durante 9 semanas.



**Gráfica 5.** Patrón diario de los niveles de proteínas totales en plasma de ratas macho adultas, alimentadas con una dieta control de mantenimiento, tratadas o no con melatonina, durante 9 semanas. 8 ratas, por horario y grupo, se sacrificaron por decapitación en intervalos de 4 horas durante un ciclo de 24 horas, comenzando a las 09:00 horas. La barra indica la duración del periodo de oscuridad. Se muestran los valores medios  $\pm$  EEM. La letra indica la existencia de diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) de los valores medios plasmáticos de proteínas totales entre los grupos estudiados en un punto del horario (<sup>a</sup> grupo control frente a grupo melatonina). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía.

El grupo control, mostró diferencias significativas en función del tiempo ( $F=3,256$   $p=0,022$ ) en la concentración plasmática de proteínas totales, con dos máximos a las 13:00 y a las 21:00 horas. Sin embargo, en el grupo tratado con melatonina, estas diferencias desaparecen.

El grupo tratado con melatonina, muestra diferencias significativas durante el fotoperiodo. Observándose una tendencia a la disminución en la concentración plasmática media de proteínas totales en el periodo oscuro del fotoperiodo, al compararlo con los valores obtenidos durante la fase luminosa ( $F=4,232$   $p=0,049$ ). El tratamiento con melatonina redujo la concentración media diaria del parámetro estudiado frente al grupo control ( $F=4,011$   $p=0,047$ ).

#### 4.1.6 Efecto de un tratamiento con melatonina, durante nueve semanas, sobre los niveles medios de concentración de hormonas en plasma, durante la fase luminosa y la fase oscura del fotoperiodo

En la Tabla 11, se presentan los niveles plasmáticos medios obtenidos durante la fase luminosa y la fase oscura del fotoperiodo de insulina, leptina y adiponectina, en ratas macho adultas, tratadas o no con melatonina durante 9 semanas y alimentadas con una dieta de mantenimiento.

**Tabla 11.** Se muestran los valores medios  $\pm$  EEM de los niveles de concentración plasmática de insulina, leptina y adiponectina, durante la fase luminosa y la fase oscura del fotoperiodo, de los grupos estudiados.

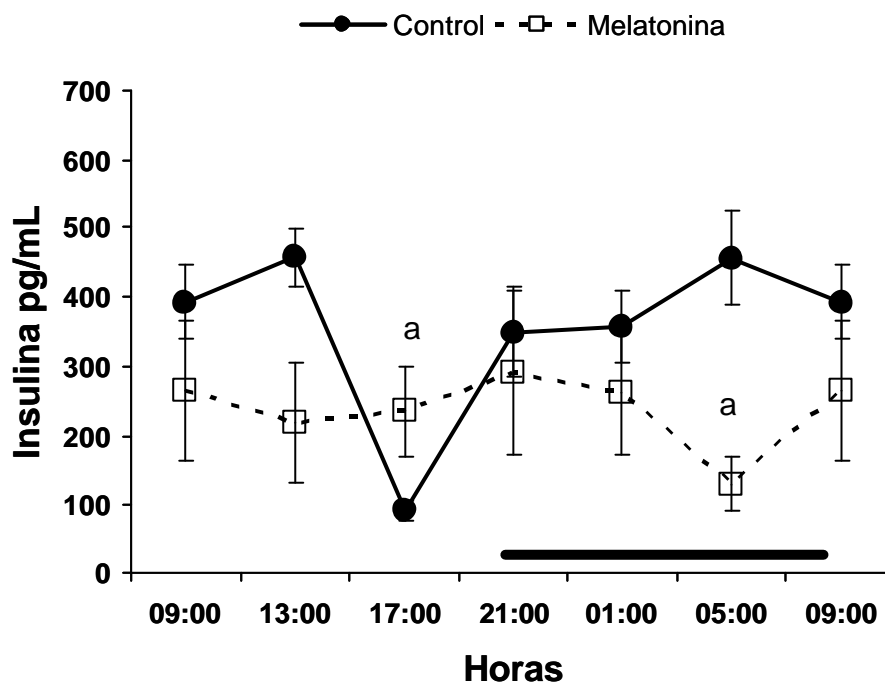
	Control		Melatonina	
	Día	Noche	Día	Noche
Insulina pg/mL	329,29 $\pm$ 39	392,68 $\pm$ 35,78	239,06 $\pm$ 45,7	224,12 $\pm$ 48,48
Leptina pg/mL	6318,27 $\pm$ 452,25	6372,41 $\pm$ 490,05	8079,76 $\pm$ 756,35	7341,83 $\pm$ 484
Adiponectina pg/mL	28,06 $\pm$ 2,96	26,55 $\pm$ 1,97	26,56 $\pm$ 4,27	33,59 $\pm$ 4

#### 4.1.7 Efecto de un tratamiento con melatonina, durante nueve semanas, sobre las variaciones diarias en los niveles de concentración plasmática de insulina, leptina y adiponectina

##### **Variaciones diarias de las concentraciones plasmáticas de insulina**

En la gráfica 6, se muestra el patrón de concentración de los niveles plasmáticos de insulina en ratas macho adultas alimentadas con una dieta de mantenimiento, tratadas o no, durante 9 semanas con melatonina.

La concentración plasmática de insulina en el grupo control varía significativamente a lo largo del día ( $F=12,318$   $p<0,001$ ), con un mínimo a las 17:00 horas. Sin embargo, el grupo tratado con melatonina no presenta variaciones diarias significativas.



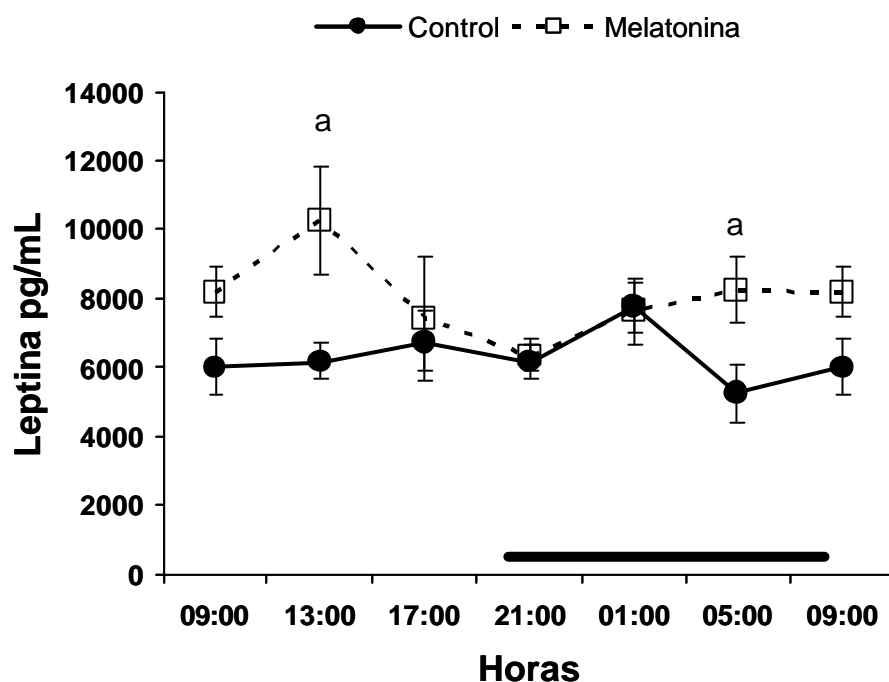
**Gráfica 6** Variaciones diarias de la concentración de insulina plasmática en ratas macho adultas, alimentadas con una dieta control de mantenimiento, tratadas o no durante 9 semanas con melatonina. 8 animales por horario y grupo, se sacrificaron por decapitación en intervalos de 4 horas durante un ciclo de 24 horas, comenzando a las 09: 00 horas. La barra indica la duración del periodo de oscuridad. Se muestran las medias  $\pm$  EEM. Las letras indican la existencia de diferencias significativas ( $p<0,05$ ) en la concentración de insulina entre los dos grupos de animales estudiados en un punto del horario (<sup>a</sup> grupo control frente al grupo tratado con melatonina). Los análisis estadísticos se realizaron con ANOVA de una vía.

Ninguno de los grupos muestra diferencias significativas entre los niveles medios de insulina en la fase luminosa y la fase oscura del fotoperiodo. Sin embargo, al considerar los valores medios diarios se observa un efecto inhibitorio en los animales tratados con melatonina, al compararlos con los valores del grupo control ( $F= 8,893$   $p=0,004$ ).

### Variaciones diarias de las concentraciones plasmáticas de leptina

Las concentraciones a lo largo del día, de los niveles plasmáticos de leptina en plasma de ratas macho adultas alimentadas con una dieta de mantenimiento, tratadas o no con melatonina durante 9 semanas, se muestran en la gráfica 7.

No se observan variaciones significativas en las concentraciones circulantes de leptina en función del tiempo, en ninguno de los grupos estudiados.



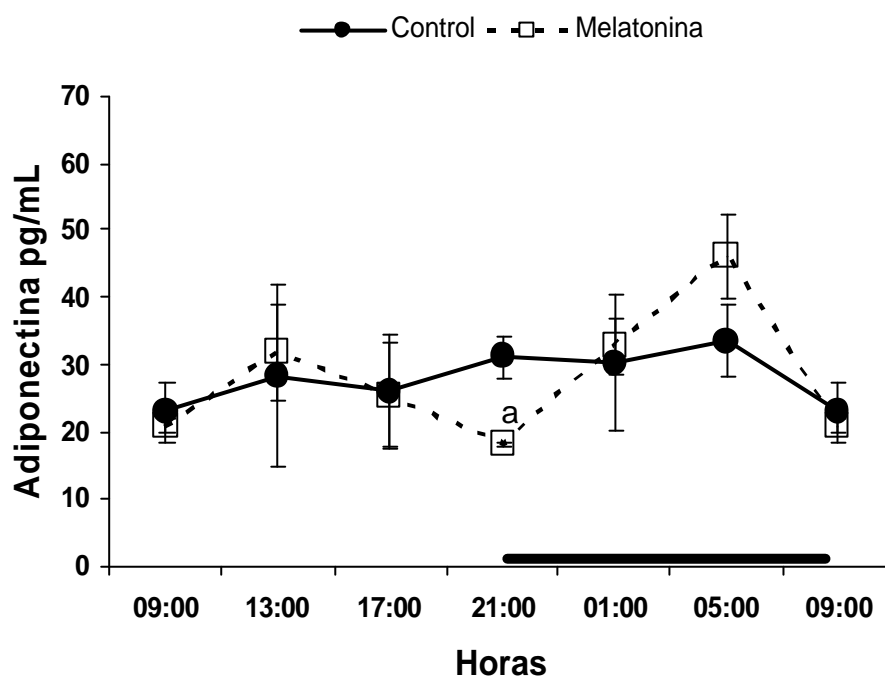
**Gráfica 7.** Se muestran los cambios diarios en niveles plasmáticos de leptina, a lo largo del día, en ratas macho adultas alimentadas con una dieta control de mantenimiento, tratadas o no con melatonina durante 9 semanas. 8 ratas, por horario y grupo, se sacrificaron por decapitación en intervalos de 4 horas durante un ciclo de 24 horas, empezando a las 09:00 horas. La barra indica la duración del periodo de oscuridad. Se muestran las medias  $\pm$  EEM. Las letras indican la existencia de diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) de las concentraciones de leptina plasmática entre los grupos estudiados en un punto horario ( $\hat{p}$  grupo control frente al grupo tratado con melatonina). Los análisis estadísticos se realizaron con ANOVA de una vía.

No se registraron diferencias significativas en los valores medios de concentración de la hormona entre la fase luminosa y la fase oscura del fotoperiodo en los dos grupos de animales tratados.

Sin embargo, el tratamiento con melatonina en el agua de bebida, produjo un aumento significativo de los valores medios diarios de leptina frente al grupo control ( $F= 5,45$   $p=0,022$ ).

### Variaciones diarias de la concentración plasmática de adiponectina

En la gráfica 8, se muestra el patrón diario de las concentraciones plasmáticas de adiponectina en ratas macho adultas, alimentadas con una dieta control de mantenimiento, tratadas o no con melatonina durante 9 semanas.



**Gráfica 8** Cambios diarios en los niveles plasmáticos de adiponectina en ratas macho adultas, alimentadas con una dieta control de mantenimiento, tratadas o no con melatonina durante 9 semanas. 8 ratas por horario y grupo se sacrificaron por decapitación en intervalos de 4 horas durante un ciclo de 24 horas, comenzando a las 09:00 horas. La barra indica la duración del periodo de oscuridad. Se muestran las medias  $\pm$  EEM. La letra indica la existencia de diferencias significativas ( $p<0,05$ ) entre las concentraciones de adiponectina entre los grupos de animales estudiados en un punto del horario (<sup>a</sup> grupo control frente al grupo tratado con melatonina). Los análisis estadísticos se realizaron con ANOVA de una vía.

En el grupo control, la concentración circulante de adiponectina no presenta variaciones significativas a lo largo del día. Sin embargo, la concentración de este parámetro sí muestra diferencias significativas en el grupo tratado con melatonina ( $F=2,772$   $p=0,048$ ), con un máximo a las 05:00 horas.

Las concentraciones de adiponectina en plasma, no muestran diferencias significativas en el grupo control de la hormona de las dos fases del fotoperiodo ni en sus niveles medios diarios tanto en animales controles como tratados con melatonina.

#### 4.1.8 Efecto de un tratamiento con melatonina, durante nueve semanas, sobre los niveles de expresión génica relativa de genes, en hipotálamo medio basal, durante la fase luminosa y la fase oscura del fotoperiodo

En la Tabla 12, se presenta los niveles medios de expresión génica relativa de los genes NPY, POMC, PrRP, LepR, IR, IRS-1 y IRS-2, en hipotálamo medio basal, obtenidos durante la fase luminosa y la fase oscura del fotoperiodo, en ratas macho adultas, tratadas o no con melatonina durante 9 semanas y alimentadas con una dieta de mantenimiento.

**Tabla 12.** Se presentan los niveles de expresión relativa de los genes en estudio, en hipotálamo medio basal, en ratas macho adultas, alimentadas con dieta de mantenimiento, tratadas o no con melatonina durante 9 semanas. Se muestran los valores medios  $\pm$  EEM. Se representa en negritas las diferencias significativas entre los valores obtenidos en la fase luminosa y en la fase oscura del fotoperiodo de cada grupo.

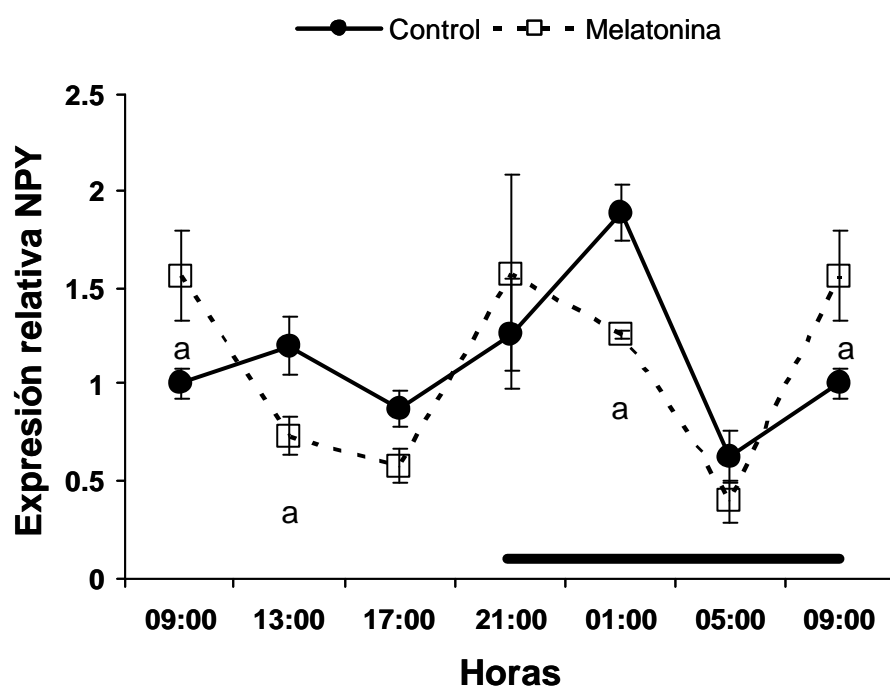
Expresión relativa	Control		Melatonina	
	Día	Noche	Día	Noche
Neuropéptido Y (NPY)	1,01 $\pm$ 0,06	1,21 $\pm$ 0,17	0,983 $\pm$ 0,14	0,9379 $\pm$ 0,116
Proopiomelanocortina (POMC)	<b>1,56 <math>\pm</math> 0,18</b>	<b>3,44 <math>\pm</math> 0,4</b>	1,62 $\pm$ 0,16	1,62 $\pm$ 0,27
Péptido regulador Secretor de Prolactina ( PrRP)	<b>1,10 <math>\pm</math> 0,10</b>	<b>2,68 <math>\pm</math> 0,175</b>	1,42 $\pm$ 0,144	1,72 $\pm$ 0,144
Receptor de leptina (LepR)	<b>1,78 <math>\pm</math> 0,20</b>	<b>3,616 <math>\pm</math> 0,50</b>	2,41 $\pm$ 0,18	2,87 $\pm$ 0,26
Receptor de Insulina (IR)	<b>0,96 <math>\pm</math> 0,13</b>	<b>1,57 <math>\pm</math> 0,25</b>	0,783 $\pm$ 0,179	0,6257 $\pm$ 0,069
Sustrato del Receptor de Insulina-1 (IRS-1)	1,10 $\pm$ 0,15	1,028 $\pm$ 0,17	1,059 $\pm$ 0,17	1,07 $\pm$ 0,18
Sustrato del Receptor de Insulina-1 (IRS-2)	<b>0,856 <math>\pm</math> 0,15</b>	<b>1,70 <math>\pm</math> 0,10</b>	<b>0,7604 <math>\pm</math> 0,15</b>	<b>1,18 <math>\pm</math> 0,085</b>

#### 4.1.9 Efecto de un tratamiento con melatonina, durante nueve semanas, sobre las variaciones diarias en la expresión génica relativa de genes, en hipotálamo medio basal

##### *Variaciones diarias de la expresión génica relativa del Neuropeptido Y (NPY) en hipotálamo medio basal*

La expresión génica relativa de NPY en el hipotálamo medio basal de animales adultos alimentados con dieta de mantenimiento, tratadas o no con melatonina, durante 9 semanas, se muestra en la gráfica 9.

Los resultados muestran variaciones significativas, en función del tiempo, en los valores de expresión génica relativa de NPY de ambos grupos ( $F=6,188$   $p=0,001$  y  $F=1,288$   $p<0,001$ , grupo control y grupo tratado con melatonina respectivamente).



**Gráfica 9.** Diferencias en la expresión génica relativa de NPY, a lo largo del día, en hipotálamo medio basal de ratas macho adultas, alimentadas con una dieta de mantenimiento, tratadas o no con melatonina, durante 9 semanas. 8 ratas, por grupo y horario se sacrificaron por decapitación en intervalos de 4 horas durante un ciclo de 24 horas, comenzando a las 09:00 horas. La barra indica la duración del periodo de oscuridad. Se muestran las medias  $\pm$  EEM. Las letras indican la existencia de diferencias significativas ( $p<0,05$ ) en los valores de la expresión génica relativa de NPY, entre los grupos de animales estudiados en un horario del fotoperiodo (<sup>a</sup> grupo control frente al grupo tratado con melatonina). Los análisis estadísticos se realizaron con un ANOVA de una vía.

En el grupo control el patrón diario de expresión relativa de este gen muestra un máximo a las 01:00 horas, mientras que los animales tratados con melatonina se produce un adelanto de fase de 4 horas, del valor máximo, hasta las 21:00 horas.

No se observaron diferencias significativas en la expresión génica relativa media de NPY en función de las fases del fotoperiodo en ninguno de los grupos estudiados. Tampoco se encontraron diferencias en los valores medios diarios de este gen medidos en el grupo tratado con melatonina al compararlos con los valores medidos en el grupo control.

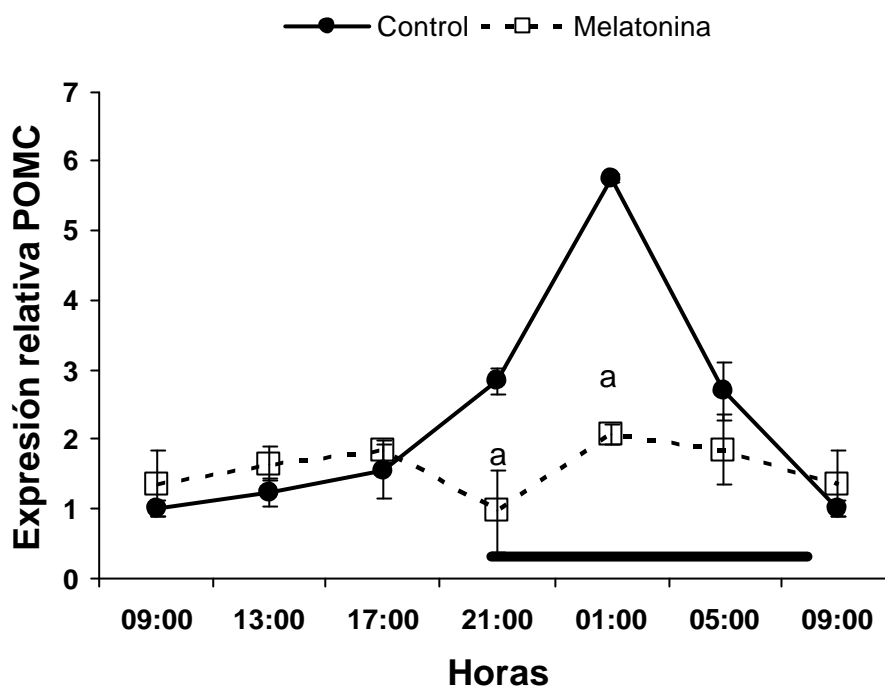
### ***Variaciones diarias de la expresión génica relativa de Proopiomelanocortina (POMC) en hipotálamo medio basal***

La Gráfica 10, muestra el patrón diario de los niveles de expresión génica relativa de POMC en hipotálamo medio basal de ratas macho adultas, alimentadas con una dieta de mantenimiento, tratadas o no con melatonina durante 9 semanas.

Los niveles relativos de la expresión génica relativa de POMC en el hipotálamo medio basal varían a lo largo del día en el grupo control ( $F= 23,863$   $p<0,001$ ), con un máximo a las 01:00 horas, no mostrando estas diferencias, en función del tiempo, el grupo tratado con melatonina.

Durante la fase oscura del fotoperiodo, se observa en el grupo control, un incremento significativo en los valores de expresión génica relativa media del neuropéptido ( $F=17,858$   $p<0,05$ ), al compararlo con los valores obtenidos en la fase luminosa. Sin embargo, no se detectaron diferencias de valores medios entre el periodo luminoso y el oscuro del fotoperiodo, en el grupo tratado con melatonina

Los valores medios de la expresión génica relativa diaria de POMC disminuyen significativamente en el grupo tratado con melatonina frente al grupo control no tratado ( $F= 7,419$   $p=0,009$ ).



**Gráfica 10.** Expresión relativa del gen POMC en el hipotálamo medio basal de ratas macho adultas, alimentadas con una dieta de mantenimiento, tratadas o no con melatonina, durante 9 semanas. 8 ratas, por horario y grupo, se sacrificaron por decapitación en intervalos de 4 horas durante un ciclo de 24 horas, comenzando a las 09:00 horas. La barra indica la duración del periodo de oscuridad. Se muestran las medias  $\pm$  EEM. Las letras indican la existencia de diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en los valores de la expresión génica relativa de POMC (el grupo control frente al grupo tratado con melatonina) entre los grupos experimentales en un punto horario del fotoperiodo. Los análisis estadísticos se realizaron con ANOVA de una vía.

### ***Variaciones diarias de la expresión génica relativa del Péptido regulador Secretor de Prolactina (PrRP) en hipotálamo medio basal***

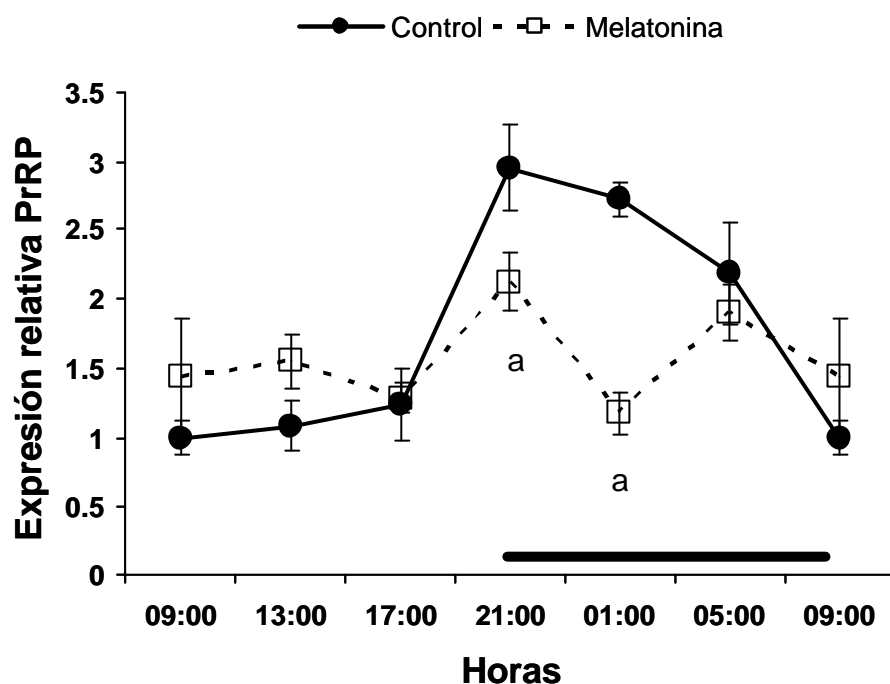
En la Gráfica 11, se muestran los patrones diarios de la expresión génica relativa de PrRP en el hipotálamo medio basal de animales adultos alimentados con dieta de mantenimiento, tratados con melatonina, durante 9 semanas.

Se muestran variaciones significativas de la expresión relativa del gen PrRP en función del tiempo tanto en animales controles como en los tratados con melatonina ( $F=13,406$   $p < 0,001$  y  $F=3,279$   $p < 0,05$ , respectivamente).

El grupo control muestra un patrón diario con valores máximos durante la fase oscura del fotoperiodo que se mantiene entre las 21:00 h y 05:00h, siendo las variaciones significativas en función del tiempo ( $F=58,849$   $p < 0,001$ ). Sin embargo,

en el grupo tratado con melatonina no se muestran diferencias significativas durante el fotoperiodo.

No se observaron diferencias significativas entre los valores medios de expresión relativa de PrRP hipotalámico de los dos grupos de animales estudiados. Sin embargo, puntualmente, los resultados muestran una disminución de la expresión relativa del gen PrRP en el grupo tratado con melatonina, a las 21:00 y 01:00 horas ( $F=4,906$   $p<0,05$ ,  $F=166,401$   $p<0,001$ ).



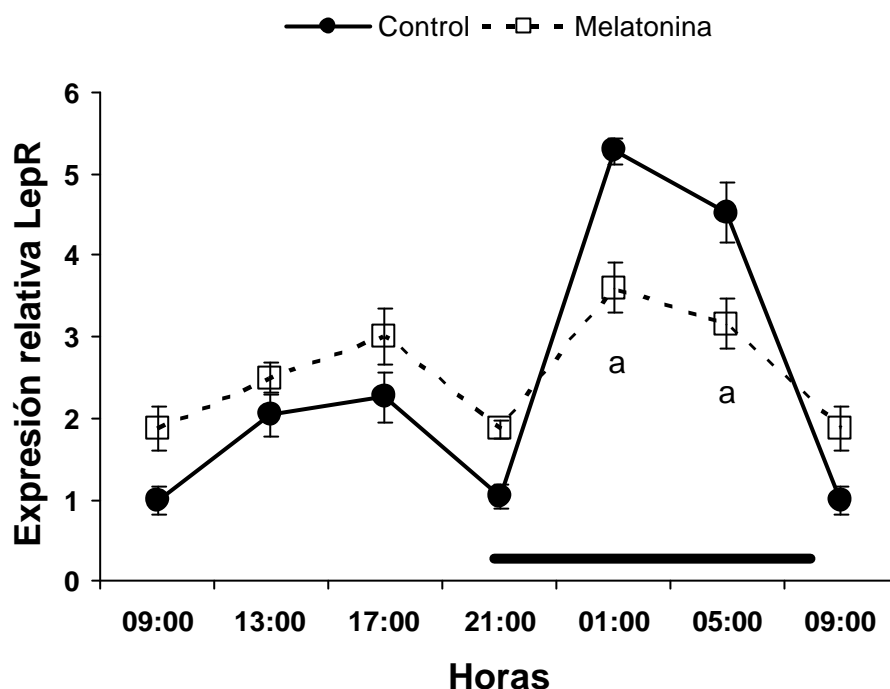
**Gráfica 11.** Diferencias de la expresión relativa del gen PrRP hipotalámico en ratas macho adultas, alimentadas con una dieta de mantenimiento, tratadas o no con melatonina, durante 9 semanas. 8 ratas se sacrificaron por decapitación en intervalos de 4 horas durante un ciclo de 24 horas, comenzando a las 09:00 horas. La barra indica la duración del periodo de oscuridad. Se muestran las medias  $\pm$  EEM. Las letras indican la existencia de diferencias significativas ( $p<0,05$ ) en la expresión génica relativa, entre los grupos de animales tratados en un horario del fotoperiodo (<sup>a</sup> grupo control frente a grupo melatonina). Los análisis estadísticos se realizaron con ANOVA de una vía, seguidos de un test de Bonferroni de comparación.

### ***Variaciones diarias en la expresión génica relativa del Receptor de Leptina (LepR) en hipotálamo medio basal***

Las variaciones diarias en la expresión génica relativa de LepR en el hipotálamo medio basal de ratas macho adultas, alimentadas con una dieta de

mantenimiento, tratadas o no con melatonina, durante 9 semanas, se muestran en la gráfica 12.

En ella, se observa una variación significativa de la expresión relativa de este gen en función del tiempo, tanto en animales control como en los tratados con melatonina ( $F=47,551$   $p<0,0001$  y  $F=6,751$   $p=0,001$ , respectivamente).



**Gráfica 12.** Expresión relativa del gen *LepR* en el hipotálamo medio basal de ratas macho adultas, alimentadas con una dieta de mantenimiento, tratadas o no con melatonina, durante 9 semanas. 8 ratas, por horario y grupo, se sacrificaron por decapitación en intervalos de 4 horas durante un ciclo de 24 horas, comenzando a las 09:00 horas. La barra indica la duración del periodo de oscuridad. Se muestran las medias  $\pm$  EEM. Las letras indican la existencia de diferencias significativas ( $p<0,05$ ) en la expresión génica relativa, entre los grupos de animales estudiado en un punto del horario (<sup>a</sup> grupo control frente al grupo tratado con melatonina). Los análisis estadísticos se realizaron con ANOVA de una vía.

El grupo control presenta un patrón diario de expresión relativa del *LepR*, con valores máximos entre las 01:00 y las 05:00 horas. Sin embargo, en el grupo tratado con melatonina, la expresión relativa de este parámetro muestra dos mínimos a las 09:00 y a las 21:00 horas.

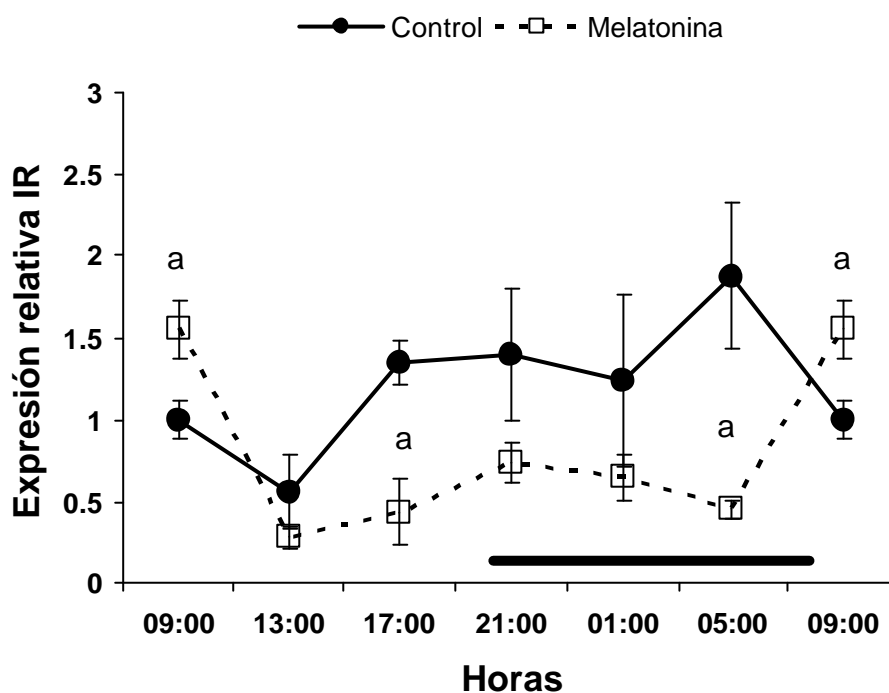
El grupo control muestra un incremento significativo en la expresión media relativa de este gen durante la fase oscura del fotoperiodo con respecto a los valores obtenidos en la fase luminosa ( $F=3,953$   $p<0,05$ ). Sin embargo, en los animales

tratados con melatonina no se encuentran diferencias significativas entre las dos fases del fotoperiodo.

El tratamiento con melatonina, no modificó la expresión media relativa diaria del gen de LepR al compararla con la mostrada por el grupo control.

**Variaciones diarias de la expresión génica relativa del Receptor de Insulina (IR) en hipotálamo medio basal**

Los valores diarios de la expresión génica relativa de IR en el hipotálamo medio basal de los animales alimentados con dieta de mantenimiento, tratados o no con melatonina, durante 9 semanas se muestran en la gráfica 13.



**Gráfica 13.** Diferencias de la expresión relativa del gen IR en el hipotálamo medio basal de ratas macho Wistar, alimentadas con una dieta control de mantenimiento tratadas con melatonina. 8 ratas, por horario y grupo, se sacrificaron por decapitación en intervalos de 4 horas durante un ciclo de 24 horas, comenzando a las 09:00 horas. La barra indica la duración del periodo de oscuridad. Se muestran las medias ± EEM. Las letras indican la existencia de diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la expresión génica relativa de IR, entre los grupos de animales en un punto del horario (grupo control frente al grupo tratado con melatonina). Los análisis estadísticos se realizaron con ANOVA de una vía.

La expresión relativa del gen IR, de los animales control no presenta variaciones significativas en función del tiempo. Sin embargo, aparecen cambios significativos en función del tiempo en el grupo de animales tratados con melatonina, ( $F=11,564$   $p<0,001$ ).

El patrón de IR muestra un máximo a las 09:00 horas con valores bajos desde las 13:00 horas hasta las 05:00 horas en el grupo tratado con melatonina mientras que el grupo control muestra tendencias opuestas.

Los animales control presentan una mayor expresión relativa media de este gen durante el fotoperiodo oscuro comparado con los valores obtenidos durante la fase luminosa ( $F=4,895$   $p<0,05$ ), mientras que el grupo tratado con melatonina, no muestra diferencias significativas de los valores medios de expresión génica de IR en ambas fases del fotoperiodo.

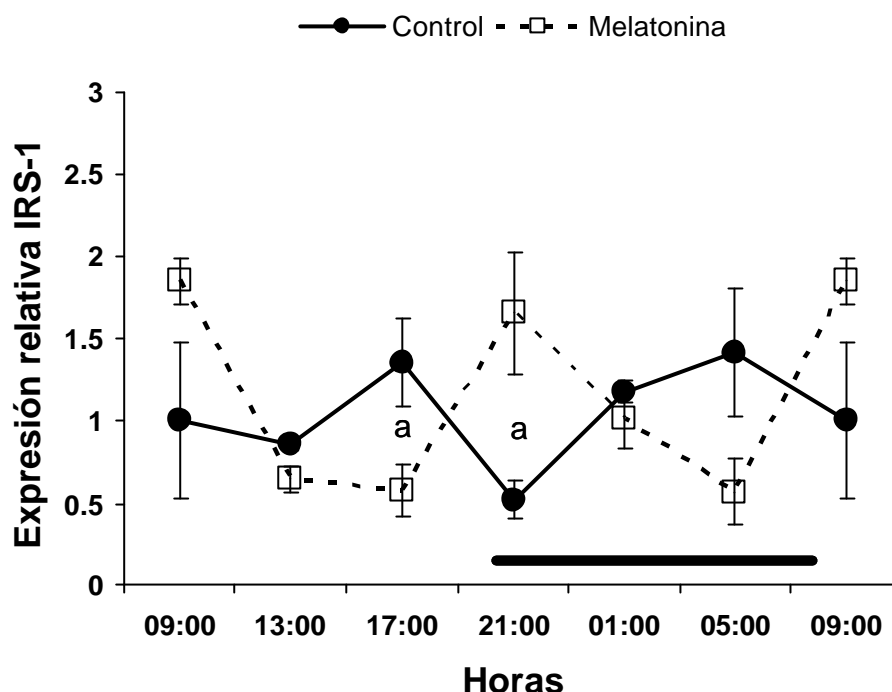
Los animales tratados con melatonina, muestran valores diarios medios menores en la expresión relativa de IR al compararlos con los valores obtenidos en el grupo control ( $F= 9,612$   $p=0,003$ ).

#### ***Variaciones diarias de la expresión génica relativa del Sustrato del Receptor de Insulina-1 (IRS-1) en hipotálamo medio basal***

Las diferencias diarias en la expresión relativa de IRS-1 en el hipotálamo medio basal de ratas macho adultas alimentadas con una dieta de mantenimiento, tratadas o no con melatonina, durante 9 semanas, se muestra en la gráfica 14.

Los resultados no muestran variaciones significativas en la expresión relativa del gen IRS-1 en función del tiempo en el grupo control. Sin embargo estas diferencias aparecen en el grupo tratado con melatonina ( $F=8,651$   $p<0,0001$ ), con dos valores máximos a las 09:00 y a las 21:00 horas.

Los grupos experimentales, no mostraron diferencias significativas entre las medias de valores en los fotoperiodos oscuro y luminoso. Tampoco se observaron diferencias significativas entre los valores medios diarios de la expresión génica relativa de IRS-1 entre los grupos estudiados

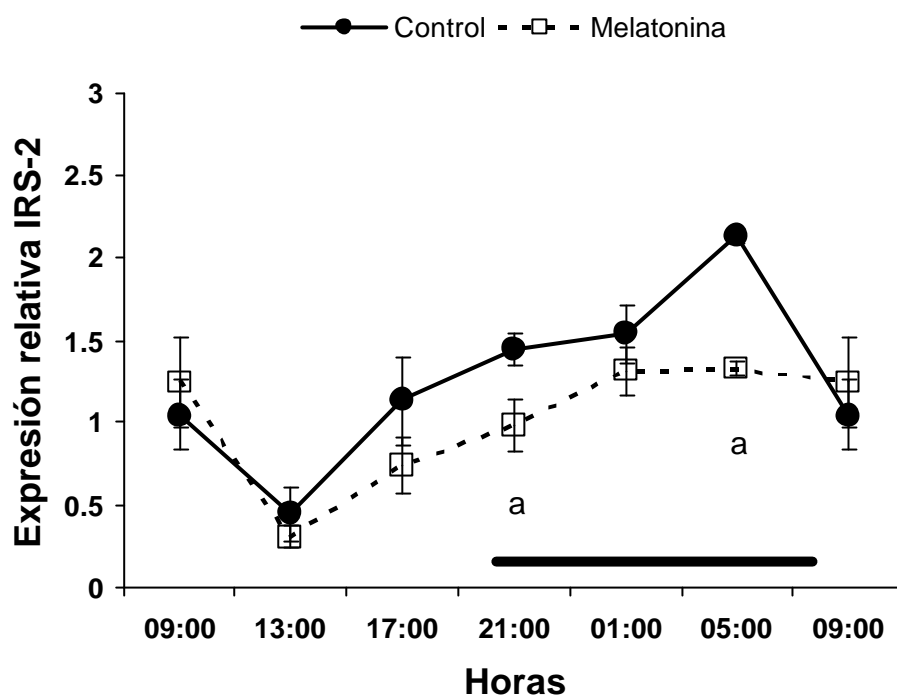


**Gráfica 14.** Diferencias de la expresión relativa del gen IRS-1 hipotalámico en ratas macho adultas, alimentadas con una dieta de mantenimiento, tratadas o no con melatonina, durante 9 semanas. 8 ratas, por grupo y horario, se sacrificaron por decapitación en intervalos de 4 horas durante un ciclo de 24 horas, comenzando a las 09:00 horas. La barra indica la duración del periodo de oscuridad. Se muestran las medias  $\pm$  EEM. Las letras indican la existencia de diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la expresión génica relativa, entre los grupos estudiados en un horario del fotoperiodo (<sup>a</sup> grupo control frente al grupo tratado con melatonina). Los análisis estadísticos se realizaron con ANOVA de una vía.

#### ***Variaciones diarias en la expresión génica relativa de sustrato del Receptor de Insulina-2 (IRS-2) en hipotálamo medio basal***

El resultado del estudio de las variaciones diarias en la expresión relativa de IRS-2 en el hipotálamo medio basal de ratas macho adultas, alimentadas con dieta de mantenimiento, tratadas o no con melatonina, durante 9 semanas se muestra en la gráfica 15.

Los resultados muestran variaciones significativas de la expresión relativa del gen IRS-2 en función del tiempo tanto en animales controles como en los tratados con melatonina ( $F=10,864$   $p < 0,0001$  y  $F=8,151$   $p < 0,0001$ , respectivamente). Ambos grupos presentan patrones similares de expresión relativa de IRS-2 a lo largo del día, con un mínimo a las 13:00 horas. Además, en el grupo control aparece un máximo de expresión de este gen a las 05:00 horas.



**Gráfica 15.** Diferencias en la expresión relativa de IRS-2 hipotalámico en ratas macho adultas, alimentadas con una dieta de mantenimiento, tratadas o no con melatonina, durante 9 semanas. Ocho ratas por horario y grupo, se sacrificaron por decapitación durante 24 horas, comenzando a las 09:00 horas. La barra indica la duración del periodo de oscuridad. Se muestran las medias  $\pm$  EEM. Las letras indican la existencia de diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la expresión génica relativa, entre los grupos de animales estudiados en un punto del horario del fotoperiodo (<sup>a</sup> grupo control frente al grupo tratado con melatonina). Los análisis estadísticos se realizaron con ANOVA de una vía, seguidos de un test de Bonferroni de comparación múltiple.

En el grupo control se muestra un incremento en la expresión génica relativa media en la fase oscura del fotoperiodo al compararlo con el valor obtenido en la fase luminosa ( $F=20,932$   $p < 0,0001$ ). Este mismo efecto se muestra en el grupo tratado con melatonina aunque es de menor entidad ( $F= 5,757$   $P < 0,05$ ).

El tratamiento con melatonina durante 9 semanas, reduce significativamente la expresión relativa de los valores medios diarios del gen IRS-2 ( $F=4,486$   $p=0,039$ ).



## Bloque 2

### **4.2 Efecto de un tratamiento con melatonina, durante 11 semanas, en ratas macho adultas alimentadas con una dieta hipergrasa**

#### **4.2.1 Ingesta de alimentos y consumo de agua**

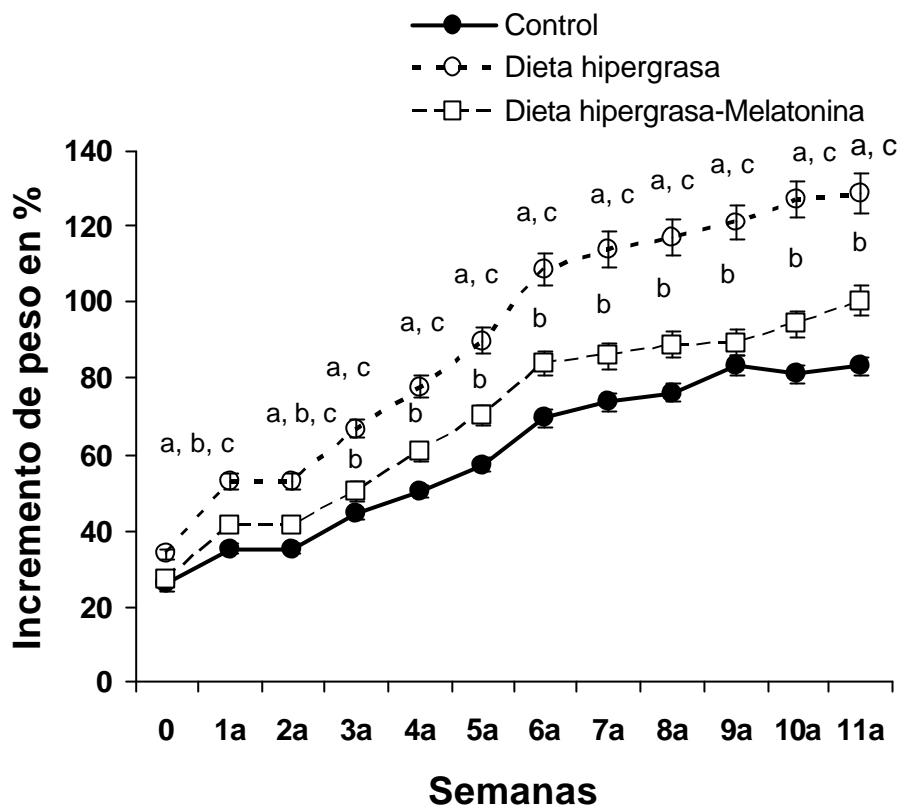
Para la realización del presente estudio, se utilizó una dieta de mantenimiento estándar, que aportó 2,9 Kilocalorías/gramo ingerido, que corresponde al grupo control; y una dieta hipergrasa que aportó un contenido calórico de 5,4 Kilocalorías/gramo ingerido, para el grupo de ratas obesas.

No se encontraron diferencias en la cantidad de comida ingerida ni por el grupo control ( $18 \pm 1$  gramos/día) ni el que tomaba una dieta hipergrasa ( $20 \pm 2$  gramos/día). Como ya se describía en el apartado anterior, el tratamiento con melatonina no modificó la cantidad de comida ingerida ni en el grupo control ( $19 \pm 2$  gramos/día) ni en el grupo alimentado con la dieta hipergrasa ( $20 \pm 1$  gramos/día).

Por otro lado, el que no hubiese diferencias en la cantidad de ingesta de alimentos, entre los grupos en estudio, se acompañó de un volumen similar de agua ingerida por los dos grupos. De hecho, los animales controles tomaron  $18 \pm 1$  mL/día mientras que las ratas que tomaban la dieta hipergrasa bebieron  $20 \pm 1$  mL/día. El tratamiento con melatonina en ambos grupos no modificó el volumen de agua/día ( $18 \pm 2$  y  $20 \pm 2$  mL/día, respectivamente).

#### **4.2.2 Efecto de un tratamiento con melatonina, durante once semanas sobre la evolución semanal del peso**

En la gráfica 16, se muestra el incremento en porcentaje del peso corporal en ratas macho adultas alimentadas con una dieta de mantenimiento o con una dieta hipergrasa, tratadas o no en paralelo con melatonina en el agua de bebida, durante 11 semanas.



**Gráfica 16.** Incremento del peso en ratas macho adultas, alimentadas con una dieta control (4% grasa) o una dieta alta en grasa (35%), tratadas o no en paralelo con melatonina durante 11 semanas. Se muestran los valores de cada grupo, como la media  $\pm$  EEM. Las letras indican la existencia de diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) del incremento de peso entre los grupos de animales analizados en cada semana. 48 animales por grupo. (<sup>a</sup> grupo control comparado con el grupo alimentado con dieta hipergrasa, <sup>b</sup> grupo control frente a grupo alimentado con dieta hipergrasa tratado con melatonina y <sup>c</sup> grupo alimentado con una dieta hipergrasa comparado con el grupo alimentado con dieta hipergrasa tratado con melatonina). El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA univariante. Posteriormente, un test de Bonferroni de comparación múltiple.

La ingesta de una dieta con un contenido en grasa alto, indujo un incremento significativo del peso corporal porcentual desde el comienzo del experimento (<sup>a</sup>  $F=14,1$   $p=0,0001$ ), respecto a los datos obtenidos en el grupo control. El incremento de peso porcentual, llegó a ser de hasta un 55% de aumento comparado con los valores mostrados en las ratas control a las 11 semanas de comenzar a tomar la dieta hipergrasa. Sin embargo, los animales que ingirieron dieta hipergrasa en paralelo con la administración de melatonina en el agua de bebida, redujeron la ganancia de peso corporal desde la segunda

semana del tratamiento, comparado con los incrementos de peso porcentual medidos en los animales que ingirieron solo dieta hipergrasa, siendo visible esta disminución hasta la semana 11, después del comienzo del diseño experimental. Los valores de incremento de peso, obtenidos en el grupo de ratas alimentadas con una dieta hipergrasa, tratadas con melatonina, permanecen elevados con respecto al grupo control (<sup>b</sup> F=13,73 p<0,01), aunque las diferencias son menos evidentes que cuando se compara con el grupo con dieta hipergrasa.

**4.2.3. Efecto de un tratamiento con melatonina, durante once semanas, sobre los niveles medios de concentración de glucosa en sangre y colesterol, triglicéridos y proteínas totales en plasma durante la fase luminosa y la fase oscura del fotoperiodo**

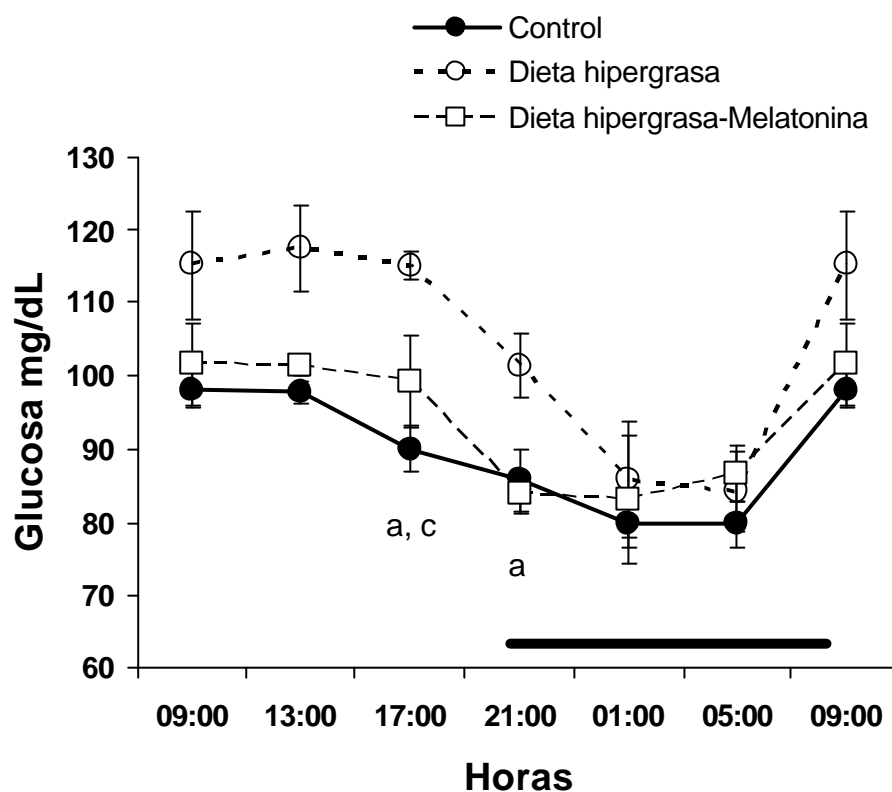
Se presenta la concentración media obtenida durante la fase luminosa y la fase oscura del fotoperiodo de glucosa en sangre, colesterol, triglicéridos y proteínas totales en plasma, en ratas macho adultas, tratadas o no en paralelo con melatonina durante 11 semanas y alimentadas con una dieta de mantenimiento (Tabla 13).

**Tabla 13.** Valores medios  $\pm$  EEM de los niveles plasmáticos de los parámetros plasmáticos estudiados. Se representa en negritas las diferencias significativas entre los valores obtenidos en la fase luminosa y en la fase oscura del fotoperiodo de cada grupo, detalladas en los siguientes apartados.

	Control		Dieta hipergrasa		Dieta hipergrasa-Melatonina	
	Día	Noche	Día	Noche	Día	Noche
<b>Glucosa mg/dl</b>	<b>95,33<math>\pm</math>2,20</b>	<b>78,53<math>\pm</math>2,41</b>	<b>115,86<math>\pm</math>3,04</b>	<b>90,92<math>\pm</math>3,97</b>	<b>101,4<math>\pm</math>2,79</b>	<b>84,5<math>\pm</math>3,18</b>
Colesterol mg/dL	71,09 $\pm$ 4,34	63,28 $\pm$ 3,9	121,14 $\pm$ 6,25	120,55 $\pm$ 6,58	89,12 $\pm$ 2,69	91,52 $\pm$ 2,83
Triglicéridos mg/dL	183,88 $\pm$ 16,97	155,59 $\pm$ 30	345,38 $\pm$ 25,8	395,54 $\pm$ 42,18	248,68 $\pm$ 31,47	232,35 $\pm$ 21,95
<b>Proteínas totales mg/dL</b>	<b>7,81<math>\pm</math>0,21</b>	<b>7,36<math>\pm</math>0,28</b>	<b>10,91<math>\pm</math>0,52</b>	<b>8,76<math>\pm</math>0,32</b>	<b>9,97<math>\pm</math>0,54</b>	<b>8,18<math>\pm</math>0,283</b>

#### 4.2.4 Efecto de un tratamiento con melatonina, durante once semanas sobre las variaciones diarias de los niveles sanguíneos de glucosa

La concentración de glucosa en sangre de los animales del grupo control y de los grupos con dieta alta en grasa tratados o no en paralelo con melatonina, durante 11 semanas, se presenta en la gráfica 17.



**Gráfica 17.** Patrón diario de los niveles de glucosa en sangre de ratas macho adultas, alimentadas con una dieta control y dieta hipergrasa. Un grupo de animales alimentados con dieta hipergrasa fueron tratados en paralelo con melatonina, durante 11 semanas. Ocho animales por cada horario y grupo se sacrificaron por decapitación en intervalos de 4 horas durante un ciclo de 24 horas, comenzando a las 09:00 horas. La barra indica la duración del periodo de oscuridad. Se muestran los valores medios  $\pm$  EEM de cada grupo. Las letras indican la existencia de diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) de los valores de glucosa entre los grupos de animales analizados en un punto horario (<sup>a</sup> grupo control comparado con el grupo alimentado con dieta hipergrasa, <sup>b</sup> grupo control frente a grupo alimentado con dieta hipergrasa tratado con melatonina y <sup>c</sup> grupo alimentado con una dieta hipergrasa comparado con el grupo alimentado con dieta hipergrasa tratado con melatonina). El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de una vía; seguido de un test de Bonferroni de comparación múltiple.

Se observa una variación significativa de los niveles sanguíneos de glucosa en función el tiempo, tanto en animales control, como en los animales alimentados con dieta alta en grasa tratados o no en paralelo con melatonina ( $F=15,244$   $p=0,001$ ,  $F=2,786$   $p=0,041$  y  $F=6,276$   $p=0,001$ , control, dieta hipergrasa tratadas o no en paralelo con melatonina respectivamente). El patrón diario de los niveles plasmáticos de glucosa es similar en los tres grupos de animales, con los valores más bajos entre las 01:00 y las 05:00 horas.

Las concentraciones medias de glucosa, durante la fase oscura del fotoperiodo, disminuyeron significativamente respecto a los valores medidos en el fotoperiodo luminoso en los tres grupos estudiados ( $F=55,003$   $p<0,001$ ,  $F=15,697$   $p<0,001$  y  $F=25,234$   $p<0,001$ , control, alimentadas con dieta hipergrasa tratadas o no en paralelo con melatonina, respectivamente).

Los animales alimentados con dieta hipergrasa, únicamente, muestran valores medios diarios circulantes de glucosa mayores, que el grupo control ( $F=24,697$   $p<0,001$ ). Sin embargo, la administración en paralelo de melatonina en el grupo de animales con dieta hipergrasa, disminuye significativamente la concentración plasmática de glucosa frente al grupo alimentado con una dieta hipergrasa únicamente ( $F=5,423$   $p=0,024$ ), hasta alcanzar valores próximos a los encontrados en los animales alimentados con una dieta de mantenimiento.

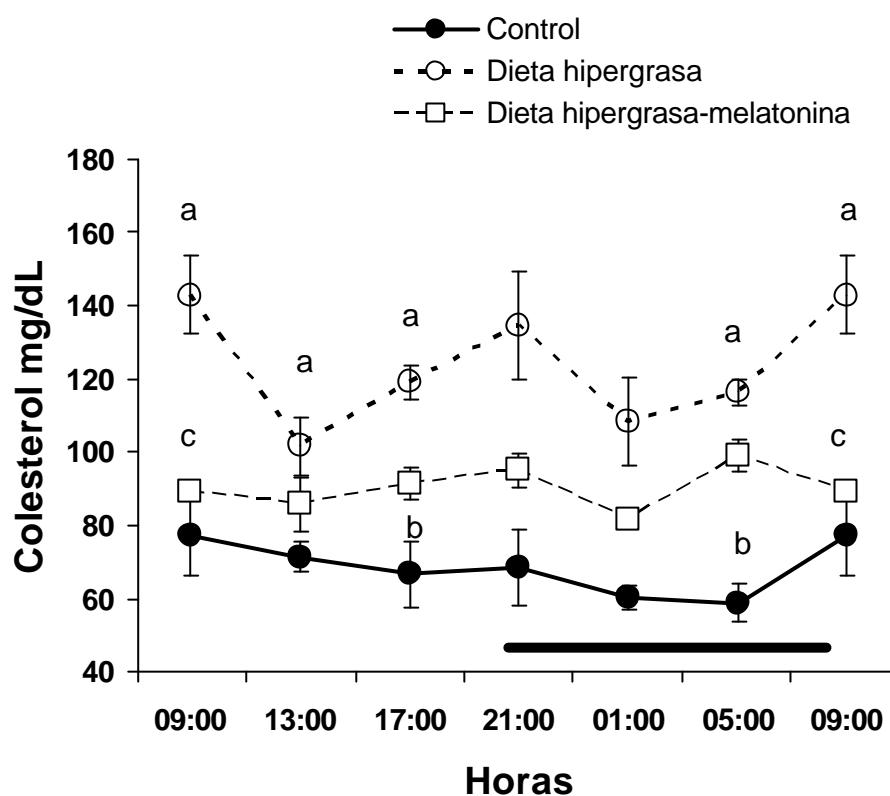
#### **4.2.5 Efecto de un tratamiento con melatonina, durante once semanas, en ratas macho adultas alimentadas con una dieta hipergrasa, sobre las variaciones diarias de las concentraciones plasmáticas de colesterol, triglicéridos y proteínas totales**

##### ***Variaciones diarias de los niveles plasmáticos de colesterol***

El patrón diario de los niveles de colesterol en plasma de ratas macho adultas, alimentadas con una dieta de mantenimiento o una dieta hipergrasa y un grupo de ratas alimentadas con una dieta hipergrasa y tratadas en paralelo con melatonina durante 11 semanas, se muestra en la gráfica 18.

El grupo control y el grupo alimentado con dieta hipergrasa tratado o no con melatonina, no presentan variaciones significativas de los niveles plasmáticos de colesterol en función del tiempo. Sin embargo, el grupo

alimentado con dieta hipergrasa únicamente, sí muestra diferencias significativas en función del tiempo ( $F=2,664$   $p=0,048$ ), y se observa un máximo de concentración, a las 09:00 horas.



**Gráfica 18.** Patrón diario de los niveles de colesterol en plasma de ratas macho adultas, alimentadas con una dieta control y dieta hipergrasa. Un grupo de animales alimentados con dieta hipergrasa fueron tratados en paralelo con melatonina, durante 11 semanas. Ocho animales por horario y grupo se sacrificaron por decapitación en intervalos de 4 horas durante un ciclo de 24 horas, comenzando a las 09:00 horas. La barra indica la duración del periodo de oscuridad. Se muestran los valores medios  $\pm$  EEM de cada grupo. Las letras indican la existencia de diferencias significativas ( $p<0,05$ ) de los valores de colesterol entre los grupos de animales analizados en un punto horario (<sup>a</sup> grupo control comparado con el grupo alimentado con dieta hipergrasa, <sup>b</sup> grupo control frente a grupo alimentado con dieta hipergrasa tratado con melatonina y <sup>c</sup> grupo alimentado con una dieta hipergrasa comparado con el grupo alimentado con dieta hipergrasa tratado con melatonina). El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de una vía, seguido de un test de Bonferroni de comparación múltiple.

Los grupos control y alimentados con dieta hipergrasa tratadas o no en paralelo con melatonina en el agua de bebida, no mostraron variaciones

significativas en la concentración plasmática media de colesterol entre las fases luminosa y oscura del fotoperiodo.

La ingesta de una dieta rica en grasa induce un aumento significativo de los niveles medios diarios circulantes de colesterol, frente al valor medido en el grupo control ( $F=97,945$   $p < 0,001$ ). Asimismo, los niveles plasmáticos medios diarios de colesterol en los animales alimentados con dieta hipergrasa, tratados en paralelo con melatonina muestran un incremento en los niveles plasmáticos frente al grupo control ( $F=37,195$   $p < 0,001$ ). Sin embargo, en este último grupo, el tratamiento con melatonina, disminuyó significativamente los valores medios diarios de colesterol, frente a los animales alimentados con dieta hipergrasa únicamente ( $F=37,499$   $p = < 0,001$ ). Como se observa en la gráfica el tratamiento con melatonina parcialmente normaliza los niveles circulantes de este parámetro.

### ***Variaciones diarias de la concentración de triglicéridos en plasma***

En la gráfica 19, se muestran los niveles de triglicéridos en plasma de ratas macho adultas alimentadas con una dieta de mantenimiento o con una dieta hipergrasa y un grupo de ratas alimentadas con dieta hipergrasa tratadas con melatonina durante 11 semanas.

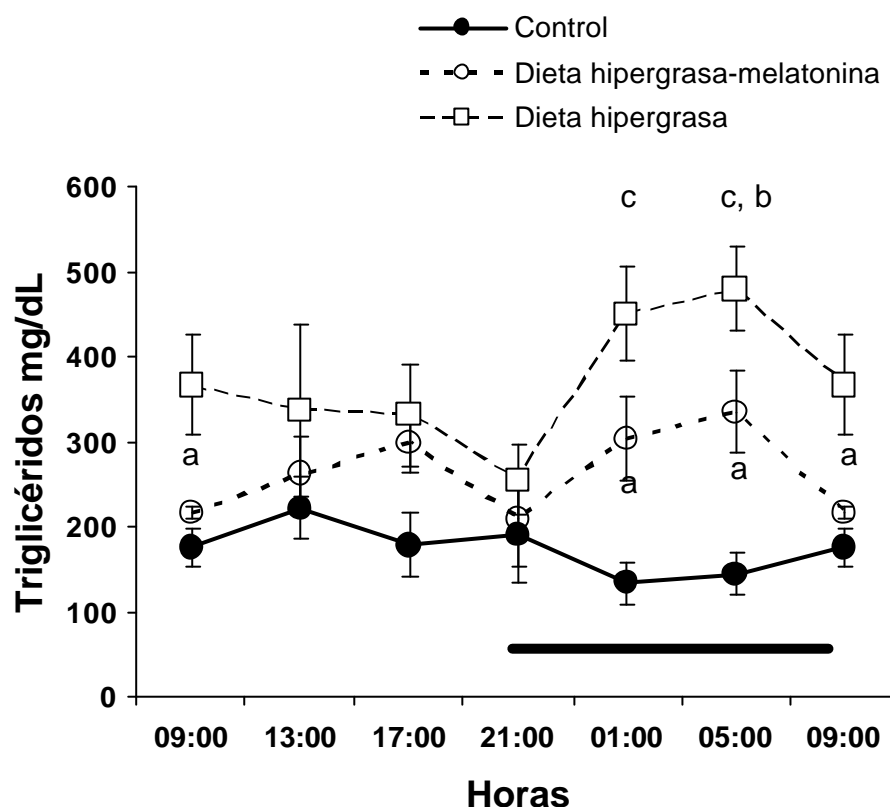
Ninguno de los grupos estudiados presentó variaciones plasmáticas de triglicéridos en función del tiempo.

El grupo alimentado con dieta hipergrasa y melatonina en el agua de bebida, muestra un incremento de los niveles del lípido en la fase oscura del fotoperiodo ( $F=5,937$   $p=0,022$ ), mientras que el grupo que solo ingirió dieta hipergrasa y los animales del grupo control, solo presentaron una tendencia al incremento de los niveles en el periodo oscuro, sin llegar a ser significativas estas diferencias.

Tampoco variaron los valores circulantes de triglicéridos en plasma al comparar la fase luminosa y la fase de oscuridad del fotoperiodo en los tres grupos experimentales.

La concentración media diaria de triglicéridos de los animales con dieta hipergrasa, tratados en paralelo o no con melatonina, aumentan significativamente frente a los valores obtenidos en el grupo control ( $F=45,708$

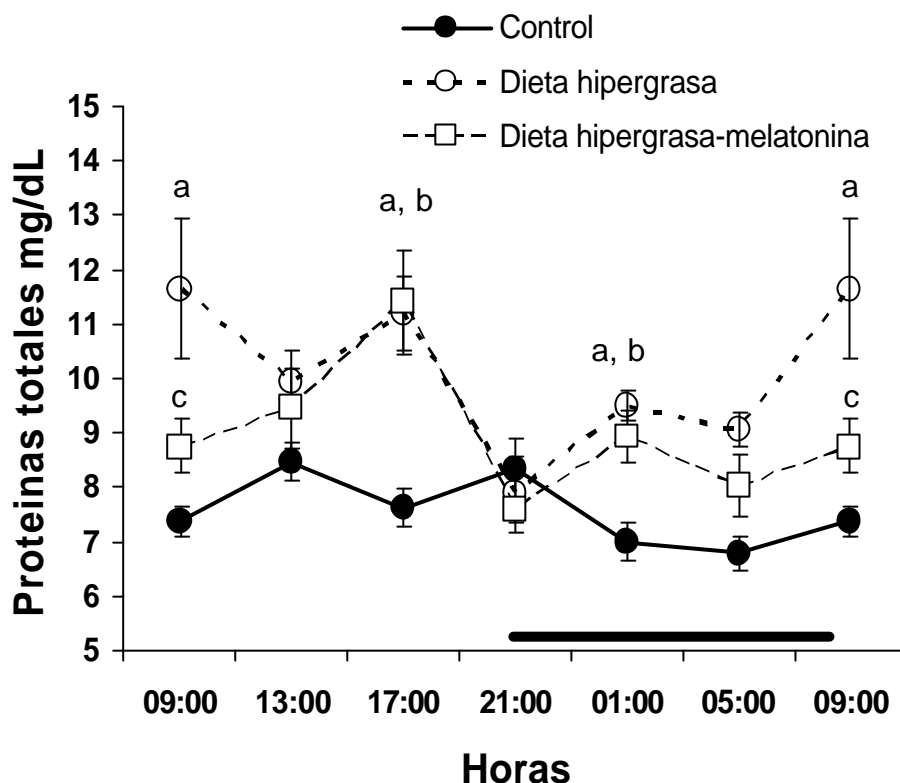
$p=0,000$  y  $F=7,881$   $p=0,007$ , respectivamente). No obstante, los animales alimentados con dieta hipergrasa y tratados en paralelo con melatonina, disminuyeron significativamente la concentración media de triglicéridos plasmáticos, frente al grupo alimentado con dieta hipergrasa únicamente ( $F=17,435$   $p<0,001$ ), indicando la existencia de una normalización parcial de los efectos deletéreos inducidos por la dieta hipergrasa.



**Gráfica 19.** Patrón diario de los niveles de triglicéridos en plasma de ratas macho adultas alimentadas con una dieta de mantenimiento o con una dieta alta en grasa y un grupo de ratas alimentadas con dieta hipergrasa y tratada en paralelo con melatonina, durante 11 semanas. Ocho animales por horario y grupo se sacrificaron por decapitación en intervalos de 4 horas durante un ciclo de 24 horas, comenzando a las 09:00 horas. La barra indica la duración del periodo de oscuridad. Se muestran los valores medios  $\pm$  EEM de cada grupo. Las letras indican la existencia de diferencias significativas ( $p<0,05$ ) de los valores de triglicéridos entre los grupos de animales analizados en un punto horario (<sup>a</sup> grupo control comparado con el grupo alimentado con dieta hipergrasa, <sup>b</sup> grupo control frente a grupo alimentado con dieta hipergrasa tratado con melatonina y <sup>c</sup> grupo alimentado con una dieta hipergrasa comparado con el grupo alimentado con dieta hipergrasa tratado con melatonina). El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de una vía, seguido de un test de Bonferroni de comparación múltiple.

**Variaciones diarias de la concentración de proteínas plasmáticas totales**

En la gráfica 20, se muestra la concentración de proteínas totales en plasma a lo largo del día de ratas macho adultas alimentadas con una dieta de mantenimiento o con una dieta hipergrasa y un grupo de ratas alimentadas con una dieta hipergrasa, tratadas o no con melatonina, durante 11 semanas.



**Gráfica 20.** Patrón diario de los niveles de proteínas totales en plasma de ratas macho adultas alimentadas con una dieta de mantenimiento o una dieta hipergrasa y un grupo de ratas alimentadas con dieta hipergrasa y tratadas con melatonina en el agua de bebida, durante 11 semanas. Ocho animales por horario y grupo se sacrificaron por decapitación en intervalos de 4 horas durante un ciclo de 24 horas, comenzando a las 09:00 horas. La barra indica la duración del periodo de oscuridad. Se muestran los valores medios  $\pm$  EEM de cada grupo. Las letras indican la existencia de diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) de los valores de proteínas totales entre los grupos de animales analizados en un punto horario (<sup>a</sup> grupo control comparado con el grupo alimentado con dieta hipergrasa, <sup>b</sup> grupo control frente a grupo alimentado con dieta hipergrasa tratado con melatonina y <sup>c</sup> grupo alimentado con una dieta hipergrasa comparado con el grupo alimentado con dieta hipergrasa tratado con melatonina). El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de una vía, seguido de un test de Bonferroni de comparación múltiple.

Los tres grupos estudiados, presentan variaciones significativas en función del tiempo ( $F=3,256$   $p=0,022$ ;  $F=3,577$   $p=0,015$  y  $F=0,736$   $p=0,005$ , grupo control, grupos alimentados con una dieta hipergrasa tratados en paralelo o no con melatonina, respectivamente). En el grupo control se encuentran valores máximos de la concentración de proteínas plasmáticas a las 13:00 y a las 21:00 horas. Sin embargo, en el grupo alimentado con una dieta hipergrasa se observan valores máximos durante el periodo luminoso (entre las 09:00 y las 17:00 horas). En el grupo de ratas alimentadas con la dieta hipergrasa y tratados con melatonina se produce un retraso de fase de 4 horas en los valores del máximo de este parámetro, hasta las 17:00 horas, con un incremento marcado en la amplitud del pico al compararlo con el grupo control.

Los animales alimentados con dieta hipergrasa, tratados en paralelo o no con melatonina, presentan una disminución importante en la concentración de proteínas totales en el periodo oscuro del fotoperiodo con respecto al periodo luminoso ( $F=11,877$   $p=0,002$  y  $F=8,835$   $p=0,006$ , respectivamente). En el grupo control no se observaron diferencias significativas en los valores medidos en las dos fases del fotoperiodo.

La concentración media diaria de las proteínas totales en los animales que ingirieron una dieta alta en grasa, tratadas o no en paralelo con melatonina, es significativamente mayor comparada con los valores medidos en el grupo control ( $F=31,733$   $p=0,001$  y  $F=14,870$   $p=0,001$ , grupo dieta hipergrasa tratada en paralelo o no con melatonina, frente al grupo control, respectivamente).

No se observaron diferencias significativas en las concentraciones medias entre los grupos alimentados con una dieta hipergrasa tratadas en paralelo o no con melatonina. Sin embargo, se observa una disminución significativa de la concentración de proteínas totales a las 09:00 horas, en los animales alimentados con una dieta hipergrasa tratados en paralelo con melatonina frente al grupo alimentado con una dieta hipergrasa únicamente ( $F=3,563$   $p=0,0101$ ).

#### 4.2.6 Efecto de un tratamiento con melatonina, durante once semanas, sobre los niveles medios de concentración de hormonas en plasma, durante la fase luminosa y la fase oscura del fotoperiodo

Se presenta los niveles plasmáticos medios obtenida durante la fase luminosa y la fase oscura del fotoperiodo de insulina, leptina y adiponectina, en ratas macho adultas, tratadas o no con melatonina durante 11 semanas y alimentadas con una dieta de mantenimiento (Tabla 14).

**Tabla 14.** Se muestran los valores medios  $\pm$  EEM de los niveles de concentración plasmática de insulina, leptina y adiponectina, de los grupos estudiados. Se representa en negritas las diferencias significativas entre los valores obtenidos en la fase luminosa y en la fase oscura del fotoperiodo de cada grupo.

	Control		Dieta hipergrosa		Dieta hipergrosa-Melatonina	
	Día	Noche	Día	Noche	Día	Noche
Insulina pg/mL	329,29 $\pm$ 39	392,68 $\pm$ 35,78	670,15 $\pm$ 41,95	673,28 $\pm$ 41,25	249,82 $\pm$ 44,4	340,66 $\pm$ 39,52
<b>Leptina pg/mL</b>	6318,27 $\pm$ 452,25	6372,41 $\pm$ 490,05	<b>14001,50<math>\pm</math>558,0</b>	<b>20150,1<math>\pm</math>1594,3</b>	12125 $\pm$ 706,30	13959,70 $\pm$ 1396,4
<b>Adiponectina pg/mL</b>	28,06 $\pm$ 2,96	26,55 $\pm$ 1,97	<b>56,10<math>\pm</math>8,41</b>	<b>89,49<math>\pm</math>6,70</b>	33,56 $\pm$ 3,34	46,28 $\pm$ 5,41

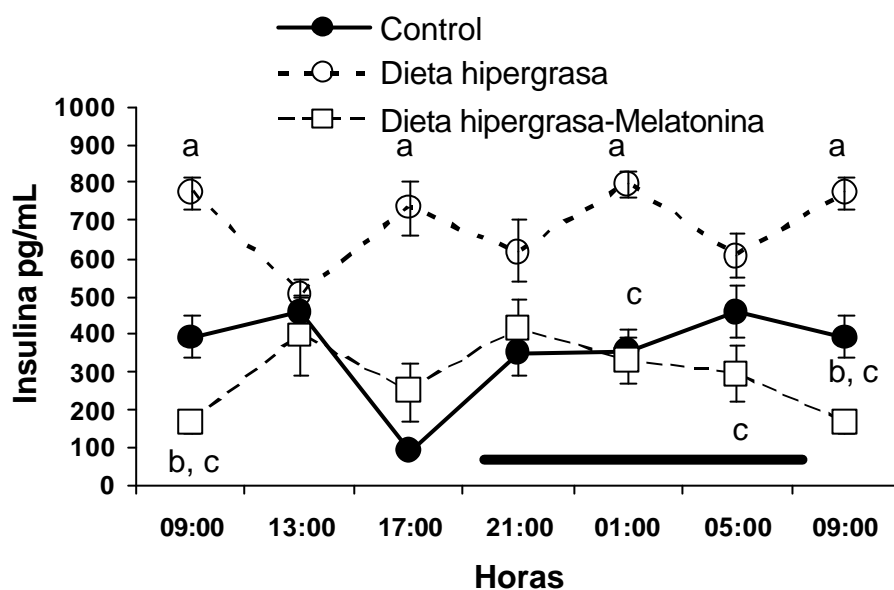
#### 4.2.7 Efecto de un tratamiento con melatonina, durante once semanas, sobre las variaciones diarias en los niveles de concentración de hormonas plasmáticas

##### **Variaciones diarias de las concentraciones plasmáticas de insulina**

En la gráfica 21 se muestra el patrón diario de los niveles plasmáticos de insulina de ratas macho adultas, del grupo control y los grupos alimentados con dieta alta en grasa y el grupo alimentado con dieta hipergrosa tratado, en paralelo, con melatonina, durante 11 semanas.

En el grupo control, al igual que en el grupo con dieta hipergrosa, la concentración plasmática de esta hormona, varía significativamente a lo largo del día ( $F=12,318$   $p<0,001$  y  $F=4,247$   $p=0,008$ , respectivamente), observándose un mínimo a las 17:00 horas en el grupo control, mientras que la ingesta de dieta hipergrosa, produce un adelanto de fase de 4 horas del mínimo encontrado en el grupo control hasta las 13:00 horas. El tratamiento de

melatonina, a ratas alimentadas con una dieta hipergrasa, induce la desaparición de este ritmo, ya que no se encontraron diferencias significativas en función del tiempo. Sin embargo, los niveles plasmáticos de insulina se van acercando a los obtenidos en esos mismos horarios en animales controles salvo a las 09:00 horas, en donde existe una disminución significativa de los mismos, al compararlo con los obtenidos en ratas alimentadas con una dieta de mantenimiento.



**Gráfica 21.** Patrón diario de los niveles de insulina en plasma de ratas macho adultas, alimentadas con una dieta control y dieta hipergrasa. Un grupo de animales alimentados con dieta hipergrasa fueron tratados o no con melatonina, durante 11 semanas. Ocho animales por horario y grupo se sacrificaron por decapitación en intervalos de 4 horas durante un ciclo de 24 horas, comenzando a las 09:00 horas, La barra indica la duración del periodo de oscuridad. Se muestran los valores medios  $\pm$  EEM de cada grupo. Las letras indican la existencia de diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) de los valores de insulina entre los grupos de animales analizados en un punto horario, (<sup>a</sup> grupo control comparado con el grupo alimentado con dieta hipergrasa, <sup>b</sup> grupo control frente a grupo alimentado con dieta hipergrasa tratado con melatonina y <sup>c</sup> grupo alimentado con una dieta hipergrasa comparado con el grupo alimentado con dieta hipergrasa tratado con melatonina). El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de una vía, seguido de un test de Bonferroni de comparación múltiple.

Ninguno de los grupos estudiados presentó variaciones plasmáticas de insulina, al comparar la fase luminosa y la fase de oscuridad del fotoperiodo.

Los animales alimentados únicamente con dieta hipergrasa, aumentaron significativamente los niveles medios plasmáticos de insulina, al compararlo con el grupo control ( $F=54,584$   $p=0,001$ ). Sin embargo, la administración de melatonina en paralelo con una dieta hipergrasa, disminuye significativamente la concentración plasmática de insulina frente al grupo alimentado con una dieta hipergrasa únicamente ( $F=79,47$   $p=0,001$ ), hasta alcanzar valores próximos a los encontrados en los animales alimentados con una dieta de mantenimiento.

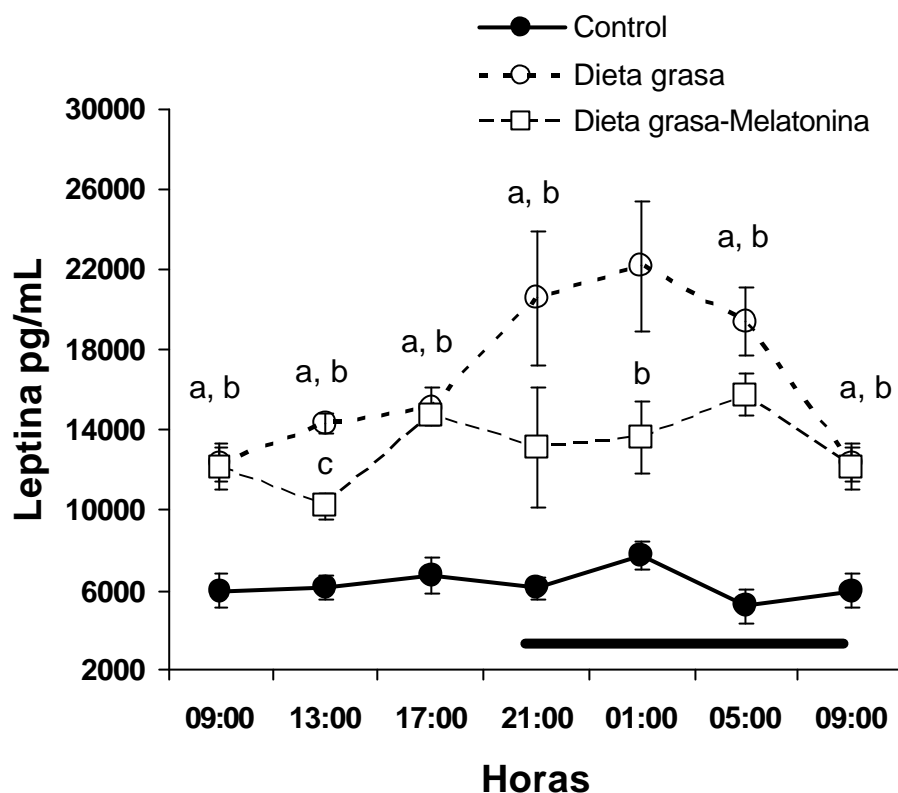
### ***Variaciones diarias de la concentración plasmáticas de leptina***

Las concentraciones plasmáticas de leptina a lo largo del día, de ratas macho adultas, del grupo control y del grupo alimentado con dieta hipergrasa y un grupo de ratas alimentadas con dieta hipergrasa, tratados en paralelo con melatonina, durante 11 semanas se recogen en la gráfica 22.

Sorprendentemente, no se observan variaciones significativas en las concentraciones circulantes de leptina en función del tiempo, en ninguno de los grupos estudiados.

Durante la fase oscura del fotoperiodo se observa un aumento en la concentración de la hormona ( $F=11,774$   $p=0,002$ ), al compararlo con los valores de la fase luminosa en el grupo alimentado con dieta hipergrasa, únicamente; mientras que en los grupos restantes no se encuentran diferencias significativas en los niveles circulantes de leptina entre las dos fases del fotoperiodo.

La dieta hipergrasa, en los animales tratados o no con melatonina, aumenta significativamente la concentración media diaria de leptina, frente a los datos obtenidos en los animales controles ( $F=127,97$   $p<0,001$  y  $F=86,771$   $p<0,001$ , ratas alimentadas con dieta hipergrasa y tratadas en paralelo o no con melatonina, respectivamente). El tratamiento con melatonina en los animales alimentados con dieta hipergrasa disminuye significativamente la concentración media de la hormona al compararlo con los valores de los animales que ingirieron dieta hipergrasa únicamente ( $F=9,454$   $p=0,003$ ); aunque éstos no alcanzaron los valores encontrados en el grupo control, como ocurría para la insulina o la glucosa.

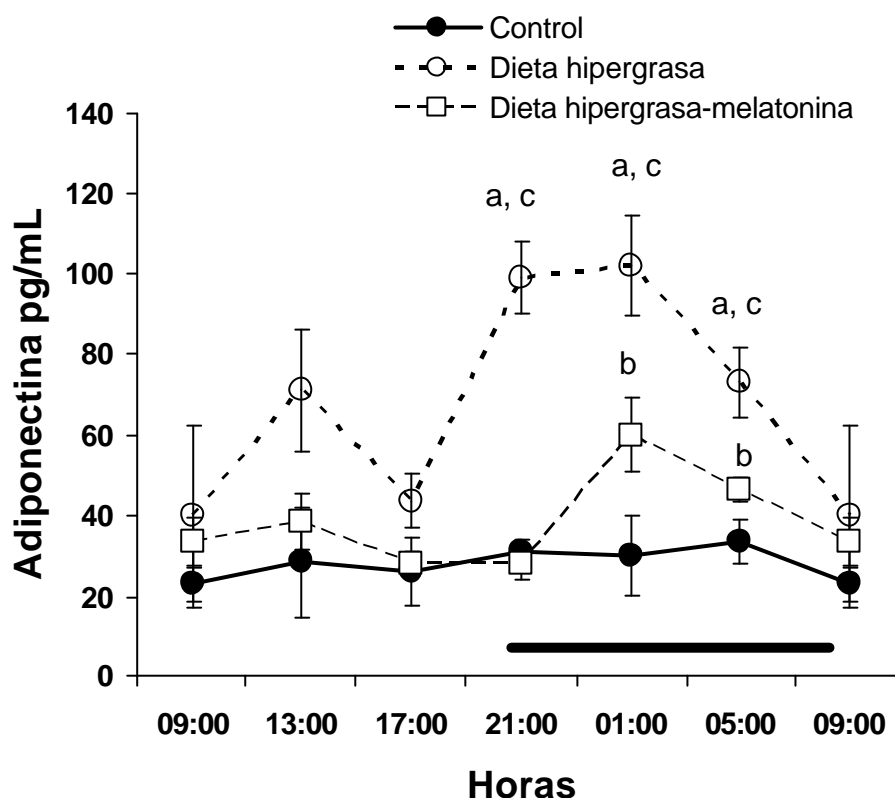


**Gráfica 22.** Patrón diario de los niveles de leptina en plasma de ratas macho adultas alimentadas con una dieta de mantenimiento o con una dieta alta en grasa y un grupo de ratas alimentadas con dieta hipergrasa con o sin tratamiento en paralelo con melatonina, durante 11 semanas. Ocho animales por horario y grupo se sacrificaron por decapitación en intervalos de 4 horas durante un ciclo de 24 horas, comenzando a las 09:00 horas. La barra indica la duración del periodo de oscuridad. Se muestran los valores medios  $\pm$  EEM de cada grupo. Las letras indican la existencia de diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) de los valores de leptina entre los grupos de animales analizados en un punto horario (<sup>a</sup> grupo control comparado con el grupo alimentado con dieta hipergrasa, <sup>b</sup> grupo control frente a grupo alimentado con dieta hipergrasa tratado con melatonina y <sup>c</sup> grupo alimentado con una dieta hipergrasa comparado con el grupo alimentado con dieta hipergrasa tratado con melatonina). El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de una vía, seguido de un test de Bonferroni de comparación múltiple.

### **Variaciones diarias de la concentración plasmática de adiponectina**

En la gráfica 23, se muestra el patrón diario de los niveles de adiponectina plasmática de ratas macho adultas, de los grupos control y de los grupos alimentados con una dieta alta en grasa y un grupo de ratas alimentadas con dieta hipergrasa y tratada en paralelo con melatonina, durante 11 semanas.

El grupo control y el grupo alimentado con dieta hipergrasa tratado en paralelo con melatonina, no presentan variaciones significativas en la concentración de la hormona en función del tiempo, mientras que el grupo de animales alimentados con dieta hipergrasa, únicamente, si muestran variaciones significativas a lo largo del día ( $F=3,006$   $p=0,040$ ), con niveles máximos comprendidos entre las 21:00 y las 01:00 horas.



**Gráfica 23.** Representación de los cambios diarios en los niveles de adiponectina en ratas macho Wistar alimentadas con una dieta de mantenimiento o una dieta hipergrasa y un grupo de ratas alimentadas con dieta hipergrasa con o sin tratamiento con melatonina en el agua de bebida, durante 11 semanas. Ocho animales por horario y grupo se sacrificaron por decapitación en intervalos de 4 horas durante un ciclo de 24 horas, comenzando a las 09:00 horas. La barra indica la duración del periodo de oscuridad. Se muestran los valores medios  $\pm$  EEM de cada grupo. Las letras indican la existencia de diferencias significativas ( $p<0,05$ ) de los valores de adiponectina entre los grupos de animales analizados en un punto horario (<sup>a</sup> grupo control comparado con el grupo alimentado con dieta hipergrasa, <sup>b</sup> grupo control frente a grupo alimentado con dieta hipergrasa tratado con melatonina y <sup>c</sup> grupo alimentado con una dieta hipergrasa comparado con el grupo alimentado con dieta hipergrasa tratado con melatonina). El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de una vía, seguido de un test de Bonferroni de comparación múltiple.

Los animales alimentados con una dieta hipergrasa, presentan un aumento significativo en los niveles circulantes de adiponectina medios durante la fase oscura del fotoperiodo ( $F=8,791$   $p=0,007$ ), al compararlo con los datos obtenidos en la fase luminosa del mismo. Sin embargo, los animales que recibieron dieta de mantenimiento o dieta hipergrasa tratados en paralelo con melatonina, no presentaron diferencias significativas en los valores medios de este parámetro, entre las dos fases del fotoperiodo.

Los grupos alimentados con dieta hipergrasa, tratados en paralelo o no con melatonina muestran un aumento significativo de las concentraciones medias de dicha hormona, frente al grupo control ( $F=50,213$   $p<0,001$  y  $F=9,758$   $p=0,003$ , respectivamente). Sin embargo, en el grupo con dieta hipergrasa tratado en paralelo con melatonina, se produce una disminución significativa en las concentraciones medias diarias de adiponectina en plasma, frente al grupo alimentado con dieta hipergrasa únicamente ( $F=17,414$   $p=0,001$ ), alcanzando prácticamente los valores obtenidos en el grupo control.

### **4.2.8 Efecto de un tratamiento con melatonina, durante once semanas, sobre los niveles de expresión génica relativa de genes, en hipotálamo medio basal, durante la fase luminosa y la fase oscura del fotoperiodo.**

En la Tabla 15, se presenta los niveles medios de expresión génica relativa de los genes NPY, POMC, PrRP, LepR, IR, IRS-1 y IRS-2, en hipotálamo medio basal, obtenidos durante la fase luminosa y la fase oscura del fotoperiodo, en ratas macho adultas, tratadas o no en paralelo con melatonina, durante 11 semanas y alimentadas con una dieta de mantenimiento.

**Tabla 15.** Se presentan los niveles de expresión relativa de los genes en estudio, en hipotálamo medio basal, en ratas macho adultas, alimentadas con dieta de mantenimiento, tratadas o no con melatonina durante 11 semanas. Se muestran los valores medios  $\pm$  EEM. Se representa en negritas las diferencias significativas entre los valores obtenidos en la fase luminosa y en la fase oscura del fotoperiodo de cada grupo.

Expresión relativa	Control		Dieta hipergrasa		Dieta hipergrasa-Melatonina	
	Día	Noche	Día	Noche	Día	Noche
Neuropéptido Y (NPY)	1,01 $\pm$ 0,06	1,21 $\pm$ 0,17	<b>2,34<math>\pm</math>0,352</b>	<b>3,74<math>\pm</math>0,35</b>	1,45 $\pm$ 0,1136	1,52 $\pm$ 0,27
Proopiomelanocortina (POMC)	<b>1,56 <math>\pm</math>0,18</b>	<b>3,44<math>\pm</math>0,4</b>	3,28 $\pm$ 0,30	3,34 $\pm$ 0,33	<b>2,66<math>\pm</math>0,172</b>	<b>3,67<math>\pm</math>1,01</b>
Péptido regulador Secretor de Prolactina (PrRP)	<b>1,10<math>\pm</math>0,10</b>	<b>2,68<math>\pm</math>0,175</b>	<b>2,30<math>\pm</math>0,20</b>	<b>3,39<math>\pm</math>0,26</b>	2,09 $\pm$ 0,160	2,17 $\pm$ 0,144
Receptor de leptina (LepR)	<b>1,78<math>\pm</math>0,20</b>	<b>3,616<math>\pm</math>0,50</b>	<b>3,25<math>\pm</math>0,29</b>	<b>5,19<math>\pm</math>0,46</b>	2,99 $\pm$ 0,173	3,16 $\pm$ 0,27
Receptor de Insulina (IR)	<b>0,96<math>\pm</math>0,13</b>	<b>1,57<math>\pm</math>0,25</b>	2,27 $\pm$ 0,29	1,85 $\pm$ 0,27	<b>0,99<math>\pm</math>0,134</b>	<b>0,6043<math>\pm</math>0,098</b>
Sustrato del Receptor de Insulina-1 (IRS-1)	1,10 $\pm$ 0,15	1,028 $\pm$ 0,17	2,52 $\pm$ 0,28	2,08 $\pm$ 0,20	1,28 $\pm$ 0,127	1,29 $\pm$ 0,082
Sustrato del Receptor de Insulina-1 (IRS-2)	<b>0,856<math>\pm</math>0,15</b>	<b>1,70<math>\pm</math>0,10</b>	<b>3,08<math>\pm</math>0,23</b>	<b>2,27<math>\pm</math>2,66</b>	1,53 $\pm$ 0,131	1,89 $\pm$ 0,188

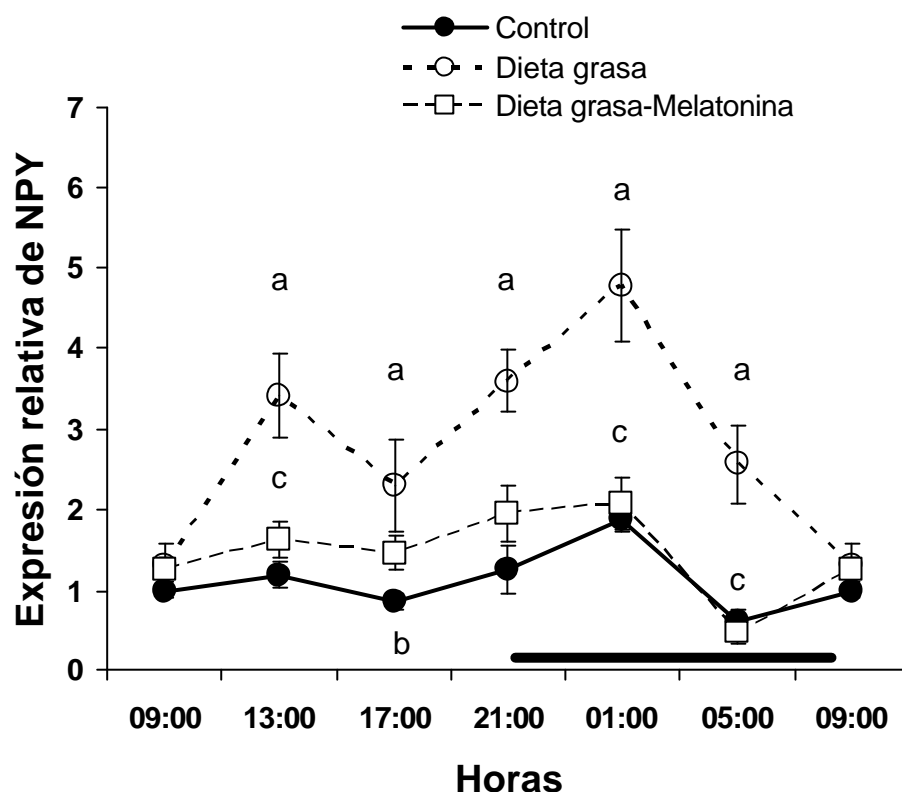
#### 4.2.9 Efecto de un tratamiento con melatonina, durante once semanas, en ratas macho adultas alimentadas con una dieta hipergrasa, sobre las variaciones diarias en la expresión génica relativa de genes, en hipotálamo medio basal

##### *Variaciones diarias en la expresión génica relativa del Neuropéptido Y (NPY) en hipotálamo medio basal*

El patrón diario de la expresión génica relativa de NPY en el hipotálamo medio basal de ratas macho adultas, alimentadas con dieta de mantenimiento o con una dieta hipergrasa y un grupo de ratas alimentadas con una dieta hipergrasa, tratadas o no con melatonina, durante 11 semanas se muestra en la gráfica 24.

Se observan variaciones significativas en el patrón diario de los valores de expresión relativa del gen de NPY en los tres grupos estudiados ( $F=6,188$   $p=0,001$ ;  $F=5,841$   $p=0,002$  y  $5,806$   $p=0,001$ , grupo control y grupo con dieta hipergrasa tratados en paralelo o no con melatonina, respectivamente). Los

animales alimentados con dieta de mantenimiento y/o con una dieta hipergrasa, tratadas con melatonina, muestran un mínimo de expresión relativa del gen de NPY a las 05:00 horas. Sin embargo, la ingesta de dieta alta en grasa, únicamente, produce un aumento de la expresión relativa del gen estudiado en todo el ciclo de 24 horas ( $F=49,294$   $p<0,001$ ), observándose dos máximos a las 13:00 y a las 01:00 horas.



**Gráfica 24.** Diferencias en la expresión relativa del gen NPY en hipotálamo medio basal de ratas macho adultas alimentadas con una dieta de mantenimiento o una dieta hipergrasa y un grupo de ratas alimentadas con dieta hipergrasa y tratadas o no con melatonina en el agua de bebida, durante 11 semanas. Ocho animales por horario y grupo, se sacrificaron por decapitación en intervalos de 4 horas durante un ciclo de 24 horas, comenzando a las 09:00 horas. La barra indica la duración del periodo de oscuridad. Se muestran los valores medios  $\pm$  EEM de cada grupo. Las letras indican la existencia de diferencias significativas ( $p<0,05$ ) en la expresión relativa de NPY entre los grupos de animales analizados en un punto horario (<sup>a</sup> grupo control comparado con el grupo alimentado con dieta hipergrasa, <sup>b</sup> grupo control frente a grupo alimentado con dieta hipergrasa tratado con melatonina y <sup>c</sup> grupo alimentado con una dieta hipergrasa comparado con el grupo alimentado con dieta hipergrasa tratado con melatonina). El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de una vía, seguido de un test de Bonferroni, de comparación múltiple.

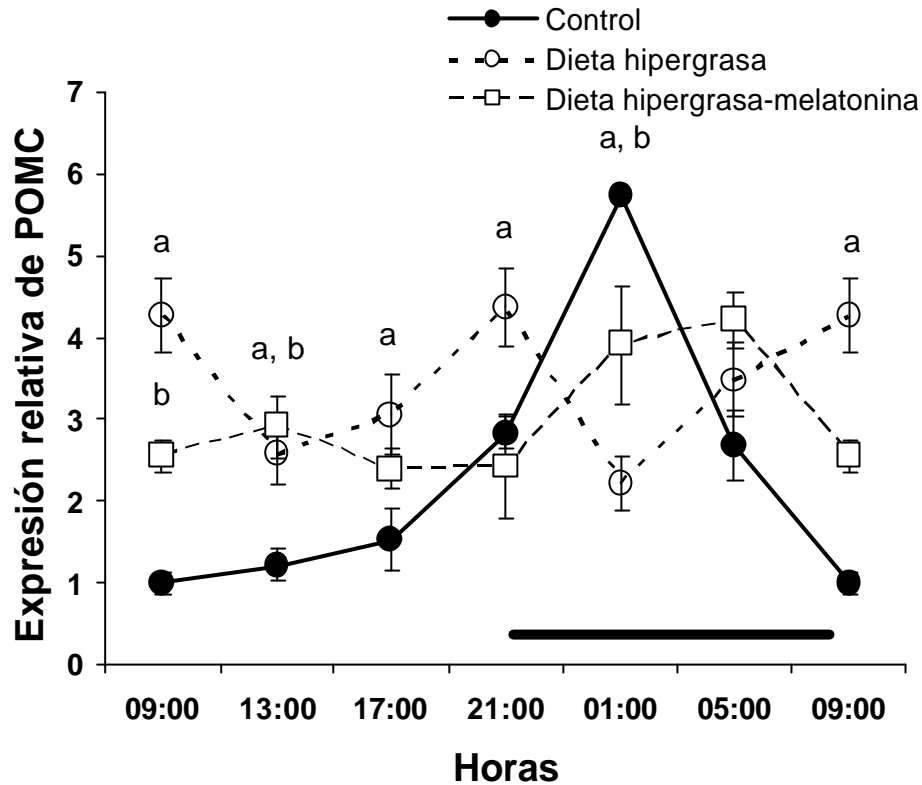
La ingesta de una dieta hipergrasa, únicamente, aumenta la expresión relativa del gen en la fase nocturna del fotoperiodo al comparar con los datos obtenidos en la fase luminosa del mismo ( $F=7,673$   $p=0,01$ ). Este efecto no aparece en los otros grupos estudiados.

La administración en paralelo de melatonina en los animales alimentados con una dieta alta en grasa, disminuye los valores de expresión relativa media diaria de NPY frente al grupo alimentado con una dieta hipergrasa ( $F=27,602$   $p<0,001$ ) únicamente. Aunque los niveles de expresión relativa encontrados en el grupo alimentado con una dieta hipergrasa y melatonina se mantienen próximos a los valores encontrados en el grupo control, son estadísticamente mayores ( $F=4,55$   $p=0,037$ ). Esta diferencia significativa es debida a la mayor expresión relativa de este gen a las 17:00 horas ( $F=6,339$   $p=0,036$ ).

### ***Variaciones diarias de la expresión génica relativa de Proopiomelanocortina (POMC) en hipotálamo medio basal***

La gráfica 25, muestra el patrón diario de los niveles de expresión génica relativa de POMC en hipotálamo medio basal de ratas macho adultas, alimentadas con una dieta de mantenimiento o una dieta hipergrasa y animales del grupo de ratas alimentadas con una dieta hipergrasa y tratada en paralelo con melatonina, durante 11 semanas.

Los niveles de expresión relativa del gen de POMC en el hipotálamo medio basal varían a lo largo del día; en los tres grupos estudiados ( $F=23,863$   $p<0,001$ ;  $F= 3,677$   $p=0,019$  y  $F=4,196$   $p=0,008$ , grupo control, grupos alimentados con una dieta hipergrasa tratados o no en paralelo con melatonina respectivamente). Se observa un máximo de expresión relativa de este gen a las 01:00 horas en el grupo control. Sin embargo, en el grupo alimentado con una dieta hipergrasa tratado en paralelo con melatonina se muestra un aumento de la expresión relativa del gen de POMC desde la 01:00 horas hasta las 05:00 horas. Además, en el grupo de animales alimentados con una dieta hipergrasa únicamente, se muestra un mínimo de la expresión relativa de este gen a las 01:00 horas, con un adelanto de fase del máximo de expresión de 4 horas, horas hasta las 21:00 horas, al compararlo con el grupo control.



**Gráfica 25.** Expresión relativa del gen POMC en el hipotálamo medio basal de ratas macho adultas alimentadas con una dieta de mantenimiento o una dieta hipergrasa y un grupo de ratas alimentadas con dieta hipergrasa y tratadas en paralelo con melatonina en el agua de bebida, durante 11 semanas. Ocho animales por cada horario y grupo se sacrificaron por decapitación en intervalos de 4 horas durante un ciclo de 24 horas, comenzando a las 09:00 horas. La barra indica la duración del periodo de oscuridad. Se muestran los valores medios  $\pm$  EEM de cada grupo. Las letras indican la existencia de diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la expresión relativa de POMC entre los grupos de animales analizados en un punto horario (<sup>a</sup> grupo control comparado con el grupo alimentado con dieta hipergrasa, <sup>b</sup> grupo control frente a grupo alimentado con dieta hipergrasa tratado con melatonina y <sup>c</sup> grupo alimentado con una dieta hipergrasa comparado con el grupo alimentado con dieta hipergrasa tratado con melatonina). El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de una vía. Posteriormente se realizó un test de Bonferroni de comparación múltiple.

Tanto el grupo control, como el grupo alimentado con dieta hipergrasa, tratado en paralelo con melatonina, muestran un aumento significativo de la expresión relativa media del gen de POMC en la fase oscura del fotoperiodo al compararla con la medida en el periodo luminoso para cada grupo ( $F=17,858$   $p < 0,001$  y  $F=6,615$   $p=0,018$  respectivamente); mientras que el grupo

alimentado con dieta hipergrasa únicamente, no presenta variaciones significativas entre los valores medios de las dos fases del fotoperiodo.

Los valores medios diarios de la expresión de este gen, aumentan significativamente en los animales alimentados con una dieta hipergrasa tratadas en paralelo o no con melatonina, al compararlos con los valores obtenidos en el grupo control ( $F=4,985$   $p=0,030$  y  $F=3,909$   $p<0,05$ , respectivamente). La administración en paralelo de melatonina en los animales alimentados con una dieta alta en grasa, no presenta variaciones significativas en los valores medios diarios de la expresión relativa del gen POMC, al compararlo con el grupo alimentado con una dieta hipergrasa.

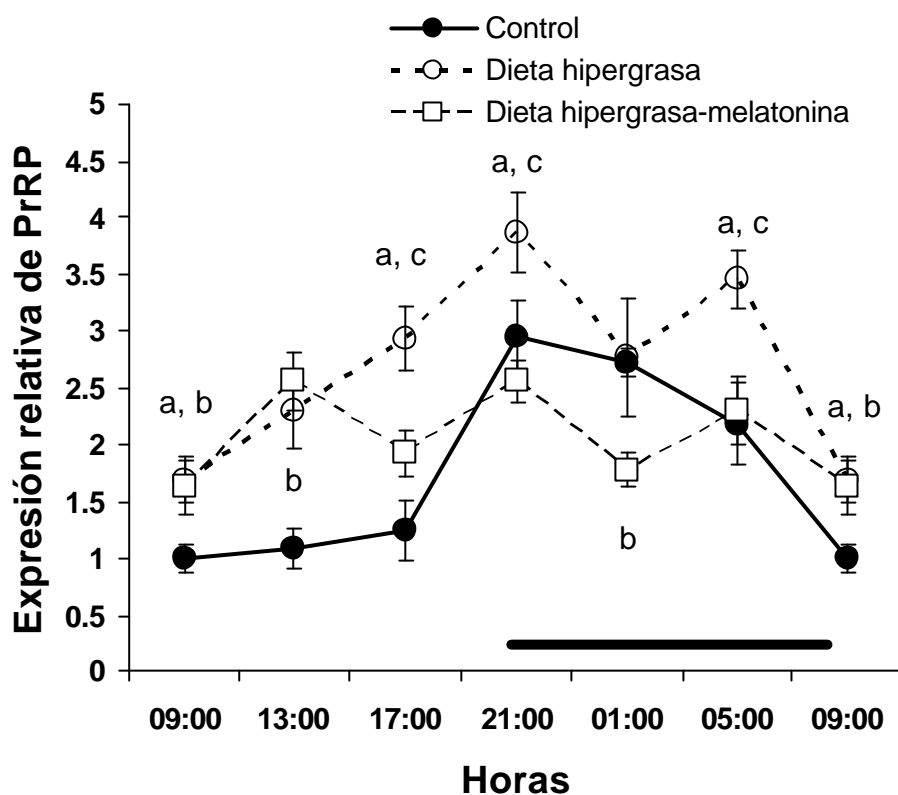
### ***Variaciones diarias en la expresión génica relativa de péptido liberador de Prolactina (PrRP) en hipotálamo medio basal***

En la gráfica 26, se pueden observar los patrones diarios de la expresión génica de PrRP en el hipotálamo medio basal de los animales alimentados con una dieta de mantenimiento o con una dieta hipergrasa y un grupo de ratas alimentadas con una dieta hipergrasa tratadas con melatonina en paralelo.

En los animales alimentados con una dieta de mantenimiento y en los alimentados con una dieta con contenido graso alto, únicamente muestran variaciones significativas en función del tiempo ( $F=13,406$   $p<0,005$  y  $F=5,723$   $p=0,002$ , respectivamente). Los valores más elevados de expresión relativa del gen de PrRP se producen entre las 21:00 y las 05:00 horas en el grupo control. En el grupo alimentado con dieta hipergrasa únicamente, se observan dos máximos de expresión de este gen a las 21:00 y a las 05:00 horas, al igual que el grupo dieta control. En los animales alimentados con dieta hipergrasa tratados con melatonina en paralelo no se observan diferencias significativas en función del tiempo.

En los animales control, se muestra un incremento en los valores medios de expresión del gen PrRP durante el periodo oscuro ( $F=58,849$   $p<0,001$ ) al compararlos con los obtenidos para el grupo control durante la fase luminosa del fotoperiodo. Asimismo, las ratas alimentadas con una dieta hipergrasa únicamente, mostraron este mismo patrón ( $F=11,235$   $p=0,003$ ). No se

encontraron diferencias luz/oscuridad en los animales alimentados con una dieta hipergrasa, tratados con melatonina en paralelo.



**Gráfica 26.** Diferencias de la expresión del gen PrRP en el hipotálamo medio basal de ratas macho adultas alimentadas con una dieta de mantenimiento o una dieta hipergrasa con o sin tratamiento en paralelo con melatonina en el agua de bebida, durante 11 semanas. Ocho animales por horario y grupo se sacrificaron por decapitación en intervalos de 4 horas durante un ciclo de 24 horas, comenzando a las 09:00 horas. La barra indica la duración del periodo de oscuridad. Se muestran los valores medios  $\pm$  EEM de cada grupo. Las letras indican la existencia de diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la expresión relativa de PrRP entre los grupos de animales analizados en un punto horario (<sup>a</sup> grupo control comparado con el grupo alimentado con dieta hipergrasa, <sup>b</sup> grupo control frente a grupo alimentado con dieta hipergrasa tratado con melatonina y <sup>c</sup> grupo alimentado con una dieta hipergrasa comparado con el grupo alimentado con dieta hipergrasa tratado con melatonina). El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de una vía, seguido de un test de Bonferroni, de comparación múltiple.

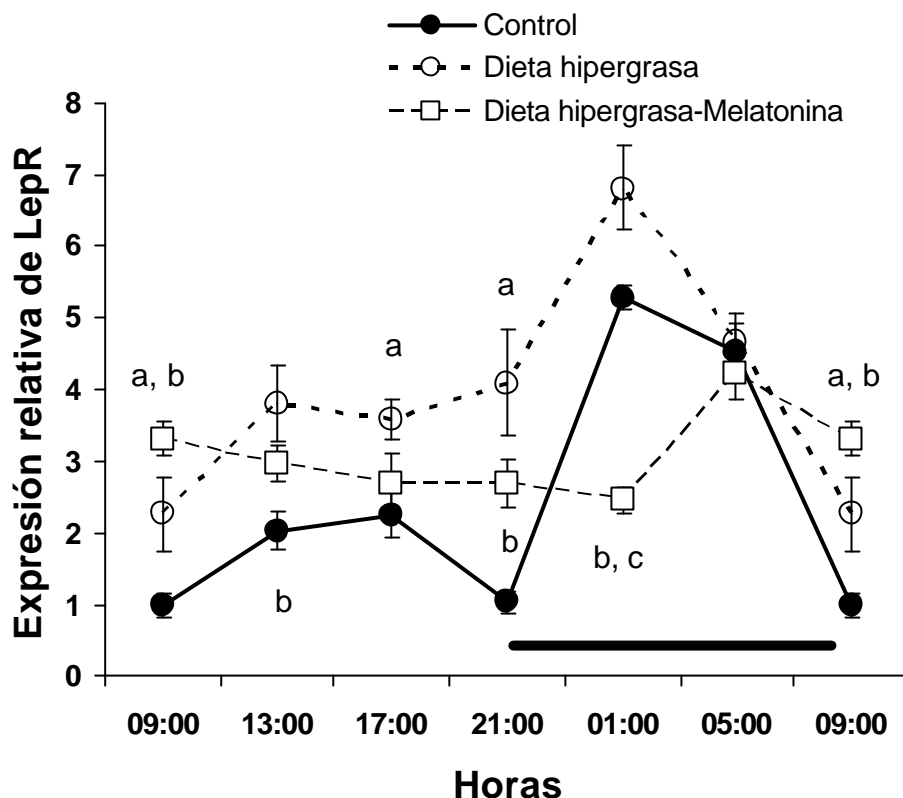
Las ratas alimentadas con una dieta hipergrasa, mostraron un aumento en la expresión media diaria del gen PrRP comparada con la medida en el grupo control ( $F=11,223$   $p=0,002$ ), así como también frente al grupo alimentado con esta misma dieta, tratadas en paralelo con melatonina ( $F=7,58$   $p=0,008$ ).

No se encontraron diferencias significativas en la expresión génica media diaria de este gen entre las ratas alimentadas con una dieta hipergrasa, tratadas con melatonina al compararla con la del grupo control.

### ***Variaciones diarias en la expresión génica relativa del Receptor de Leptina (LepR) en hipotálamo medio basal***

Las variaciones diarias en la expresión de LepR en el hipotálamo medio basal de ratas macho adultas alimentadas con dieta de mantenimiento o con una dieta alta en grasa y un grupo de ratas alimentadas con dieta hipergrasa, tratadas en paralelo con melatonina, durante 11 semanas, se muestran en la gráfica 27.

En ella, se puede observar una variación significativa de la expresión relativa de este gen en función del tiempo tanto en animales control como en los animales alimentados con una dieta alta en grasa tratadas en paralelo o no con melatonina ( $F=47,551$   $p<0,001$ ;  $F=4,836$   $p=0,005$  y  $F=8,515$   $p<0,001$ , respectivamente). En el grupo control el patrón diario de este gen muestra un valor máximo a las 01:00 horas, que también se observa en las ratas alimentadas con una dieta alta en grasa, únicamente. Ambos grupos presentan patrones diarios de expresión similares, aunque, de mayor amplitud en el grupo alimentado con dieta hipergrasa, únicamente. El tratamiento con melatonina en el grupo alimentado con dieta hipergrasa tiende a normalizar este patrón, aun cuando se produce un retraso de fase de 4 horas del valor máximo de expresión génica relativa de LepR al compararlo con el grupo control.



**Gráfica 27.** Expresión relativa del gen *LepR* en el hipotálamo medio basal de ratas macho adultas alimentadas con una dieta de mantenimiento o una dieta hipergrasa y un grupo de ratas alimentadas con dieta hipergrasa y tratadas en paralelo con melatonina en el agua de bebida, durante 11 semanas. Ocho animales por cada horario y grupo se sacrificaron por decapitación en intervalos de 4 horas durante un ciclo de 24 horas, comenzando a las 09:00 horas. La barra indica la duración del periodo de oscuridad. Se muestran los valores medios  $\pm$  EEM de cada grupo. Las letras indican la existencia de diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la expresión relativa de *LepR* entre los grupos de animales analizados en un punto horario (<sup>a</sup> grupo control comparado con el grupo alimentado con dieta hipergrasa, <sup>b</sup> grupo control frente a grupo alimentado con dieta hipergrasa tratado con melatonina y <sup>c</sup> grupo alimentado con una dieta hipergrasa comparado con el grupo alimentado con dieta hipergrasa tratado con melatonina). El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de una vía, seguido de un test de Bonferroni, de comparación múltiple.

En el grupo control, así como en el grupo alimentado con una dieta hipergrasa, únicamente, se observa un incremento significativo en la expresión del gen del receptor de la leptina, durante la fase oscura del fotoperiodo al compararlo con los valores medios medidos durante la fase luminosa de cada grupo ( $F=3,953$   $p < 0,05$  y  $F=12,774$   $p=0,002$  respectivamente). Sin embargo, en

los animales alimentados con una dieta hipergrasa, tratados en paralelo con melatonina, no se muestran estas diferencias.

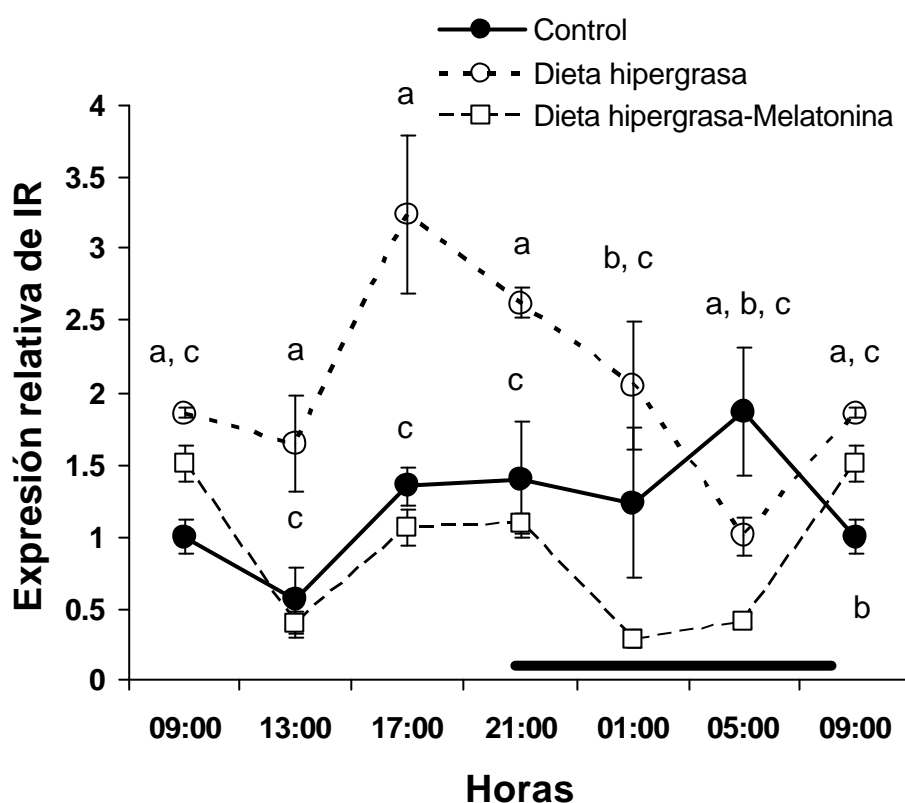
Los valores medios diarios de la expresión relativa del gen de LepR, en los animales alimentados con una dieta hipergrasa tratados en paralelo o no con melatonina, aumentan significativamente, al compararlos con los que se miden en ratas control ( $F=10,160$   $p=0,003$  y  $F=29,413$   $p<0,001$  respectivamente). Sin embargo, al comparar el tratamiento con melatonina en ratas alimentadas con una dieta hipergrasa frente al grupo alimentado con dieta hipergrasa, esta hormona reduce la expresión de este gen ( $F=9,03$   $p=0,004$ ). La expresión génica relativa aumentada en ratas en el grupo tratado con melatonina, tiene a normalizar aunque solo sea parcialmente, al compararlo con el del grupo control.

### ***Variaciones diarias en la expresión génica relativa del Receptor de Insulina (IR) en hipotálamo medio basal***

En la gráfica 28, se presentan, las variaciones diarias de la expresión génica relativa del IR en el hipotálamo medio basal de los animales alimentados con una dieta de mantenimiento o dieta alta en grasa, y un grupo de ratas alimentadas con dieta hipergrasa que reciben en paralelo un tratamiento con melatonina, durante 11 semanas. La expresión relativa del gen IR, de los animales control no presentan variaciones significativas en función de los horarios estudiados. Sin embargo, los grupos alimentados con una dieta alta en grasa tratados en paralelo o no con melatonina, sí exhiben variaciones significativas a lo largo del día ( $F=5,507$   $p=0,002$  y  $F=29,615$   $p<0,001$  respectivamente). Se observa un máximo de la expresión relativa de este gen a las 17:00 horas en el grupo alimentado con dieta hipergrasa, únicamente. Además, el tratamiento con melatonina en ratas alimentadas con una dieta hipergrasa presenta dos valores mínimos en la expresión relativa del gen IR a las 13:00 y entre las 01:00 y 05:00 horas.

Durante la fase oscura, los animales control aumentan significativamente la expresión media del gen IR ( $F=4,895$   $p=0,037$ ), al compararla con la medida observada durante la fase luminosa del fotoperiodo. Sin embargo, no se observaron estas diferencias en los animales tratados con dieta hipergrasa,

únicamente. El tratamiento con melatonina, en los animales alimentados con una dieta hipergrasa ocurre el fenómeno contrario, con una reducción marcada en los valores medios de expresión génica durante la fase oscura del fotoperiodo ( $F=5,235$   $p=0,030$ ).



**Gráfica 28.** Expresión relativa del gen IR en el hipotálamo medio basal de ratas macho adultas alimentadas con una dieta de mantenimiento o una dieta hipergrasa y un grupo de ratas alimentadas con dieta hipergrasa y tratadas en paralelo con melatonina en el agua de bebida, durante 11 semanas. Ocho animales por cada horario y grupo se sacrificaron por decapitación en intervalos de 4 horas durante un ciclo de 24 horas, comenzando a las 09:00 horas. La barra indica la duración del periodo de oscuridad. Se muestran los valores medios  $\pm$  EEM de cada grupo. Las letras indican la existencia de diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la expresión relativa de IR entre los grupos de animales analizados en un punto horario (<sup>a</sup> grupo control comparado con el grupo alimentado con dieta hipergrasa, <sup>b</sup> grupo control frente a grupo alimentado con dieta hipergrasa tratado con melatonina y <sup>c</sup> grupo alimentado con una dieta hipergrasa comparado con el grupo alimentado con dieta hipergrasa tratado con melatonina). El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de una vía, seguido de Bonferroni de comparación múltiple.

Los valores medios de expresión relativa diaria del gen IR, en el grupo de ratas alimentado con una dieta hipergrasa únicamente aumentan significativamente frente al grupo control ( $F=11,657$   $p=0,001$ ). La administración de melatonina, en animales alimentados con una dieta hipergrasa, induce una disminución significativa de los valores medios de la expresión génica relativa de IR comparado con el grupo alimentado con dieta hipergrasa únicamente ( $F=37,809$   $p<0,001$ ) y también con los medidos en el grupo control ( $F=6,943$   $p=0,011$ ).

### ***Variaciones diarias en la expresión génica relativa del Sustrato del Receptor de Insulina (IRS-1) en hipotálamo medio basal***

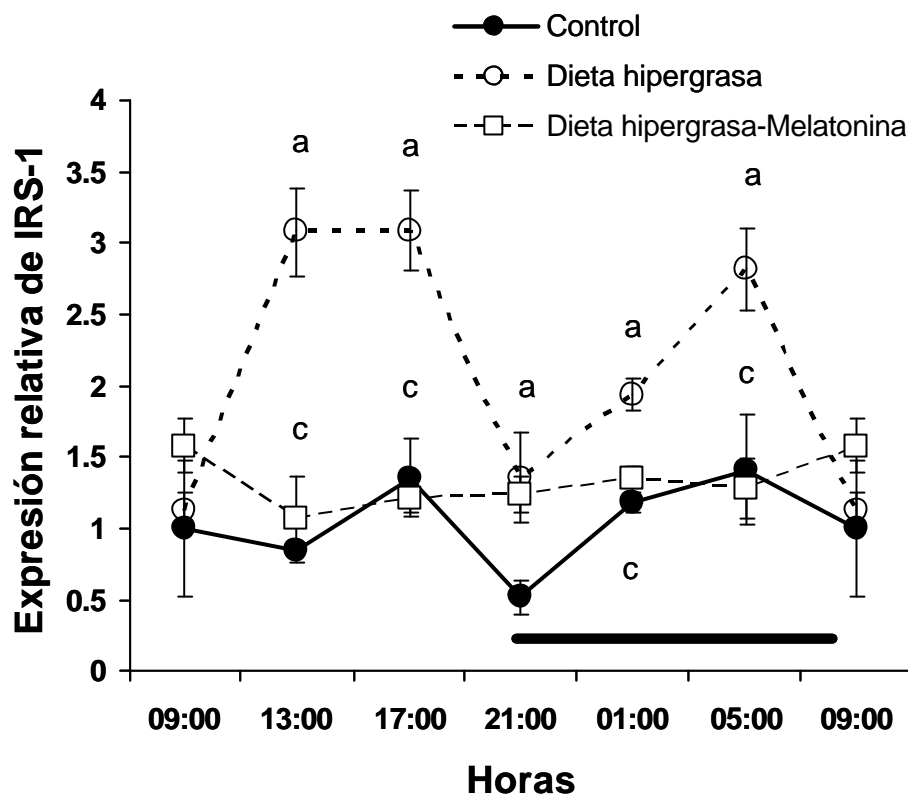
En la gráfica 29, se muestran los resultados de los patrones diarios de la expresión de IRS-1 en el hipotálamo medio basal de ratas macho adultas alimentadas con dieta de mantenimiento o con dieta alta en grasa y animales alimentados con la dieta hipergrasa tratados en paralelo con melatonina durante 11 semanas.

Tan solo se encontraron diferencias significativas en función del tiempo en la expresión relativa del gen IRS-1, en los animales alimentados con dieta hipergrasa únicamente ( $F=10,831$   $p<0,0001$ ). Los otros dos grupos estudiados, no muestran variaciones significativas en la expresión relativa de este gen a lo largo del día.

No se detectaron variaciones significativas en la expresión media relativa del gen en estudio, en ninguno de los grupos al comparar los valores medios obtenidos en las dos fases del fotoperiodo.

En el grupo alimentado con una dieta hipergrasa únicamente, muestra un incremento de la expresión génica relativa media diaria de IRS-1 frente a lo observado en las ratas controles ( $F=32,944$   $p<0,0001$ ). Los animales alimentados con dieta hipergrasa tratados en paralelo con melatonina, muestran una disminución significativa en la expresión relativa media diaria de este gen comparado con los valores medidos en el grupo alimentado con una dieta alta en grasa únicamente ( $F=20,388$   $p<0,0001$ ). El grupo alimentado con una dieta grasa tratado en paralelo con melatonina normalizó prácticamente sus valores de expresión génica de IRS-1 en un ciclo de 24 horas, comparados

con los valores mostrados por el grupo control, no observándose diferencias significativas entre los valores medios de IRS-1 entre ambos grupos.



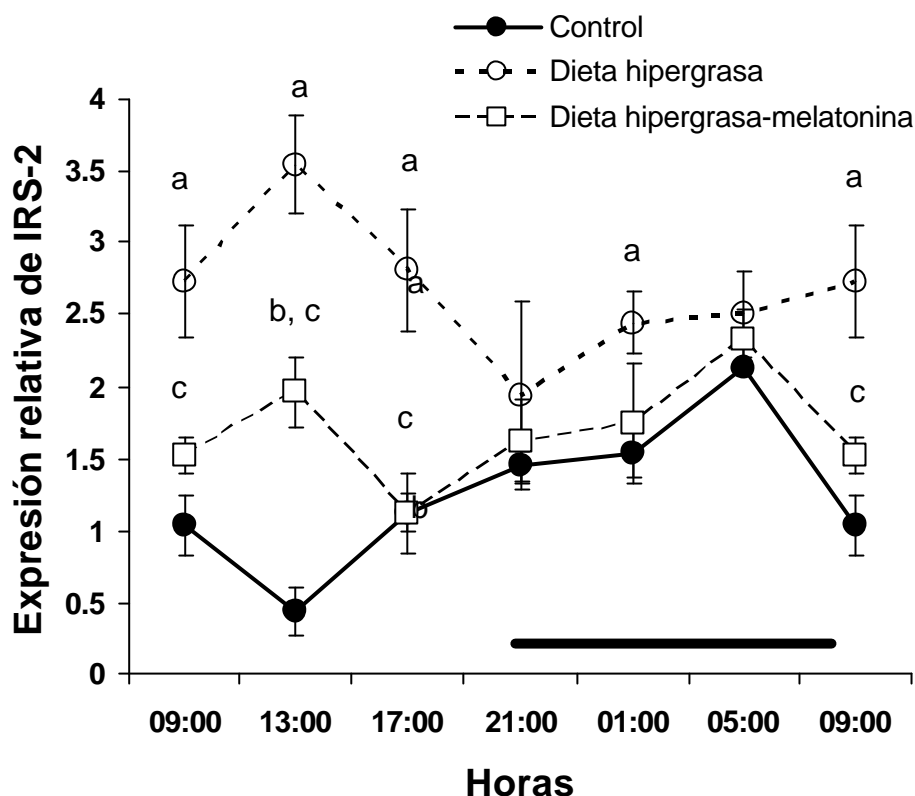
**Gráfica 29.** Expresión relativa del gen IRS-1 en el hipotálamo medio basal de ratas macho adultas alimentadas con una dieta de mantenimiento o una dieta hipergrasa con o sin tratamiento en paralelo con melatonina en el agua de bebida, durante 11 semanas. Ocho animales por horario y grupo se sacrificaron por decapitación en intervalos de 4 horas durante un ciclo de 24 horas, comenzando a las 09:00 horas. La barra indica la duración del periodo de oscuridad. Se muestran los valores medios  $\pm$  EEM de cada grupo. Las letras indican la existencia de diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la expresión relativa de IRS-1 entre los grupos de animales analizados en un punto horario (<sup>a</sup> grupo control comparado con el grupo alimentado con dieta hipergrasa, <sup>b</sup> grupo control frente a grupo alimentado con dieta hipergrasa tratado con melatonina y <sup>c</sup> grupo alimentado con una dieta hipergrasa comparado con el grupo alimentado con dieta hipergrasa tratado con melatonina). El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de una vía, seguido de un test de Bonferroni, de comparación múltiple.

***Variaciones diarias de la expresión génica relativa del Sustrato del Receptor de Insulina 2 (IRS-2) en el hipotálamo medio basal***

Las variaciones diarias en la expresión de IRS-2 en el hipotálamo medio basal de ratas macho adultas, alimentadas con dieta de mantenimiento o dieta alta en grasa y un grupo de ratas alimentadas con una dieta hipergrasa tratadas con melatonina en paralelo, se muestran en la gráfica 30.

Los resultados estadísticos, indican variaciones significativas de la expresión del gen en función del tiempo, tanto en animales control como en los alimentados con una dieta hipergrasa tratados con melatonina ( $F=10,869$   $p<0,0001$  y  $F= 2,510$   $p<0,05$ , respectivamente), mientras que el grupo alimentado con una dieta hipergrasa, únicamente, no mostró estas variaciones con el tiempo. El grupo control, muestra un mínimo a las 13:00 horas y un máximo de expresión relativa de este gen a las 05:00 horas, mientras que en el grupo alimentado con una dieta hipergrasa tratadas con melatonina en paralelo se observa un máximo de expresión de este gen a las 05:00 horas, siendo éste de igual amplitud que el observado en el grupo control.

Se observa un incremento en los valores medios de expresión del gen IRS-2 durante la fase oscura del fotoperiodo, en el grupo control, al comparar estos valores con los medidos en la fase luminosa del fotoperiodo ( $F=20,932$   $p<0,0001$ ). Asimismo, hemos encontrado un descenso significativo en los valores medios de expresión relativa del gen IRS-2, durante la fase oscura del fotoperiodo en el grupo alimentado con una dieta hipergrasa únicamente ( $F=5,712$   $p=0,026$ ), al compararlos con los datos obtenidos durante la fase luminosa del fotoperiodo. No se encontraron diferencias en los valores medios de expresión de este gen entre las dos fases del fotoperiodo en los grupos de ratas alimentados con una dieta hipergrasa tratados con melatonina en paralelo.



**Gráfica 30.** Expresión relativa del gen IRS-2 en el hipotálamo medio basal de ratas macho adultas alimentadas con una dieta de mantenimiento o una dieta hipergrasa y un grupo de ratas alimentadas con dieta hipergrasa y tratadas en paralelo con melatonina en el agua de bebida, durante 11 semanas. Ocho animales por horario y grupo se sacrificaron por decapitación en intervalos de 4 horas durante un ciclo de 24 horas, comenzando a las 09:00 horas. La barra indica la duración del periodo de oscuridad. Se muestran los valores medios  $\pm$  EEM de cada grupo. Las letras indican la existencia de diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la expresión relativa de IRS-2 entre los grupos de animales analizados en un punto horario (<sup>a</sup> grupo control comparado con el grupo alimentado con dieta hipergrasa, <sup>b</sup> grupo control frente a grupo alimentado con dieta hipergrasa tratado con melatonina y <sup>c</sup> grupo alimentado con una dieta hipergrasa comparado con el grupo alimentado con dieta hipergrasa tratado con melatonina). El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de una vía, seguido de un test de Bonferroni, de comparación múltiple.

Los animales alimentados con una dieta hipergrasa aumentaron la expresión relativa media diaria de este gen, al compararla con la medida en el grupo control ( $F=39,995$   $p < 0,001$ ). La melatonina administrada a las ratas alimentadas con una dieta hipergrasa, disminuye significativamente la expresión media del gen frente al grupo con dieta grasa ( $F=20,388$   $p < 0,001$ ), observándose valores similares a los obtenidos en el grupo control.

## ***CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN***



## Bloque 1

### 5.1 Administración de melatonina, durante 9 semanas, en ratas adultas alimentadas con dieta de mantenimiento estándar

#### A) Resumen e interpretación de resultados

Los resultados obtenidos indican que la administración crónica de 25 µg de melatonina por mL de agua de bebida, produjo una reducción en el incremento de peso que ocurre, con la edad normalmente, en la rata, acompañado de un descenso significativo de los niveles plasmáticos de insulina, glucosa, proteínas y triglicéridos. Además se produce una alteración de los patrones diarios de secreción de adiponectina, leptina e insulina. Es importante resaltar que estos cambios se producen en ausencia de efectos significativos de la melatonina en la cantidad de comida o volumen de bebida que ingiere una rata diariamente. Parte de estos efectos podrían deberse a los cambios en el mecanismo de regulación del apetito a nivel del hipotálamo medio basal, ya que el tratamiento con melatonina modifica los patrones de expresión génica relativa de POMC, receptor de leptina, receptor de insulina, péptido regulador de la secreción de prolactina, así como de los sustratos del receptor de insulina 1 y 2.

#### B) Parámetros plasmáticos

La pérdida de peso observada en los animales tratados con melatonina sugeriría un efecto anorexigénico para la melatonina, en el animal control, que no se ha descrito en otros estudios (Prunet-Marcassus y cols, 2003 Leibowitz y cols, 2008); aunque, si se produce este efecto en animales previamente obesos. Este hecho podría explicarse por la concentración de melatonina utilizada en este estudio (25 µg/mL agua de bebida) con respecto a otros estudios publicados, Prunet-Marcassus y cols, (2003); administraron 30mg/Kg-peso/día en un sola toma). También la duración del tratamiento podría explicar que en otros estudios que utilizan tiempos más cortos (3 semanas; Prunet-Marcassus y cols, 2003) no se vea el efecto que se demuestra en este estudio tras 9 semanas de tratamiento. Es importante resaltar que estos cambios se

producen en ausencia de efectos significativos de la melatonina en la cantidad de comida o bebida que ingiere una rata diariamente como en el caso del estudio de comparación (Prunet-Marcassus y cols, 2003). El mecanismo por el que la melatonina actúa sobre el peso incluiría: 1) efectos directos de la melatonina sobre el tejido adiposo, modificando el metabolismo lipídico, debido a la presencia de sus receptores en dicho tejido y 2) modificando el mecanismo secretor de otras hormonas que regulan el metabolismo.

El patrón secretor de insulina en el grupo control difiere del encontrado por este grupo de investigación, en experimentos realizados durante la primavera (García Bonacho y cols, 2000) indicando variaciones estacionales de la insulina como ya ha sido descrito para otras hormonas como la prolactina (Esquifino y cols, 1999). El patrón que se describe en este trabajo coincide con trabajos previos del grupo realizados en la misma estación del año (invierno, Cano y cols, 2009). El tratamiento con melatonina redujo los niveles medios de insulina y concomitantemente de glucosa, confirmando trabajos anteriores de la literatura que ha mostrado este mismo efecto (revisado por Peschke, 2008), que podría deberse a la existencia de receptores para esta hormona en el páncreas (Muller y cols, 2009, 2) y por tanto, un efecto directo periférico de melatonina no se puede descartar. Es importante destacar que la melatonina desincroniza el ritmo de insulina indicando un efecto cronobiológico de esta hormona, que ha sido ampliamente descrito (Cano y cols, 2009), a lo que se sumaría sus efectos como antioxidante celular (Jiménez-Ortega y cols, 2009). Sin embargo los efectos de insulina a nivel central como agente anorexigénico también tienen que ser considerados (Sánchez-Lasheras y cols, 2009).

Como ya se ha descrito para la insulina, el patrón secretor de leptina en el grupo control difiere del descrito por el grupo en trabajos anteriores, pero realizados durante la estación de primavera (Chacon y cols, 2005). Todo ello confirmando la existencia de cambios estacionales que pueden ser la causa de los resultados discrepantes sobre esta hormona publicados con anterioridad (Cano y cols, 2009). Además es interesante resaltar que en el caso de esta hormona, el patrón es similar al descrito en otras especies de roedores (Kohsaka y cols, 2007). Asimismo, la falta de efectos de melatonina sobre los niveles medios de leptina conjuntamente con el hecho de que se produzca una

alteración en su patrón diario, también podrían explicar la disparidad de resultados encontrados en la literatura, que normalmente se basan en una única toma de muestras, en condiciones basales (Alonso-Vale MI y cols, 2008; Sanchez-Mateos y cols, 2007). Como en el caso de la insulina, los efectos centrales de leptina a nivel del mecanismo de regulación central de la ingesta tendrían que ser considerados (Suzuki y cols, 2010).

En relación con adiponectina, las variaciones observadas en el grupo control son similares a las encontradas en trabajos anteriores del grupo realizados en invierno (estación en la que se ha realizado este estudio; Cano y cols, 2009). Es importante destacar que este es el primer estudio en el que se muestran los efectos de melatonina sobre el patrón diario de adiponectina (Rios-Lugo y cols, 2010). Dicho efecto está relacionado con ajustes temporales más que con cambios significativos en sus niveles plasmáticos. Ello estaría de acuerdo con el hecho de que concentraciones mili molares de melatonina, aunque inducen una reducción en la expresión del gen que codifica para la adiponectina (Alonso-Vale MI y cols 2009), no se refleja en los niveles plasmáticos de la misma.

Los efectos de melatonina sobre leptina y adiponectina podrían deberse al menos en parte a efectos directos de melatonina sobre el tejido adiposo, en el que se han descrito receptores para la hormona (Brydon y cols, 2001). La administración de concentraciones fisiológicas de melatonina en ratas de mediana edad (aproximadamente de 12 meses de vida) redujo la adiposidad. También, disminuyó los niveles circulantes de leptina e insulina hasta los valores que se encuentran en animales jóvenes (Ramussen y cols, 1999, Puchalski y cols, 2003; Wolden-Hanson y cols, 2000). Es importante resaltar que la administración de dosis fisiológicas de melatonina a ratas jóvenes no produjo diferencias significativas en parámetros como leptina y/o insulina (Ramussen y cols, 2001). Todo ello indicaría que los efectos de la melatonina dependen no solo de sus efectos temporales, sino de la edad del individuo en la que se realizan las manipulaciones experimentales (Cardinali y cols, 1998).

Sorprendentemente no hemos encontrado un ritmo diario de niveles plasmáticos de colesterol ni en ratas controles ni en las tratadas con la hormona pineal. El tratamiento crónico con melatonina no modificó los niveles

circulantes de colesterol de acuerdo con trabajos previos de la literatura (Bojkova y cols, 2008; Tamura y cols, 2008) y difiere de trabajos previos del grupo en el que el tratamiento con melatonina durante 4 días indujo un descenso en los niveles plasmáticos de colesterol libre, aunque no cambió los niveles circulantes de colesterol total (Esquifino y cols, 1997). Las discrepancias pueden ser debidas a los diferentes tiempos de tratamiento empleados en los dos estudios o bien a que en tratamientos subcrónicos de melatonina se produciría un incremento de las lecitinas-colesterol acil-transferasas que mediarían la esterificación del colesterol (Esquifino y cols, 1997). Sin embargo, los niveles plasmáticos de triglicéridos disminuyeron con el tratamiento subcrónico, hecho que fue confirmado en estudios histológicos (Sánchez-Hidalgo y cols, 2007). Este efecto se explicaría por el descenso de los niveles plasmáticos de insulina observados, que se describe en este estudio, ya que esta última regula la síntesis de triglicéridos tanto a nivel hepático como a nivel del tejido adiposo (Magkos y cols, 2010).

En el grupo control se detecta la existencia de un patrón diario de los niveles plasmáticos de proteínas plasmáticas. Ello estaría de acuerdo con trabajos previos del grupo que muestran patrones rítmicos de proteínas plasmáticas específicas (Agrasal y cols, 2001) y de otros estudios encontrados en la literatura (Scheving y cols, 1968; Schade y cols, 1980; Soulban y cols, 1989). Sorprendentemente, el tratamiento crónico con melatonina redujo la concentración plasmática media diaria de proteínas y desincronizó su patrón diario, indicando, que la melatonina, podría ejercer este efecto a través de su papel como hormona cronobiótica, ampliamente descrito en la literatura (Reiter y cols, 2010) a lo que se sumaría sus efectos como antioxidante celular (Flora y cols, 2009; Jiménez-Ortega y cols, 2009) como se mencionó al discutir los efectos de esta hormona sobre la secreción de insulina. La medida de las proteínas es importante ya que los cambios de su concentración en plasma o en el perfil de su patrón diario indica la presencia de enfermedades metabólicas (Himmerich y cols, 2010; Giuffrida y cols, 2010).

### **C) Parámetros génicos**

Se describe por primera vez el ritmo de expresión diaria del gen de NPY en la rata con valores máximos en la primera fase del periodo oscuro, estando inhibido en el resto de los horarios estudiados. Se ha descrito un ritmo similar en el hipotálamo de ratones (Kohsaka y cols, 2007); lo cual sería de esperar teniendo en cuenta que la concentración de NPY muestra un patrón rítmico a nivel hipotalámico (Rios-Lugo y cols, datos no publicados). Es importante destacar, que la expresión del gen de NPY se correlaciona con la secreción de su péptido específico, de acuerdo con este trabajo y trabajos previos del grupo (Rios-Lugo y cols, datos no publicados). Esta correlación se mostraría inmediatamente después de que se apaguen las luces, momento en el que la rata comienza su periodo activo y por tanto come. Este hecho, estaría de acuerdo con que el NPY es considerado como el neuromodulador más potente dentro de la vía orexigénica de regulación del apetito (Perello y Spinedi, 2004). Hay que destacar que los efectos del NPY sobre el mecanismo de regulación del apetito son puramente centrales, a nivel del núcleo arcuato (Chee y cols, 2010), ya que aunque este neuropéptido se secreta periféricamente, no atraviesa la barrera hematoencefálica (Sato y cols, 2010).

El tratamiento con melatonina produce un adelanto de fase de la expresión máxima del gen de NPY, en relación al grupo control aunque, dichos valores se acotan dentro de la primera fase del periodo oscuro y por tanto no debería modificar el patrón alimentario. Sin embargo, el incremento observado durante la primera fase del periodo luminoso indicaría una ampliación en el horario de ingesta en el grupo de ratas tratado con melatonina, ya que no se han encontrado diferencias en la cantidad de comida y/o bebida ingerida por animal y día, como se ha mencionado previamente. Es importante destacar que este sería el primer trabajo en el que se demuestran efectos de la hormona pineal sobre la regulación del apetito directamente a nivel hipotalámico, lo que completaría el efecto periférico que hemos discutido con anterioridad.

Se describe por primera vez el patrón de expresión génica diario del gen de POMC en el hipotálamo medio basal de la rata, que es similar al descrito previamente en ratones (Kohsaka y cols, 2007). Es importante destacar, que el ritmo de este gen sigue un patrón similar al de NPY en el grupo control, con

valores máximos de dicho parámetro durante la primera fase del periodo oscuro, lo que indicaría un incremento en las señales inhibitoras del apetito, ya que este péptido inhibe el apetito. Estos cambios temporales podrían estar relacionados con un equilibrio inestable de las dos vías (orexigénica y anorexigénica) de regulación del apetito a lo largo de 24 h. Las neuronas POMC-érgicas, están circunscritas al núcleo arcuato donde se produce su activación/desactivación actuando sobre los mecanismos secundarios de regulación del apetito (Arora y cols, 2006; Diéguez y cols, 2009). Es importante resaltar que estos mecanismos dependen en gran medida de la calidad de la dieta utilizada ya que los % de carbohidratos y proteínas o grasas hace que se activen circuitos en el núcleo ventromedial o en el hipotálamo basal (Jovanovic y cols, 2010), que reprimen o activan mecanismos secundarios de regulación del apetito (Laposky y cols, 2007).

Sorprendentemente, el tratamiento con melatonina, a diferencia de lo que se observó para el NPY, redujo drásticamente la amplitud del ritmo de expresión del gen de POMC en el hipotálamo medio basal, aboliendo las diferencias día noche en la expresión de este gen. Estos datos sugerirían que la hormona pineal estaría ejerciendo un papel orexigénico, aunque como hemos descrito con anterioridad el efecto final es una pérdida del 18% de peso corporal con relación a los animales controles. Este hecho, indicaría que la melatonina además de su efecto a nivel hipotalámico, está ejerciendo otros efectos metabólicos anorexigénicos importantes a nivel del tejido adiposo (Brydon y cols, 2001), el hígado (Mühlbauer y cols, 2009) y/o el páncreas (Pesche, 2008), que podrían sobrepasar el efecto central de la hormona pineal y que hemos analizado previamente en este trabajo.

La expresión del gen de PrRP en animales controles, muestra un ritmo diario, en el hipotálamo mediobasal, con valores máximos durante el periodo oscuro. En nuestro conocimiento es la primera vez que se describe este ritmo y confirma los resultados previos utilizando a muestras puntuales (Takayanagi y cols, 2008). Ello, estaría de acuerdo con el hecho de que el periodo oscuro es el periodo activo en el que la rata come. La ingesta se asocia con una activación de las neuronas PrRP (Kelly y cols, 2006; Takayanagi y cols, 2009), ya que este péptido está encuadrado como un neuromodulador anorexigénico

hipotalámico. Es importante destacar que las neuronas de PrRP están muy circunscritas a una de las áreas involucradas en la regulación del apetito por lo que sus cambios estarían asociados con modificaciones en las señales de saciedad de acuerdo con trabajos previos de la literatura (Takayanagi y cols, 2008). Además variaciones en la activación de este péptido sobre el mecanismo regulador del apetito estarían relacionados con la activación de la síntesis de neuropéptidos anorexigénicos como la  $\alpha$ -MSH o la neurotensina (Lawrence y cols, 2000); además efectos mediados a través de otras hormonas se sumarían a este efecto ya que la activación de este neuropéptido modifica la concentración circulante de hormonas involucradas en la regulación del metabolismo como la prolactina (Esquifino y cols, 1997).

En los animales tratados con melatonina se produce una disminución en la amplitud del ritmo de PrRP, que además cambia su perfil. Este patrón rítmico se corresponde con el de prolactina en la estación de otoño, lo que estaría de acuerdo con su papel regulador de la secreción de prolactina, que muestra el mismo perfil (Esquifino y cols, 1999). Ello sugeriría que la melatonina conjuntamente con la prolactina juegan un papel cronobiótico que modifica el grado de adiposidad (Zieba y cols, 2008), conjuntamente con un ajuste sobre el reloj endógeno central, ya que en este último, se encuentran receptores para ambas hormonas (Cutrera y cols, 2002; Reppert y cols, 1995); y que ambas hormonas activan al reloj endógeno central (Cutrera y cols, 2002; Agez y cols, 2009). Asimismo, se ha demostrado que la administración de la hormona pineal induce patrones secretores de hormonas hipofisarias, gonadales, neuromoduladores....., correspondientes a otras estaciones, dependiendo de la estación en la que se lleva a cabo el tratamiento con la melatonina (Esquifino y cols, 1999; Pazo, 2002). Ello se ha descrito previamente en otros modelos experimentales en los que se ha estudiado los efectos de un tratamiento con melatonina sobre la secreción de hormona hipofisarias y/o la actividad del sistema inmunitario (Cardinali y cols, 1999, Esquifino y cols, 1999; Castrillon y cols, 2001; Pazo, 2002). El hecho de que no varíen los niveles diarios medios de PrRP indica que el perfil del ritmo es también importante a la hora de evaluar los efectos del tratamiento con melatonina de acuerdo con su papel cronobiótico previamente descrito (Reiter y cols, 2010).

La expresión del gen del receptor de leptina también sigue un patrón rítmico con niveles de expresión claramente elevados durante la fase oscura del fotoperiodo en el grupo control. Como hemos mencionado para la PrRP, este ritmo se describe por vez primera, en la rata, en este trabajo y confirma datos puntuales de la literatura en los que se describe la existencia de receptores para leptina en el hipotálamo (Schwartz y cols, 2010). La disección del hipotálamo medio basal, se ha realizado como en trabajos previos del grupo (Jiménez-Ortega y cols, 2009), y por tanto, contiene tanto las vías anorexigénicas como orexigénicas de regulación del apetito. El efecto es similar al resto de los parámetros anteriormente analizados en este trabajo, los que sugiere que durante la primera fase del periodo de oscuridad la leptina, al unirse a su receptor, activaría las vías anorexigénicas intentando controlar la vía orexigénica y que la ingesta sea controlada (Arora y cols, 2006; Schwartz y cols, 2010).

El tratamiento con melatonina reduce la amplitud del ritmo del receptor de leptina, y en nuestro conocimiento es el primer trabajo en el que se muestran los efectos de un tratamiento con la hormona pineal sobre las variaciones diarias de expresión del gen del receptor de leptina. Sin embargo, como hemos mencionado anteriormente los niveles circulantes de leptina están incrementados, por lo que se debilitarían las señales de leptina sobre las vías de regulación del apetito, durante la fase oscura del fotoperiodo, debido al descenso del número de receptores durante la fase oscura. El desequilibrio entre señales, debido a los cambios que se producen no solo sobre el gen del receptor de leptina, sino sobre el receptor de PrRP, y la expresión de los genes de NPY y POMC, que cambian con el tratamiento con melatonina, producirían un equilibrio diferente para controlar la ingesta. Todo ello podría ser la causa del que el animal prolongue la fase activa, en cuanto a la ingesta (como indicarían estos datos conjuntamente con los obtenidos para el NPY), lo que indicaría que la rata podía comer más despacio, ya que como se ha explicado con anterioridad no se observaron diferencias en la cantidad de alimento ingerida por los grupos estudiados.

La expresión del gen del receptor de insulina muestra un ritmo diario con valores más altos en la segunda fase del periodo oscuro del fotoperiodo. Como

para los otros parámetros este trabajo, se muestra por primera vez este ritmo diario en la rata, que estaría de acuerdo con el papel de la insulina en la regulación del balance energético (Blevins y cols, 2010), ya que facilitaría los efectos de la hormona en la segunda fase del periodo oscuro, donde se almacenarían los nutrientes (Xu y cols, 2006). Estos resultados, confirman datos puntuales de la literatura en los que se describe la existencia de receptores para insulina en el hipotálamo (Arora y cols, 2006; Banas y cols, 2009).

Se describe por primera vez los efectos de un tratamiento con melatonina sobre la expresión del gen del receptor de insulina en el hipotálamo medio basal, aunque si se ha estudiado el efecto de la melatonina sobre el gen de insulina y su secreción a nivel pancreático, donde se han descrito receptores para la hormona pineal (Leibowitz y cols, 2008). Este tratamiento redujo la amplitud del ritmo de expresión del receptor de insulina a nivel central, que se correlacionaría con el descenso en los niveles circulantes de dicha hormona en los animales tratados con la hormona pineal, que describimos con anterioridad. La debilitación de la señal de insulina podría modificar el equilibrio del mecanismo regulador del apetito, que podría inducir una ampliación del periodo de ingesta pero no del total de alimento ingerido. Es importante destacar que la glucosa también está reducida durante el periodo oscuro en los animales tratados con melatonina, como ya hemos mencionado anteriormente. Todo ello, indicando la correlación tan estrecha que se produce entre glucosa e insulina en la regulación del balance energético (Wang y cols, 2010 ).

Se describe por primera vez la variaciones diarias de los sustratos intracelulares IRS-1 y 2, que transmiten la señal de la unión a su receptor de membrana de la insulina, confirmando trabajos puntuales de la literatura que muestran la existencia de estos sustratos a nivel central (Kubot y cols, 2004 ). Los ritmos para ambos sustratos son específicos y mientras que el IRS1 muestra valores máximos al final de las dos fases del fotoperiodo, el IRS2 solo muestra valores máximos en la segunda fase del periodo oscuro. El que ambos sustratos estén incrementados al final de la segunda fase del periodo oscuro estaría en relación con un incremento en el número de receptores para insulina y de la propia hormona circulante en el grupo control, que les implica en la

regulación del metabolismo de carbohidratos según datos previos de la literatura utilizando muestreo puntual (Wang y cols, 2010). Estos dos sustratos son los más importantes en relación con el metabolismo energético (Gu y cols, 2004 ). Sin embargo, los efectos de ambos sustratos sobre el metabolismo, son específicos y mientras que el IRS1 actúa a nivel periférico mayoritariamente (Dong y cols, 2006), el IRS2 actuaría a nivel central (Burks y cols, 2000; Kubota y cols, 2004; Choudhury y cols, 2005). Los efectos de ambos sustratos han sido extensivamente estudiados a nivel hepático (Dong y cols, 2006) o pancreático (Pandi-Perumal y cols, 2008) pero no a nivel central que es el objetivo de este trabajo.

Describimos por primera vez los efectos de un tratamiento con melatonina sobre la cascada de eventos que se producen inmediatamente después de que la insulina se una a su receptor a nivel hipotalámico; mostrando que la hormona pineal ejerce efectos diferenciales sobre ambos sustratos: Mientras que produce avances de fase hasta las 09:00 horas en los valores máximos de expresión del gen del sustrato IRS1, que se observan en el periodo oscuro en el animal control; se detecta un descenso en la amplitud del ritmo de IRS2, sin cambios en el perfil de dicho ritmo. El efecto sobre la expresión de IRS2 induciría hiperfagia de acuerdo con datos previos de la literatura (Burks y cols, 2000), lo que no explicaría el descenso de peso que se produce en los animales tratados con la hormona pineal. Ello, sugeriría que los efectos periféricos de melatonina, debido a la presencia de sus receptores tanto en tejido adiposo (Alonso-Vale y cols, 2008) o pancreático (Pandi-Perumal y cols, 2008) son de mayor magnitud que sus efectos a nivel central, como hemos comentado con anterioridad.

## **Bloque 2**

### **5.2 - Administración de melatonina, durante 11 semanas, en ratas adultas alimentadas con una dieta hipergrasa**

#### **A) Resumen e interpretación de resultados**

La administración de una dieta hipergrasa, durante 11 semanas, incrementó el peso corporal en un 55% al final del estudio, en comparación con el grupo control, y que este efecto fue a expensas de un incremento en la masa de tejido adiposo. Esta variación se asoció con un incremento marcado en los niveles circulantes de insulina, leptina y adiponectina, así como de glucosa, colesterol, triglicéridos y proteínas plasmáticas. El tratamiento con melatonina desde el comienzo de la administración de la dieta hipergrasa, previno parcialmente el incremento en el peso con respecto al grupo alimentado con la dieta hipergrasa, aunque estos valores no alcanzaron los del grupo control. Este efecto se asocia con una recuperación de los niveles circulantes de glucosa e insulina hasta valores encontrados en el grupo control, mientras que se produjo una recuperación parcial en los niveles circulantes de leptina, adiponectina, triglicéridos y colesterol y sorprendentemente, no normalizó los niveles circulantes de proteínas salvo en la toma de la 09:00 h. Todo ello, confirmando el papel anorexigénico de la melatonina independientemente de la dieta utilizada, ya que este efecto también se encuentra en animales tratados con una dieta de mantenimiento. Es importante destacar que la obesidad produce una alteración marcada en la secuencia temporal de los patrones diarios de los parámetros anteriormente mencionados, y que el tratamiento con melatonina previene al menos en parte estos efectos temporales deletéreos.

#### **B) Parámetros plasmáticos en ratas alimentadas con una dieta hipergrasa.**

Como era de esperar, la alimentación con una dieta hipergrasa comercial, incrementó en un 55% el peso corporal de ratas adultas macho. Este efecto fue evidente desde la segunda semana de tratamiento. Se observó una disminución de la movilidad de los animales a medida que se alargó el tiempo

de experimentación y la rata aumentaba progresivamente de peso, disminuyendo la calidad de vida de la misma. Para inducir obesidad existen en la literatura otros métodos menos controlados como la administración de dietas que se componen de sobras de restaurantes y/o cafeterías (Brandt y cols, 2010; Bailey y cols, 2010). Sin embargo, la dieta empleada en este experimento permite controlar las calorías aportadas por cada macro o micronutriente.

A diferencia de lo que ocurre en ratones en los que no se ha detectado un ritmo diario de glucosa (Kohsaka y cols, 2007), se observan cambios diarios en función del tiempo en las ratas control; ritmo que ha sido descrito previamente en trabajos del grupo realizados en la misma estación del año (Cano y cols, 2009). Los niveles circulantes de glucosa están incrementados en el grupo alimentado con dieta hipergrasa y concomitantemente se encuentran elevados los niveles circulantes de insulina, confirmando la existencia de una resistencia periférica a esta hormona, que podría derivar en diabetes (Sastard y cols, 2007; Waki y cols, 2008; Phillips y cols, 2008). Es importante destacar que se han relacionado los niveles circulantes de insulina con el grado de adiposidad tanto en animales de experimentación como en el hombre (Kalra y cols, 2003; Leidy y cols, 2004; Arora y cols, 2006; Ramsey y cols, 2007; Stylianou y cols, 2007; Guest y cols, 2008 y Cano y cols, 2009) y la existencia de receptores para insulina en dicho tejido confirmarían un mecanismo regulador bidireccional entre el tejido graso y la insulina (Zhang y cols, 2010; Beltrand y cols, 2010).

El patrón diario en sangre de glucosa, en ratas alimentadas con una dieta hipergrasa, indica que no existen alteraciones temporales en relación al grupo control, aunque sí se producen cambios en la amplitud de dicho ritmo, como se había descrito previamente (Cano y cols, 2009). Sin embargo, sí se producen alteraciones temporales en las variaciones diarias de insulina como se había descrito asimismo y se corresponden con un adelanto de fase de 4 horas en el pico máximo de insulina (Cano y cols, 2009). Esta alteración en el mecanismo temporal se puede explicar teniendo en cuenta trabajos recientes que muestran que la cantidad de dieta y calidad de la misma son dadores de tiempo (Boqué y cols, 2009; Rolls y cols, 2009). El hecho de que no existan diferencias en la cantidad de comida ingerida (Cano y cols, 2009) indica que la

variación en los porcentajes de grasas, proteínas y carbohidratos en la dieta, también actúan a nivel del reloj endógeno central modificando los patrones temporales de hormonas metabólicas implicadas en su utilización, como la insulina y otras, como la leptina.

Como habíamos encontrado para la insulina los niveles circulantes de leptina y adiponectina aumentaron en ratas obesas. El incremento en los niveles circulantes de leptina confirma trabajos previos del grupo que mostraron este efecto (Cano y cols, 2009). En relación con adiponeptina, la mayoría de los trabajos mostraron un descenso en sus niveles circulantes (Gnacinska y cols. 2009; Athyros y cols, 2010), con una sola excepción (Naderali y cols, 2003). Quizás este aumento esté relacionado con el grado de adiposidad, efecto descrito previamente por nuestro grupo (Cano y cols, 2009) y por trabajos previos de la literatura (Liu y cols, 2009; Ix y cols, 2010). Además, habría que tener en cuenta que la proliferación del tejido adiposo, que se observa en ratas alimentadas con una dieta hipergrasa, indicaría la presencia en el tejido de un mayor número de células productoras de esta hormona (Athyros y cols, 2010). Se produce una alteración temporal en los patrones diarios de leptina y adiponectina plasmáticas con la existencia de un plató de valores máximos de ambas hormonas durante el periodo oscuro del fotoperiodo, en ratas alimentadas con dieta hipergrasa, mientras que en el grupo control se encuentran niveles máximos de leptina a las 01:00 horas y bajos de adiponectina en el mismo horario. Este efecto podría explicarse al menos en parte teniendo en cuenta que estas hormonas indican saciedad (Ahima y cols, 2006; Valassi y cols, 2008) y es en el periodo oscuro del fotoperiodo cuando las ratas comen mayoritariamente. El incremento en la concentración plasmática de estas hormonas de saciedad al final del periodo oscuro facilitaría la supresión de la ingesta durante la fase inactiva (periodo luminoso) (Sukumaran y cols, 2010). El efecto de saciedad de los lípidos podría ser responsable de los niveles circulantes de estas hormonas, encontrados durante la fase oscura del fotoperiodo (Valassi y cols, 2008), ya que como discutiremos más adelante, este parámetro también está incrementado en esta misma fase del fotoperiodo (Rios-Lugo y cols, 2010).

Como era de esperar se encuentran niveles plasmáticos incrementados de triglicéridos siendo este efecto más marcado durante el periodo oscuro, que es el periodo activo en roedores (Bray y Young, 2007; Lafontan y cols, 2008). Sin embargo, la variabilidad de los datos nos impidió establecer un patrón temporal en ninguno de los grupos estudiados. La tendencia a valores más elevados por la noche estaría relacionada con los cambios en leptina y adiponectina anteriormente mencionados. El grado de hiperlipidemia observado implica un cambio en la presión osmótica sanguínea que puede producir modificaciones en los valores de presión arterial, que por ejemplo, podrían llevar al desarrollo de enfermedades cardiovasculares (McNaughton y cols, 2009).

A diferencia de lo que se describe para los triglicéridos, la administración de una dieta hipergrasa induce la aparición de un patrón temporal en los niveles plasmáticos de colesterol que no aparecía en el grupo control (Rios-Lugo y cols, 2010). Estos datos se podrían explicar en base a efectos específicos de la calidad de la dieta (porcentajes de lípidos, proteína y carbohidratos) sobre el reloj endógeno biológico (Laposky y cols, 2007; Kaneko y cols, 2009). Globalmente se produce un incremento marcado de los niveles circulantes de colesterol como cabría esperar, confirmando trabajos previos de la literatura (Bueno y cols, 2008). Es interesante destacar que los niveles de colesterol en el periodo oscuro del fotoperiodo no tienen los valores máximos como ocurría para los lípidos, por lo que los efectos de la hipercolesterinemia podrían ser independientes de los descritos anteriormente, aunque la posible formación de ateromas podrían conducir también al desarrollo de enfermedades cardiovasculares por otros mecanismos (Harchaoui y cols, 2009; Young y cols, 2010).

En las ratas obesas y controles se detecta la existencia de un patrón diario de los niveles plasmáticos de proteínas totales plasmáticas. Ello estaría de acuerdo con trabajos previos del grupo que muestran patrones rítmicos de proteínas plasmáticas específicas (como albúmina, que es el componente mayoritario de las proteínas plasmáticas o inmunoglobulinas; Agrasal y cols, 2001) y de otros estudios referidos en la literatura (Scheving y cols, 1968; Schade y cols, 1980; Soulban y cols, 1989). El patrón diario de los niveles

circulantes de proteínas totales encontrado, es similar en ambos grupos aunque aumenta la amplitud del ritmo en animales alimentados con la dieta hipergrasa. Ello podría estar relacionado con estados de nutrición diferencial ya que cambios en las concentraciones de proteínas plasmáticas se han relacionado con enfermedades metabólicas (Giuffrida y cols, 2010).

### **C) Parámetros plasmáticos en ratas alimentadas con una dieta hipergrasa tratadas en paralelo con melatonina**

El tratamiento con melatonina desde el comienzo de la administración de la dieta hipergrasa, disminuyó marcadamente el incremento en el peso con respecto al grupo alimentado con la dieta hipergrasa. Aunque estos valores se aproximaron, no alcanzaron los del grupo control. Ello estaría de acuerdo con el papel anorexigénico de la hormona pineal que hemos analizado en el bloque 1 de la discusión de este trabajo. Este trabajo abarcaría un concepto nuevo de utilización de la melatonina para controlar el peso corporal ya que hasta ahora el efecto de la hormona pineal se ha analizado en animales a los que previamente se les había inducido obesidad (Volden-Hanson y cols, 2000; Rasmussen y cols, 2001; Puchalski y cols, 2003) que efectivamente reducían el peso sin efectos sobre los animales controles.

Esta reducción en el incremento del peso se acompañó de una prevención efectiva en el incremento en los niveles circulantes de glucosa e insulina, impidiendo la instauración del fenómeno de resistencia periférica a esta hormona que se reproduce en los animales no tratados como se ha descrito en trabajos previos del grupo (Cano y cols, 2009; Rios y cols, 2010) y de la literatura (revisado por Peschke, 2008). Sin embargo, Prunet-Marcassus y cols (2003) utilizando un tratamiento de tres semanas a animales previamente obesos, no observaron cambios en los niveles circulantes de insulina, aunque sí se produjo el descenso en los niveles circulantes de glucosa, por lo que surge una pregunta: ¿La prevención del incremento de los niveles circulantes de glucosa es previa a la de los niveles circulantes de insulina? La discrepancia de resultados podría explicarse por la duración del tratamiento (3 semanas vs. 11 semanas en este estudio) y por la dosis de melatonina utilizada y que hemos mencionado con anterioridad, así como la vía de administración (una

sola administración vs agua de bebida en este estudio). Además, la mayoría de los datos sugieren que la melatonina afecta a los niveles circulantes de insulina y de glucosa independientemente de la dieta utilizada (hipergrasa vs. control; Rios y cols, 2010). Estos datos se podrían explicar, por otra parte, en base a la existencia de receptores para la melatonina en el páncreas (Mulder y cols, 2009) y en el hígado (Poon y cols, 2001), que indicarían un efecto directo de la melatonina sobre la secreción de insulina y sobre los niveles de glucosa en sangre.

A diferencia de lo que ocurría en animales alimentados con dieta de mantenimiento en los que la melatonina producía una desaparición del patrón rítmico de los niveles plasmáticos de insulina; la hormona pineal impide la desincronización que se observa en los animales alimentados con la dieta hipergrasa únicamente, confirmando un efecto cronobiótico de esta hormona, que ha sido claramente definido en la literatura (Revel y cols, 2009; Reiter y cols, 2010). Efectos de la melatonina a través de cambios en la generación de daño oxidativo, podrían formar parte del mecanismo global de la hormona sobre el binomio insulina-glucosa, ya que la hormona pineal modifica los patrones diarios de enzimas oxidantes y antioxidante celulares (Poliandri y cols, 2006; Cano y cols, 2007; Jiménez-Ortega y cols, 2009; Crespo y cols, 2010).

Además, el tratamiento con melatonina a ratas alimentadas con una dieta hipergrasa, previno parcialmente los incrementos que se observaron en los niveles circulantes de adiponectina, de leptina, colesterol y triglicéridos así como impidió la desincronización de estos ritmos, al menos parcialmente, al comparar con los datos obtenidos en ratas obesas, sugiriendo que la melatonina ejerce sus efectos sobre el metabolismo a través de varios mecanismos descritos en la introducción que son: efectos cronobióticos (Reiter y cols, 2010), antioxidantes (Poliandri y cols, 2006; Cano y cols, 2007; Jiménez-Ortega y cols, 2009; Crespo y cols, 2010) y anti-inflamatorios (Radogna y cols, 2010).

El tratamiento con melatonina previno las modificaciones en los niveles circulantes de proteínas totales inducidos por la dieta hipergrasa. El patrón diario de los niveles circulantes de proteínas totales, encontrado, es similar en todos los grupos, aunque aumenta la amplitud del ritmo en animales

alimentados con la dieta hipergrasa tratados o no con la hormona pineal. Ello podría estar relacionado, como hemos mencionado con anterioridad, con estados de nutrición diferencial ya que cambios en las concentraciones de proteínas plasmáticas se han relacionado con enfermedades metabólicas (Giuffrida y cols, 2010).

#### **D) Parámetros Génicos en ratas alimentadas con una dieta hipergrasa**

Se describe, en este trabajos, por primera vez el efecto de una dieta hipergrasa sobre el patrón de expresión diario del gen de NPY (neuropéptido principal de la vía orexigénica), que muestra un incremento marcado en la primera fase del periodo oscuro frente al que se observa en el grupo control, sin cambios en el perfil de dicho ritmo en el periodo oscuro. Ello podría deberse a la existencia de un descenso marcado en la amplitud del pico nocturno de melatonina descrito previamente (Cano y cols, 2008), que estaría relacionado con la expresión del gen NPY en el animal control, pero no en el obeso. A diferencia de lo que ocurre en el grupo control, también se encuentra elevada la expresión del gen de NPY durante el periodo luminoso. Si consideramos que este aumento es indicativo de una activación de la vía orexigénica, ello sugeriría que la rata come durante todo el día. Sin embargo, dado que la cantidad de comida que ingieren las ratas alimentadas con una dieta hipergrasa por día es igual a la de los animales controles, alimentados con una dieta de mantenimiento, cabría suponer que debido probablemente al efecto saciante de los lípidos (Boqué y cols, 2009; Rolls y cols, 2009), los animales comen menos cantidad de comida, pero con mayor frecuencia. Sin embargo, hay que resaltar que el efecto de la dieta hipergrasa es opuesto para este gen en ratones (Kohsaka y cols, 2007). Además, la diferencia de respuesta estaría en la composición de las dietas utilizadas (alta en grasas en este estudio frente a dieta hipergrasa, baja en carbohidratos en el estudio con ratones).

El patrón de expresión génica diario del gen de POMC seguiría un patrón similar al de NPY en el grupo control con valores máximos de dicho parámetro durante la primera fase del periodo oscuro, lo que indicaría un incremento en las señales inhibitoras del apetito en oposición a lo mencionado para el NPY. Sin embargo, en las ratas obesas, la disminución de melatonina nocturna (Cano y cols, 2008) produciría un desajuste del reloj endógeno central que se

traduciría en un adelanto de fase de 4 horas en la expresión máxima del gen de POMC y además con la aparición de otro máximo a las 09:00 h. Todo ello indicando que la dieta es un zeitgeber externo que regula la homeostasis del individuo (Arble y cols, 2009; Van der Steen y cols, 2010). Es importante destacar que la relación que aparece entre la expresión del gen de NPY y del de POMC en el grupo control desaparece en los animales alimentados con una dieta hipergrasa, produciendo desajustes en la relación mecanismo orexigénico/mecanismo anorexigénico a lo largo del día y por tanto, desajustando el periodo de ingesta y/o utilización de los sustratos energéticos. De hecho, los componentes mayoritarios de la dieta actuarían a nivel del reloj endógeno central re-sincronizándole (Boqué y cols, 2009; Rolls y cols, 2009) e induciendo nuevas relaciones en los mecanismos reguladores del apetito.

La expresión del gen de PrRP en animales controles, muestra un ritmo diario, en el hipotálamo medio basal, con valores máximos durante el periodo oscuro. Como ocurría en el grupo control, se describe por primera vez los efectos de la alimentación con una dieta hipergrasa sobre el ritmo de expresión del gen de PrRP. En los animales alimentados con una dieta hipergrasa se produce un incremento en la amplitud del ritmo conjuntamente con un cambio drástico en su perfil si comparamos ambos grupos. Como en el caso del animal control tratado con melatonina, en la rata obesa se observa un perfil del ritmo que se acoplaría al patrón secretor de prolactina de la estación de otoño, indicado que la calidad de la dieta juega un papel fundamental para que el individuo descifre la estación del año en la que se encuentra (Dibner y cols, 2010). Este hecho podría estar también relacionado con el incremento de la adiposidad ya que la prolactina incrementa el almacén de lípidos no solo en mamíferos sino en otras especies que necesitan acumular sustratos energéticos para la migración como las aves (Yoshimura y cols, 2010) o algunos peces (Migaud y cols, 2010). Es importante destacar que en esta condición experimental se encuentra marcadamente disminuida la melatonina pineal, lo que implicaría además un efecto de envejecimiento en los animales obesos que ha sido descrito previamente (Reiter y cols, 2010).

Describimos por primera vez el ritmo de expresión del gen del receptor de leptina en el hipotálamo medio basal de ratas adultas alimentadas con una

dieta hipergrasa, que también sigue un patrón rítmico con niveles de expresión claramente elevados durante la fase oscura del fotoperiodo con respecto al grupo control. Este efecto podría estar relacionado con el descenso de melatonina pineal que se describe en animales obesos (Cano y cols, 2008), en un efecto similar al descrito para los genes de NPY y de POMC. Es importante destacar que en este gen no se observan diferencias significativas en el perfil del ritmo. El efecto es similar al resto de los parámetros anteriormente analizados en este trabajo, lo que sugiere que durante la primera fase del periodo de oscuridad la leptina, al unirse a su receptor, activaría las vías orexigénicas por el que la rata empieza a comer (Verwey y cols, 2009; Nakagawa y cols, 2010). Aunque, paradójicamente también comienza a activar las vías anorexigénicas, lo que permitiría una ingesta controlada. Ello es posible porque existen receptores de leptina tanto en la vía anorexigénica como la orexigénica de regulación de la ingesta (Sánchez-Lasheras y cols, 2010; Schwartz y cols, 2010). El hecho de que se produzca un incremento marcado de la amplitud del ritmo de expresión del gen de leptina, podría indicar un desequilibrio en los mecanismos orexigénico/anorexigénico de regulación del apetito que formaría parte del mecanismo de inducción de la obesidad. Es importante destacar que la leptina es un péptido anorexigénico principal que puede modificar la actividad de otros péptidos anorexigénico como el POMC y por lo tanto de a MSH y neurotensina implicados en la rama anorexigénica del mecanismo de regulación del apetito (Arora y cols, 2006; Valassi y cols, Schwartz y cols, 2010).

La expresión del gen del receptor de insulina en ratas adultas, alimentadas con una dieta hipergrasa, muestra un ritmo diario con valores más altos en la segunda fase del periodo luminoso del fotoperiodo. Como para los otros parámetros este trabajo muestra por primera vez este ritmo diario, que confirma datos puntuales de la literatura en los que se describe la existencia de receptores para insulina en el hipotálamo (Porte y cols, 2005; Banas y cols, 2009). Es interesante resaltar que se produce un adelanto de fase en la expresión máxima del gen del receptor de insulina hasta las 17:00 h, cuando se compara con el grupo control; indicando efectos no deseados en la segunda fase del periodo luminoso en el que encontramos niveles elevados de insulina y

de la expresión del receptor y que se corresponde con el periodo inactivo en roedores. Además, se produce una disminución marcada en la expresión de este gen en ratas alimentadas con una dieta hipergrasa, a las 05:00 h, aunque los niveles circulantes de la hormona permanecen elevados. Ello indica una alteración en la disponibilidad de receptores en relación con los niveles circulantes de la hormona que estaría reflejando el efecto de resistencia periférica a la insulina. Esta disparidad es importante ya que se corresponde con el periodo en el que la insulina promovería el almacenaje de glucosa y ácidos grasos, que comienza en la segunda fase del periodo oscuro (Xu y cols, 2006; Arora y cols, 2006; Banas y cols, 2009).

Se describen, por primera vez, las variaciones diarias de los sustratos intracelulares IRS-1 y 2, en ratas alimentadas con una dieta hipergrasa, que transmiten la señal de la unión a su receptor de membrana de la insulina. Esto es posible ya que se han descrito ambos péptidos en las áreas hipotalámicas involucradas en la regulación del metabolismo (Kubot y cols, 2004; Schwartz y cols, 2010) y son los más importantes en los mecanismos reguladores del apetito (White y cols, 2006). Los efectos de la dieta hipergrasa son similares ya que ambos sustratos incrementan marcadamente la amplitud del ritmo descrito en controles. Es interesante resaltar que el incremento sostenido en estos sustratos se corresponde con niveles plasmáticos elevados de insulina, lo que indicaría una señalización ubicua de la hormona tanto en los tejidos periféricos, con efectos mayoritariamente dependientes del sustrato IRS-1 (Burks y cols, 2000; Kubota y cols, 2004; Choudhury y cols, 2005), como a nivel central, que dependen mayoritariamente del sustrato IRS-2 (Takayanagi y cols, 2008). La mayoría de los efectos de estos sustratos han sido extensivamente estudiados a nivel hepático (Dong y cols, 2006) y pancreático (Zhang y cols, 2009).

#### **E) Parámetros génicos en ratas adultas alimentadas con una dieta hipergrasa, tratadas con melatonina en paralelo**

El tratamiento con melatonina, en ratas alimentadas con una dieta hipergrasa, previno parcialmente los cambios en los ritmos diarios de expresión de los genes de NPY, POMC, de los receptores de leptina, PrRP e insulina, así

como de los sustratos de los receptores de insulina IRS1 y 2. Los efectos en conjunto son específicos de acuerdo con el parámetro considerado. Así en algunos de ellos, se modifica la amplitud del ritmo, mientras que en otros previene los adelantos o atrasos de fase de los valores máximos del gen estudiado. Ello podría deberse a que se corrige la deficiencia nocturna de melatonina por el tratamiento con la hormona pineal (Cano y cols, 2008). Este es un efecto que hemos encontrado previamente en otros modelos experimentales como el de la rata hiperprolactinémica en la que el tratamiento con melatonina revirtió los efectos hipogonadotróficos descritos (Esquifino y cols, 1989; Villanua y cols, 1989).

Los mayores efectos del tratamiento con melatonina se han detectado para el NPY ya que evita los cambios en el perfil y en la amplitud del ritmo de la fase oscura, que se han encontrado en el grupo alimentado con la dieta hipergrasa. Este efecto novedoso, sugiere que la melatonina, impide que se produzcan alteraciones en los patrones de ingesta durante el periodo oscuro del fotoperiodo, fase en la que la rata presenta su etapa de actividad y por tanto, se producen cambios drásticos en el metabolismo energético. Además, hay que tener en cuenta, que la ingesta de alimentos se produce en esta fase también.

Asimismo, la melatonina parcialmente impidió los cambios temporales que se inducen en ratas obesas, en el gen de POMC sobre todo durante la fase oscura del fotoperiodo, sugiriendo que el pico de secreción de melatonina durante el periodo oscuro es un modulador del metabolismo tanto a nivel central como periférico (Revel y cols, 2009; Reiter y cols, 2010).

A diferencia de lo que ocurría para el NPY y la POMC, la melatonina indujo un perfil en el ritmo de expresión relativa de PrRP, que se asemeja a los niveles plasmáticos de prolactina en otoño. Esto indicaría que además de sus efectos ya descritos como factor anorexigénico (Takayanagi y cols, 2008), el PrRP ejercería un efecto temporal relacionado con la estacionalidad representada por la prolactina, ya que este neuropéptido participa en el mecanismo de regulación de esta hormona hipofisaria (Seal y cols, 2000; Samson y cols, 2000). Ello sugeriría que en estas circunstancias el individuo es incapaz de identificar en qué estación del año se encuentra, ya que el experimento se ha realizado en invierno y el marcador temporal estaría

indicando otoño y con ello, señales diferentes para la regulación de la ingesta que podría explicar por qué la rata come la misma cantidad independientemente de la dieta que se la administra.

En el caso del receptor de leptina la melatonina previno parcialmente los efectos de la dieta hipergrasa, siendo sus efectos más marcados durante la fase oscura del fotoperiodo como ocurría para los genes de NPY, POMC y PrRP. Todo ellos indicando que existen relaciones muy estrechas entre todos estos parámetros durante el periodo oscuro para regular la ingesta y el balance energético ya que la rata es un animal nocturno. Este efecto podría estar relacionado con la normalización del pico nocturno de melatonina pineal, claramente disminuidos en animales obesos (Cano y cols, 2008), en un efecto similar al descrito para los genes de NPY, POMC y PrRP.

Es interesante resaltar que el tratamiento con melatonina en animales alimentados con una dieta hipergrasa impidió los cambios de amplitud y de perfil del receptor de insulina, que se encuentra en las ratas obesas durante el periodo luminoso del fotoperiodo a diferencia del resto de parámetros anteriormente mencionados, que muestran sus efectos durante la fase oscura del fotoperiodo. También estaría de acuerdo con la normalización de los niveles circulantes de insulina durante el periodo luminoso del fotoperiodo. Ello, se correlacionaría mas con los efectos periféricos de la hormona si consideramos lo valores de IRS-1 y 2 durante el periodo luminoso. Sin embargo, es importante destacar que se produce un descenso marcado del receptor de insulina durante la fase oscura del fotoperiodo, que correlacionaría con los niveles disminuidos de IRS-1 y de insulina, aunque la respuesta central de esta última no estaría afectada en los efectos mediados por IRS-2, ya que este sustrato presenta un perfil similar al del grupo control en la fase oscura del fotoperiodo.

Todos estos datos sugieren que la melatonina sería una buena herramienta de trabajo para desarrollar programas de prevención por un lado y además, para ver si se puede usar como terapéutica alternativa a la cirugía en individuos obesos que es causa de mortalidad alta y de que al menos un 15% de las ratas obesas operadas terminen recuperando el peso (Larrad y cols, 2005).

## ***CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES***



A continuación se resumen las conclusiones más relevantes de esta Tesis Doctoral.

1.- Los resultados obtenidos indican que la administración crónica de melatonina, en ratas adultas macho, produjo un efecto anorexigénico, que se explicaría al menos en parte por cambios en el metabolismo energético, según indican los patrones rítmicos de los parámetros metabólicos estudiados.

2.- La melatonina, administrada crónicamente a ratas adultas macho, indujo cambios temporales no descritos hasta este trabajo, en el mecanismo de regulación del apetito a nivel del hipotálamo medio basal, modificando los ritmos de expresión génica relativa diaria de NPY, POMC, PrRP, LepR e IR, así como de los sustratos del receptor de insulina 1 y 2.

3.- La administración de una dieta hipergrasa, durante 11 semanas, a ratas adultas macho, indujo obesidad, que se explicaría por un incremento marcado en la amplitud y/o cambios en la fase de los ritmos diarios de los parámetros metabólicos estudiados.

4.- El tratamiento con melatonina desde el comienzo de la administración de la dieta hipergrasa a ratas adultas macho, previno parcialmente el incremento en el peso, que se explicaría por la ausencia de cambios en los ritmos diarios de glucosa e insulina, y por el menor grado de alteración en el resto de los patrones metabólicos medidos con respecto a los encontrados en animales alimentados con la dieta hipergrasa únicamente.

5.- Se describe por primera vez, en la rata macho adulta, que la administración de una dieta hipergrasa, durante 11 semanas, altera la amplitud y/o la fase de los ritmos diarios de expresión génica relativa diaria de NPY, POMC, PrRP, LepR e IR, así como de los sustratos del receptor de insulina 1 y 2 en el hipotálamo medio basal; alterando por tanto, la relación temporal diaria de todos estos parámetros involucrados en la regulación del apetito; que explicarían al menos en parte el mecanismo de inducción de la obesidad.

6.- Se describe por primera vez, que el tratamiento con melatonina, desde el comienzo de la alimentación con una dieta hipergrasa, en ratas adultas macho, previno parcialmente los cambios de amplitud y/o fase de los ritmos diarios de expresión de los genes de NPY, POMC, de los receptores de leptina, PRrP e insulina, así como de los sustratos de insulina IRS1 y 2 en el hipotálamo medio basal, impidiendo parcialmente que se alteren las relaciones temporales entre todos estos parámetros que forman parte del mecanismo regulador del apetito.

Globalmente los datos sugieren que la melatonina podría ser una terapia alternativa a la cirugía, en los individuos obesos, ya que previene el efecto de resistencia a la insulina y por tanto reduce los riesgos de padecer diabetes. Por otro lado, previene parcialmente los efectos sobre el colesterol y los triglicéridos reduciendo los riesgos cardiovasculares que se describen en individuos obesos.

## ***CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFIA***



Agez L, Laurent V, Guerrero HY, Pévet P, Masson-Pévet M, Gauer F. Endogenous melatonin provides an effective circadian message to both the suprachiasmatic nuclei and the pars tuberalis of the rat. *J Pineal Res.* 2009 Jan;46(1):95-105

Agrasal C, Esquifino AJ, García-Bonacho M, Reyes-Toso CF, Cardinali DP. Effect of melatonin on 24h changes in plasma protein levels during the preclinical phase of Freund's adjuvant arthritis in rats. *Chronobiol Int.* 2001 May;18(3):435-46.

Agrawal A, Mabalirajan U, Ahmad T, Ghosh B. Emerging Interface Between Metabolic Syndrome And Asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010 Jul 23

Ahima RS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity (Silver Spring).* 2006 Aug;14 Suppl 5:242S-249S.

Alonso-Vale MI, Andreotti S, Mukai PY, Borges-Silva CN, Peres SB, Cipolla-Neto J, Lima FB. Melatonin and the circadian entrainment of metabolic and hormonal activities in primary isolated adipocytes. *J Pineal Res.* 2008 Nov;45(4):422-9.

Anubhuti, Arora S. Leptin and its metabolic interactions: an update. *Diabetes Obes Metab.* 2008 Nov;10(11):973-93.

Arble DM, Bass J, Laposky AD, Vitaterna MH, Turek FW. Circadian timing of food intake contributes to weight gain. *Obesity (Silver Spring).* 2009 Nov;17(11):2100-2.

Arora S, Anubhuti. Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity--a review. *Neuropeptides.* 2006 Dec;40(6):375-401.

Asarian L, Langhans W. A new look on brain mechanisms of acute illness anorexia. *Physiol Behav.* 2010 Jul 14;100(5):464-71.

Asarian L, Langhans W. A new look on brain mechanisms of acute illness anorexia. *Physiol Behav.* 2010 Jul 14;100(5):464-71.

Aschner P, Horton E, Leiter LA, Munro N, Skyler JS; Global Partnership for Effective Diabetes Management. Practical steps to improving the management of type 1 diabetes: recommendations from the Global Partnership for Effective Diabetes Management. *Int J Clin Pract.* 2010 Feb;64(3):305-15

Athyros VG, Tziomalos K, Karagiannis A, Anagnostis P, Mikhailidis DP. Should adipokines be considered in the choice of the treatment of obesity-related health problems? *Curr Drug Targets* 2010; 11:122–135.

Bailey BW, Sullivan DK, Kirk EP, Donnelly JE. Dietary predictors of visceral adiposity in overweight young adults. *Br J Nutr.* 2010 Jun;103(12):1702-5.

Banas SM, Rouch C, Kassis N, Markaki EM, Gerozissis K. A dietary fat excess alters metabolic and neuroendocrine responses before the onset of metabolic diseases. *Cell Mol Neurobiol.* 2009 Mar;29(2):157-68.

Bechtold DA. Energy-responsive timekeeping. *J Genet.* 2008 Dec; 87(5):447-5

Beck B Neuropeptides and obesity. *Nutrition.* 2000 Oct;16(10):916-23.

Beck B. Neuropeptides and obesity. *Nutrition.* 2000 Oct;16(10):916-23. Review

Beltrand J, Meas T, Levy-Marchal C. Pathophysiology of insulin resistance in small for gestational age subjects: a role for adipose tissue? *Endocr Dev.* 2010;19:73-83.

Berson DM. – “Phototransduction in ganglion-cell photoreceptors” *Pflugers Arch* 2007; 454:849-855.

Blevins JE, Baskin DG. Hypothalamic-brainstem circuits controlling Eating. *Forum Nutr.* 2010; 63:133-40.

Blevins JE, Baskin DG. Hypothalamic-brainstem circuits controlling Eating. *Forum Nutr.* 2010; 63:133-40.

Bojková B, Orendás P, Friedmanová L, Kassayová M, Datelinka I, Ahlersová E, Ahlers I. Prolonged melatonin administration in 6-month-old Sprague-Dawley rats: metabolic alterations. *Acta Physiol Hung.* 2008 Mar;95(1):65-76.

Bonnefont X. Circadian timekeeping and multiple timescale neuroendocrine rhythms. *J Neuroendocrinol.* 2010 Mar; 22(3):209-16.

Boqué N, Campión J, Paternain L, García-Díaz DF, Galarraga M, Portillo MP, Milagro FI, Ortiz de Solórzano C, Martínez JA. Influence of dietary macronutrient composition on adiposity and cellularity of different fat depots in Wistar rats. *J Physiol Biochem.* 2009 Dec; 65(4):387-95.

Boutin JA, Audinot V, Ferry G, Delagrangé P. Molecular tools to study melatonin pathways and actions. *Trends Pharmacol Sci.* 2005 Aug;26(8):412-9.

Brandt N, De Bock K, Richter EA, Hespel P. Cafeteria diet-induced insulin resistance is not associated with decreased insulin signaling or AMPK activity and is alleviated by physical training in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010 Aug;299(2):E215-24.

Bray MS, Young ME. Circadian rhythms in the development of obesity: potential role for the circadian clock within the adipocyte. *Obes Rev.* 2007 Mar;8(2):169-81.

Brydon L, Petit L, Delagrangé P, Strosberg AD, Jockers R Functional expression of MT2 (Mel1b) melatonin receptors in human PAZ6 adipocytes. *Endocrinology.* 2001 Oct;142(10):4264-71.

Bueno AA, Oyama LM, De Oliviera C, Pisani LP, Ribeiro EB, Silveira VL AND Oller Do Nascimento CM. 2008. Effects of different fatty acids and dietary lipids on adiponectin gene expression in 3T3-L1 cells and C57BL/6J mice adipose tissue. *Pflugers Arch* 455: 701-709.

Burks DJ, Font de Mora J, Schubert M, Withers DJ, Myers MG, Towery HH, Altamuro SL, Flint CL, White MF. IRS-2 pathways integrate female reproduction and energy homeostasis. *Nature*. 2000 Sep 21;407(6802):377-82.

Cano P, Cardinali D.P., Jiménez-Ortega, Ríos-Lugo J, Scacchi P, Esquifino A. Effect of a High-Fat Diet on 24-hour Pattern in Expresión of Prolactin and Redox Pathway Enzymes in the Rat Adenohypophysis. *Open Obesiy Journal*, 2: 1-19, 2010

Cano P, Cardinali DP, Ríos-Lugo MJ, Fernández-Mateos MP, Reyes Toso CF, Esquifino AI. Effect of a high-fat diet on 24-hour pattern of circulating adipocytokines in rats. *Obesity (Silver Spring)*. 2009 Oct;17(10):1866-71.

Cano P, Jiménez-Ortega V, Larrad A, Reyes Toso CF, Cardinali DP, Esquifino AI. Effect of a high-fat diet on 24-h pattern of circulating levels of prolactin, luteinizing hormone, testosterone, corticosterone, thyroid-stimulating hormone and glucose, and pineal melatonin content, in rats. *Endocrine*. 2008 Apr;33(2):118-25.

Cano P, Poliandri AH, Jiménez V, Cardinali DP, Esquifino AI. Cadmium-induced changes in Per 1 and Per 2 gene expression in rat hypothalamus and anterior pituitary: effect of melatonin. *Toxicol Lett*. 2007 Aug;172(3):131-6.

Capeau J, Magré J, Lascols O, Caron M, Béréziat V, Vigouroux C, Bastard JP. Diseases of adipose tissue: genetic and acquired lipodystrophies. *Biochem Soc Trans*. 2005 Nov;33(Pt 5):1073-7.

Cardinali DP .Melatonin. *Physiology and clinical applications*] Vertex. 2007 Jul-Aug;18(74):288-93.

Cardinali DP, Esquifino AI, Srinivasan V, Pandi-Perumal SR. Melatonin and the immune system in aging. *Neuroimmunomodulation*. 2008;15(4-6):272-8. Cardinali DP, Pévet P. Basic aspects of melatonin action. *Sleep Med Rev*. 1998 Aug;2(3):175-90.

Cardinali DP, Pévet P. Basic aspects of melatonin action. *Sleep Med Rev*. 1998 Aug;2(3):175-90.

Castrillón PO, Cardinali DP, Pazo D, Cutrera RA, Esquifino AI. Effect of superior cervical ganglionectomy on 24-h variations in hormone secretion from the anterior hypophysis and in hypothalamic monoamine turnover during the preclinical phase of Freund's adjuvant arthritis in rats. *J Neuroendocrinol*. 2001 Mar;13(3):288-95.

Cermakian N, Boivin DB. The regulation of central and peripheral circadian clocks in humans. *Obes Rev.* 2009 Nov;10 Suppl 2:25-36.

Chacón F, Esquifino AI, Perelló M, Cardinali DP, Spinedi E, Alvarez MP. 24-hour changes in ACTH, corticosterone, growth hormone, and leptin levels in young male rats subjected to calorie restriction. *Chronobiol Int.* 2005;22(2):253-65.

Chahbouni M, Escames G, Venegas C, Sevilla B, García JA, López LC, Muñoz-Hoyos A, Molina-Carballo A, Acuña-Castroviejo D. Melatonin treatment normalizes plasma pro-inflammatory cytokines and nitrosative/oxidative stress in patients suffering from Duchenne muscular dystrophy. *J Pineal Res.* 2010 Apr;48(3):282-9.

Challet E, Mendoza J, Dardente H, Pévet P. Neurogenetics of food anticipation. *Eur J Neurosci.* 2009 Nov;30(9):1676-87.

Challet E. – “Minireview: entrainment of the suprachiasmatic clockwork in diurnal and nocturnal mammals” *Endocrinology* 2007; 148:5648-5655.

Chaput JP, Tremblay A. The glucostatic theory of appetite control and the risk of obesity and diabetes. *Int J Obes (Lond).* 2009 Jan; 33(1):46-53.

Chee MJ, Myers MG Jr, Price CJ, Colmers WF. Neuropeptide Y suppresses anorexigenic output from the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J Neurosci.* 2010 Mar 3;30(9):3380-90.

Chee MJ, Myers MG Jr, Price CJ, Colmers WF. Neuropeptide Y suppresses anorexigenic output from the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J Neurosci.* 2010 Mar 3;30(9):3380-90

Choi K, Kim YB. Molecular mechanism of insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Korean J Intern Med.* 2010 Jun;25(2):119-29.

Choudhury AI, Heffron H, Smith MA, Al-Qassab H, Xu AW, Selman C, Simmgen M, Clements M, Claret M, Maccoll G, Bedford DC, Hisadome K, The role of insulin receptor substrate 2 in hypothalamic and beta cell function. *J Clin Invest.* 2005 Apr;115(4):940-50

Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdán MG, Diano S, Horvath TL, Cone RD, Low MJ. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature.* 2001 May 24;411(6836):480-4

Crespo I, Miguel BS, Laliena A, Alvarez M, Culebras JM, González-Gallego J, Tuñón MJ. Melatonin prevents the decreased activity of antioxidant enzymes and activates nuclear erythroid 2-related factor 2 signaling in an animal model of fulminant hepatic failure of viral origin. *J Pineal Res.* 2010 Sep;49(2):193-200.

Cutrera RA, Boggio VI, Castrillón PO, Scacchi PA, Esquifino AI, Cardinali DP. Fos immunoreactivity in the suprachiasmatic nuclei of golden hamsters bearing an ectopic pituitary graft. *Neurosignals*. 2002 May-Jun;11(3):144-50.

Diakonov I, Moosajee V, Bell JD, Speakman JR, Batterham RL, Barsh GS, Ashford ML, Withers DJ. The role of insulin receptor substrate 2 in hypothalamic and beta cell function. *J Clin Invest*. 2005 Apr;115(4):940-50.

Dibner C, Schibler U, Albrecht U. The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annu Rev Physiol*. 2010 Mar 17;72:517-49.

Diéguez C, Fruhbeck G, López M. Hypothalamic lipids and the regulation of energy homeostasis. *Obes Facts*. 2009;2(2):126-35

D'mello AP, Liu Y. Effects of maternal immobilization stress on birth weight and glucose homeostasis in the offspring. *Psychoneuroendocrinology*. 2006 Apr;31(3):395-406. Dolinoy DC. The agouti mouse model: an epigenetic biosensor for nutritional and environmental alterations on the fetal epigenome. *Nutr Rev*. 2008 Aug;66 Suppl 1:S7-11

Dolinoy DC. The agouti mouse model: an epigenetic biosensor for nutritional and environmental alterations on the fetal epigenome. *Nutr Rev*. 2008 Aug;66 Suppl 1:S7-11. Review

Dong X, Park S, Lin X, Copps K, Yi X, White MF. Irs1 and Irs2 signaling is essential for hepatic glucose homeostasis and systemic growth. *J Clin Invest*. 2006 Jan;116(1):101-14

Duez H, Staels B. Rev-erb alpha gives a time cue to metabolism. *FEBS Lett*. 2008 Jan 9;582(1):19-25.

Duvnjak L, Duvnjak M.J The metabolic syndrome - an ongoing story. *Physiol Pharmacol*. 2009 Dec;60 Suppl 7:19-24.

Ekmekcioglu C, Touitou Y. Chronobiological aspects of food intake and metabolism and their relevance on energy balance and weight regulation. *Obes Rev*. 2010 Jan 27.

Ellacott KL, Lawrence CB, Rothwell NJ, Luckman SM. PRL-releasing peptide interacts with leptin to reduce food intake and body weight. *Endocrinology*. 2002 Feb;143(2):368-74.

Escobar C, Cailotto C, Angeles-Castellanos M, Delgado RS, Buijs RM. Peripheral oscillators: the driving force for food-anticipatory activity. *Eur J Neurosci*. 2009 Nov;30(9):1665-75.

Esquifino A, Agrasal C, Velázquez E, Villanúa MA, Cardinali DP. Effect of melatonin on serum cholesterol and phospholipid levels, and on prolactin,

thyroid-stimulating hormone and thyroid hormone levels, in hyperprolactinemic rats. *Life Sci.* 1997;61(11):1051-8.

Esquifino AI, Cano P, Jiménez-Ortega V, Fernández-Mateos P, Cardinali DP. Neuroendocrine-immune correlates of circadian physiology: studies in experimental models of arthritis, ethanol feeding, aging, social isolation, and calorie restriction. *Endocrine.* 2007 Aug;32(1):1-19.

Esquifino AI, Chacon F, Cano P, Marcos A, Cutrera RA, Cardinali DP. Twenty-four-hour rhythms of mitogenic responses, lymphocyte subset populations and amino acid content in submaxillary lymph nodes of growing male rats subjected to calorie restriction. *J Neuroimmunol.* 2004 Nov;156(1-2):66-73.

Esquifino AI, Pazo D, Cutrera RA, Cardinali DP. Seasonally dependent effect of ectopic pituitary grafts on 24-hour rhythms in serum prolactin and gonadotropins in rats. *Chronobiol Int.* 1999 Jul;16(4):451-60.

Fawcett KA, Barroso I. The genetics of obesity: FTO leads the way. *Trends Genet.* 2010 Jun;26(6):266-74

Fischer S, Navarrete Santos A, Thieme R, Ramin N, Fischer B. Adiponectin Stimulates Glucose Uptake in Rabbit Blastocysts. *Biol Reprod.* 2010 Aug 4.

Flora SJ, Bhadauria S, Kannan GM, Singh N. Arsenic induced oxidative stress and the role of antioxidant supplementation during chelation: a review. *M J Environ Biol.* 2007 Apr;28(2 Suppl):333-47.

Ganguly S, Coon SL, Klein DC. Control of melatonin synthesis in the mammalian pineal gland: the critical role of serotonin acetylation. *Cell Tissue Res.* 2002 Jul;309(1):127-37.

García Fernández, J.M. Los ritmos biológicos y sus fundamentos neurales. En: *Manual de Neurociencia.* Delgado-García, J.M., Ferrús, A., Mora, F. & Rubia, F. (eds.), pp. 778-799 Síntesis, Madrid, (1998).

García-Bonacho M, Esquifino AI, Castrillón PO, Toso CR, Cardinali DP. Age-dependent effect of Freund's adjuvant on 24-hour rhythms in plasma prolactin, growth hormone, thyrotropin, insulin, follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone and testosterone in rats. *Life Sci.* 2000 Apr 7;66(20):1969-77.

Giuffrida FM, Sallum CF, Gabbay MA, Gomes MB, Pires AC, Dib SA. Relationship between glycosylated hemoglobin and metabolic syndrome of type 1 and type 2 diabetes: a factor analysis study. *Diabetes Care.* 2010 Jun;33(6)

Gnacinska M, Malgorzewicz S, Stojek M, Lysiak- Szydłowska W, Sworczak K. Role of adipokines in complications related to obesity: a review. *Adv Med Sci* 2009; 54:150–157.

Gu y cols, 2004

Guest CB, Park MJ, Johnson DR, Freund GG. The implication of proinflammatory cytokines in type 2 diabetes. *Front Biosci*; 2008; 13: 5187-5194.

Guilod-Maximin E, Roy AF, Vacher CM, Aubourg A, Bailleux V, Lorsignol A, Pénicaud L, Parquet M, Taouis M. Adiponectin receptors are expressed in hypothalamus and colocalized with proopiomelanocortin and neuropeptide Y in rodent arcuate neurons. *J Endocrinol*. 2009 Jan;200(1):93-105.

Haffen E. [Measuring circadian rhythm] *Encephale*. 2009 Jan;35 Suppl 2:S63-7.

Hajer GR, van Haeften TW, Visseren FL. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur Heart J*. 2008 Dec; 29(24):2959-71.

Hannibal J., Fahrenkrug J. – “Neuronal input pathways to the brain's biological clock and their functional significance” *Adv Anat Embryol Cell Biol* 2006; 182:1-71.

Harchaoui KE, Visser ME, Kastelein JJ, Stroes ES, Dallinga-Thie GM. Triglycerides and cardiovascular risk. *Curr Cardiol Rev*. 2009 Aug;5(3):216-22.

Hill JW, Elias CF, Fukuda M, Williams KW, Berglund ED, Holland WL, Cho YR, Chuang JC, Xu Y, Choi M, Lauzon D, Lee CE, Coppari R, Richardson JA, Zigman JM, Chua S, Scherer PE, Lowell BB, Brüning JC, Elmquist JK. Cell Metab. Direct insulin and leptin action on pro-opiomelanocortin neurons is required for normal glucose homeostasis and fertility. 2010 Apr 7;11(4):286-97.

Hill MJ, Metcalfe D, McTernan PG. Obesity and diabetes: lipids, 'nowhere to run. *Clin Sci (Lond)*. 2009 Jan;116(2):113-23.

Himmerich H, Schönknecht P, Heitmann S, Sheldrick AJ. Laboratory parameters and appetite regulators in patients with anorexia nervosa. *J Psychiatr Pract*. 2010 Mar;16(2):82-92.

Hough, L. B., Goldschmidt, R. C., Glick, S. D., and Padawer, J. Mast cells in rat brain: Characterization, localization, and histamine content. In C. R. Ganellin and J. C. Schwartz (eds.), *Frontiers in Histamine Research: A Tribute to Heinz Schild*. Advances in the Biosciences. New York: Pergamon Press, 1985, pp. 131–140.

Ibata Y, Iijima N, Kataoka Y, Kakihara K, Tanaka M, Hosoya M, Hinuma S. Morphological survey of prolactin-releasing peptide and its receptor with special reference to their functional roles in the brain. *Neurosci Res*. 2000 Nov;38(3):223-30.

Ix JH, Sharma K. Mechanisms linking obesity, chronic kidney disease, and fatty liver disease: the roles of fetuin-A, adiponectin, and AMPK. *J Am Soc Nephrol*. 2010 Mar;21(3):406-12.

Jiménez E., Aguilar M. *Nutrición y hormonas*, 2001, Ediciones Ergon, S.A. Capítulo 1 Páginas 1-35

Jiménez-Ortega V, Cano P, Cardinali DP, Esquifino AI. 24-Hour variation in gene expression of redox pathway enzymes in rat hypothalamus: effect of melatonin treatment. *Redox Rep.* 2009;14(3):132-8.

Jiménez-Ortega V, Cano P, Cardinali DP, Esquifino AI. 24-Hour variation in gene expression of redox pathway enzymes in rat hypothalamus: effect of melatonin treatment. *Redox Rep.* 2009;14(3):132-8.

Jockers R, Maurice P, Boutin JA, Delagrangé P. Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new? *Br J Pharmacol.* 2008 Jul;154(6):1182-95.

Jovanovic Z, Yeo GS. Central leptin signalling: Beyond the arcuate nucleus *Auton Neurosci.* 2010 Aug 25;156(1-2):8-14.

Kaasik K, Lee CC. Reciprocal regulation of haem biosynthesis and the circadian clock in mammals. *Nature.* 2004 Jul 22;430(6998):467-71.

Kaczynska K, Szereda-Przestaszewska M. NPY Y(1) receptors are involved in cardio-respiratory responses to intravenous injection of neuropeptide Y in anaesthetized rats. *Pharmacol Res.* 2010 Jun 17.

Kaczynska K, Szereda-Przestaszewska M. NPY Y(1) receptors are involved in cardio-respiratory responses to intravenous injection of neuropeptide Y in anaesthetized rats. *Pharmacol Res.* 2010 Jun 17.

Kadowaki T, Noda T. Insulin receptor substrate 2 plays a crucial role in beta cells and the hypothalamus. *J Clin Invest.* 2004 Oct;114(7):917-27

Kageyama H, Takenoya F, Shiba K, Shioda S. Neuronal circuits involving ghrelin in the hypothalamus-mediated regulation of feeding. *Neuropeptides.* 2010 Apr;44(2):133-8.

Kalpakcioglu B, Senel K. The role of melatonin in rheumatic diseases. *Infect Disord Drug Targets.* 2009 Aug;9(4):453-6.

Kalra P, Bagnasco M, Otukonyong EE, Dube MG, Kalra PS. Rhythmic, reciprocal ghrelin and leptin signaling: new insight in the development of obesity. *Regul Pept* 2003; 111 :1-11.

Kalra SP, Kalra PS. Neuroendocrine control of energy homeostasis: update on new insights. *Prog Brain Res.* 2010;181:17-33.

Kalra SP. Disruption in the leptin-NPY link underlies the pandemic of diabetes and metabolic syndrome: new therapeutic approaches. *Nutrition.* 2008 Sep;24(9):820-6.

Kaneko K, Yamada T, Tsukita S, Takahashi K, Ishigaki Y, Oka Y, Katagiri H. Obesity alters circadian expressions of molecular clock genes in the brainstem. *Brain Res.* 2009 Mar 31; 1263:58-68.

Kelly SP, Peter RE. Prolactin-releasing peptide, food intake, and hydromineral balance in goldfish. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006 Nov;291(5):R1474-81.

Khan R, Daya S, Potgieter B. Evidence for a modulation of the stress response by the pineal gland. *Experientia* 1990; 46: 860-862

Kido Y, Burks DJ, Withers D, Bruning JC, Kahn CR, White MF, Accili D. Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2. *J Clin Invest*. 2000 Jan;105(2):199-205.

Kim MS, Rossi M, Abusnana S, Sunter D, Morgan DG, Small CJ, Edwards CM, Heath MM, Stanley SA, Seal LJ, Bhatti JR, Smith DM, Ghatei MA, Bloom SR. Hypothalamic localization of the feeding effect of agouti-related peptide and alpha-melanocyte-stimulating hormone. *Diabetes*. 2000 Feb;49(2):177-82.

Ko CH., Takahashi JS. – “Molecular components of the mammalian circadian clock” *Hum Mol Genet* 2006; 15:R271-277.

Kohsaka A, Laposky AD, Ramsey KM, Estrada C, Joshu C, Kobayashi Y, Turek FW, Bass J. High-fat diet disrupts behavioral and molecular circadian rhythms in mice. *Cell Metab*. 2007 Nov;6(5):414-21.

Kopelman PG. Medical management of obesity. *Br J Hosp Med (Lond)*. 2007 Feb;68(2):89-93.

Korkmaz A, Topal T, Tan DX, Reiter RJ. Role of melatonin in metabolic regulation. *Rev Endocr Metab Disord*. 2009 Dec;10(4):261-70.

Korkmaz A, Topal T, Tan DX, Reiter RJ. Role of melatonin in metabolic regulation. *Rev Endocr Metab Disord*. 2009 Dec;10(4):261-70.

Kremers SP, de Bruijn GJ, Visscher TL, van Mechelen W, de Vries NK, Brug J. Environmental influences on energy balance-related behaviors: a dual-process view. *Int J Behav Nutr Phys Act*. 2006 May 15;3:9

Kremers SP, de Bruijn GJ, Visscher TL, van Mechelen W, de Vries NK, Brug J. Environmental influences on energy balance-related behaviors: a dual-process view. *Int J Behav Nutr Phys Act*. 2006 May 15;3:9

Kremers SP, de Bruijn GJ, Visscher TL, van Mechelen W, de Vries NK, Brug J. Environmental influences on energy balance-related behaviors: a dual-process view. *Int J Behav Nutr Phys Act*. 2006 May 15;3:9

Kubota N, Terauchi Y, Tobe K, Yano W, Suzuki R, Ueki K, Takamoto I, Satoh H, Maki T, Kubota T, Moroi M, Okada-Iwabuchi M, Ezaki O, Nagai R, Ueta Y,

Lafontan M. Advances in adipose tissue metabolism. *Int J Obes (Lond)*. 2008 Dec;32 Suppl 7:S39-51.

Lafuente A, González-Carracedo A, Romero A, Cabaleiro T, Esquifino AI. Toxic effects of cadmium on the regulatory mechanism of dopamine and serotonin on prolactin secretion in adult male rats. *Toxicol Lett.* 2005 Jan 15;155(1):87-96

Lahiri DK, Chen D, Lahiri P, Rogers JT, Greig NH, Bondy S. Melatonin, metals, and gene expression: implications in aging and neurodegenerative disorders. *Ann N Y Acad Sci.* 2004 Dec;1035:216-30.

Laposky AD, Bass J, Kohsaka A, Turek Sleep and circadian rhythms: key components in the regulation of energy metabolism. *FEBS Lett.* 2008 Jan 9;582(1):142-51.

Larrad A, Esquifino, Álvarez P, Cano, Jiménez Ortega. Bases fisiopatológicas de la regulación del peso y control del apetito (II). Regulación de la ingesta de alimentos y gasto energético. 2005 Número: 1 Rev. *Kirurgia*

Lawrence CB, Celsi F, Brennan J, Luckman SM. Alternative role for prolactin-releasing peptide in the regulation of food intake. *Nat Neurosci.* 2000 Jul;3(7):645-6.

Lawrence CB, Ellacott KL, Luckman SM. PRL-releasing peptide reduces food intake and may mediate satiety signaling. *Endocrinology.* 2002 Feb;143(2):360-7.

Leibowitz A, Peleg E, Sharabi Y, Shabtai Z, Shamiss A, Grossman E. The role of melatonin in the pathogenesis of hypertension in rats with metabolic syndrome. *Am J Hypertens.* 2008 Mar;21(3):348-51.

Leidy HJ, Gardner JK, Frye SR et al. Circulating ghrelin is sensitive to changes in body weight during a diet and exercise program in normalweight young women. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2659-2664.

Leininger GM, Jo YH, Leshan RL, Louis GW, Yang H, Barrera JG, Wilson H, Opland DM, Faouzi MA, Gong Y, Jones JC, Rhodes CJ, Chua S Jr, Diano S, Horvath TL, Seeley RJ, Becker JB, Münzberg H, Myers MG Jr. Leptin acts via leptin receptor-expressing lateral hypothalamic neurons to modulate the mesolimbic dopamine system and suppress feeding. *Cell Metab.* 2009 Aug;10(2):89-98.

Leshan RL, Björnholm M, Münzberg H, Myers MG Jr. Leptin receptor signaling and action in the central nervous system. *Obesity (Silver Spring).* 2006 Aug;14 Suppl 5:208S-212S.

Liu AC, Welsh DK, Ko CH, Tran HG, Zhang EE, Priest AA, Buhr ED, Singer O, Meeker K, Verma IM, Doyle FJ 3rd, Takahashi JS, Kay SA. Intercellular coupling confers robustness against mutations in the SCN circadian clock network. *Cell.* 2007 May 4;129(3):605-16.

Liu M, Liu F. Transcriptional and post-translational regulation of adiponectin. *Biochem J.* 2009 Dec 14;425(1):41-52.

Lopaschuk GD, Ussher JR, Jaswal JS. Targeting intermediary metabolism in the hypothalamus as a mechanism to regulate appetite. *Pharmacol Rev.* 2010 Jun;62(2):237-64.

Lopaschuk GD, Ussher JR, Jaswal JS. Targeting intermediary metabolism in the hypothalamus as a mechanism to regulate appetite. *Pharmacol Rev.* 2010 Jun;62(2):237-64.

Maestroni GJ, Conti A, Pierpaoli W. Role of the pineal gland in immunity. Circadian synthesis and release of melatonin modulates the antibody response and antagonizes the immunosuppressive effect of corticosterone. *J. Neuroimmunol* 1988; 13: 19-30

Magkos F, Wang X, Mittendorfer B. Metabolic actions of insulin in men and women. *Nutrition.* 2010 Jul-Aug;26(7-8):686-93.

Malendowicz LK, Rucinski M, Belloni AS, Ziolkowska A, Nussdorfer GG. Leptin and the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Int Rev Cytol.* 2007;263:63-102.

Maljaars J, Peters HP, Masclee AM Review article: The gastrointestinal tract: neuroendocrine regulation of satiety and food intake. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007 Dec;26 Suppl 2:241-50.

Maljaars J, Peters HP, Masclee AM Review article: The gastrointestinal tract: neuroendocrine regulation of satiety and food intake. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007 Dec;26 Suppl 2:241-50.

Mammès O, Aubert R, Betoulle D, Péan F, Herbeth B, Visvikis S, Siest G, Fumeron F. LEPR gene polymorphisms: associations with overweight, fat mass and response to diet in women. *Eur J Clin Invest.* 2001 May;31(5):398-404.

Martí y cols, 1999-a

Martínez-Soriano F, Ruiz-Torner A, Armañanzas E, Valverde-Navarro AA. Influence of light/dark, seasonal and lunar cycles on serum melatonin levels and synaptic bodies number of the pineal gland of the rat. *Histol Histopathol.* 2002 Jan;17(1):213-22.

MATERLAB, Guía para el uso de un analizador bioquímico multicanal laboratorio para la determinación de análisis plasmáticos, Madrid, España 2010.

Matsumoto H, Maruyama M, Noguchi J, Horikoshi Y, Fujiwara K, Kitada C, Hinuma S, Onda H, Nishimura O, Inoue K, Fujino M. Stimulation of corticotropin-releasing hormone-mediated adrenocorticotropin secretion by

central administration of prolactin-releasing peptide in rats. *Neurosci Lett.* 2000 May 19;285(3):234-8

Matsuzawa Y. Adiponectin: a key player in obesity related disorders. *Curr Pharm Des.* 2010 Jun;16(17):1896-901.

McNaughton SA, Mishra GD, Brunner EJ. Food patterns associated with blood lipids are predictive of coronary heart disease: the Whitehall II study. *Br J Nutr.* 2009 Aug;102(4):619-24.

Migaud H, Davie A, Taylor JF. Current knowledge on the photoneuroendocrine regulation of reproduction in temperate fish species. *J Fish Biol.* 2010 Jan;76(1):27-68.

Mor M, Rvara S, Pala D, Bedini A, Spadoni G, Tarzia G. Recent advances in the development of melatonin MT(1) and MT(2) receptor agonists. *Expert Opin Ther Pat.* 2010 Aug;20(8):1059-77.

Mountjoy KG. Functions for pro-opiomelanocortin-derived peptides in obesity and diabetes. *Biochem J.* 2010 May 27; 428(3):305-24. Review.

Mühlbauer E, Gross E, Labucay K, Wolgast S, Peschke E. Loss of melatonin signalling and its impact on circadian rhythms in mouse organs regulating blood glucose. *Eur J Pharmacol.* 2009 Mar 15;606(1-3):61-71.

Mühlbauer E, Gross E, Labucay K, Wolgast S, Peschke E. Loss of melatonin signalling and its impact on circadian rhythms in mouse organs regulating blood glucose. *Eur J Pharmacol.* 2009 Mar 15;606(1-3):61-71.

Mulder H, Nagorny CL, Lyssenko V, Groop L. Melatonin receptors in pancreatic islets: good morning to a novel type 2 diabetes gene. *Diabetologia* 2009; 52:1240–1249.

Myers MG Jr, Münzberg H, Leininger GM, Leshan RL. The geometry of leptin action in the brain: more complicated than a simple ARC. *Cell Metab.* 2009 Feb;9(2):117-23.

Naderali EK, Estadella D, Rocha M et al. A fat-enriched, glucose-enriched diet markedly attenuates adiponectin mRNA levels in rat epididymal adipose tissue. *Clin Sci (Lond)* 2003; 105:403–408.

Nakagawa H, Okumura N. Coordinated regulation of circadian rhythms and homeostasis by the suprachiasmatic nucleus. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2010;86(4):391-409.

Näslund E, Hellström PM. Appetite signaling: from gut peptides and enteric nerves to brain. *Physiol Behav.* 2007 Sep 10;92(1-2):256-62.

Naveilhan P, Svensson L, Nyström S, Ekstrand AJ, Ernfors P. Attenuation of hypercholesterolemia and hyperglycemia in ob/ob mice by NPY Y2 receptor ablation. *Peptides*. 2002 Jun;23(6):1087-91.

Neary MT, Batterham RL. Gut hormones: Implications for the treatment of obesity. *Pharmacol Ther*. 2009 Jun 26. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2008 Feb;18(2):158-68.

NIH Institute Of Laboratory Animal Resources COLSNRC; Guide for the care and use of laboratory animals. Washington, D.C., National Academy Press, 1996.

OMS 2009

Onaka T, Takayanagi Y, Leng G. Metabolic and stress-related roles of prolactin-releasing peptide. *Trends Endocrinol Metab*. 2010 May;21(5):287-93.

Palou y cols, 2009

Park JS, Choi GS, Jang YS, Jun SH, Kang H. Influence of Obesity on the Serum Carcinoembryonic Antigen Value in Patients with Colorectal Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010 Aug 20.

Pazo D. Estudio cronobiológico del papel de la inervación simpática en la modulación de la respuesta inmunológica de los ganglios linfáticos submaxilares : efecto de la melatonina. Directora Ana Isabel Esquifino Parras. 2002.

Perelló M, Spinedi E. Neuroendocrine aspects of obesity] *Medicina (B Aires)*. 2004;64(3):257-64.

Peschke E. Melatonin, endocrine pancreas and diabetes. *J Pineal Res*. 2008 Jan; 44(1):26-40. Review.PMID: 18078445

Phillips LK, Prins JB. The link between abdominal obesity and the metabolic syndrome. *Curr Hypertens Rep*. 2008 Apr;10(2):156-64.

Plum L, Belgardt BF, Brüning JC. Central insulin action in energy and glucose homeostasis. *J Clin Invest*. 2006 Jul;116(7):1761-6.

Poliandri AH, Esquifino AI, Cano P, Jiménez V, Lafuente A, Cardinali DP, Duvilanski BH. In vivo protective effect of melatonin on cadmium-induced changes in redox balance and gene expression in rat hypothalamus and anterior pituitary. *J Pineal Res*. 2006 Oct;41(3):238-46.

Porte D Jr, Baskin DG, Schwartz MW. Insulin signaling in the central nervous system: a critical role in metabolic homeostasis and disease from *C. elegans* to humans. *Diabetes*. 2005 May;54(5):1264-76.

Prunet-Marcassus B, Desbazeille M, Bros A, Louche K, Delagrangé P, Renard P, Casteilla L, Pénicaud L. Melatonin reduces body weight gain in Sprague Dawley rats with diet-induced obesity. *Endocrinology*. 2003 Dec;144(12):5347-52.

Puchalski SS, Green JN, Rasmussen DD. Melatonin effect on rat body weight regulation in response to high-fat diet at middle age. *Endocrine*. 2003 Jul;21(2):163-7.

Radogna F, Diederich M, Ghibelli L. Melatonin: A pleiotropic molecule regulating inflammation. *Biochem Pharmacol*. 2010 Aug 7.

Radogna F, Nuccitelli S, Mengoni F, Ghibelli L. Neuroprotection by melatonin on astrocytoma cell death. *Ann N Y Acad Sci*. 2009 Aug;1171:509-13.

Ramracheya RD, Muller DS, Squires PE, Brereton H, Sugden D, Huang GC, Amiel SA, Jones PM, Persaud SJ. Function and expression of melatonin receptors on human pancreatic islets. *J Pineal Res*. 2008

Ramsey KM, Marcheva B, Kohsaka KA, Bass J. The clockwork of metabolism. *Annu Rev Nutr* 2007;27:219-240.

Rasmussen DD, Mitton DR, Larsen SA, Yellon SM. Aging-dependent changes in the effect of daily melatonin supplementation on rat metabolic and behavioral responses. *J Pineal Res*. 2001 Aug;31(1):89-94

Rasmussen DD, Mitton DR, Larsen SA, Yellon SM. Aging-dependent changes in the effect of daily melatonin supplementation on rat metabolic and behavioral responses. *J Pineal Res*. 2001 Aug;31(1):89-94

Reid KJ, Zee PC. Circadian rhythm disorders. *Semin Neurol*. 2009 Sep;29(4):393-405.

Reiter RJ, Paredes SD, Manchester LC, Tan DX. Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2009 Jul-Aug;44(4):175-200.

Reiter RJ, Tan DX, Fuentes-Broto L. Melatonin: a multitasking molecule. *Prog Brain Res*. 2010;181:127-51.

Reiter RJ, Tan DX, Fuentes-Broto L. Melatonin: a multitasking molecule. *Prog Brain Res*. 2010;181:127-51. Review

Reppert SM, Weaver DR, Cassone VM, Godson C, Kolakowski LF Jr. Melatonin receptors are for the birds: molecular analysis of two receptor subtypes differentially expressed in chick brain. *Neuron*. 1995 Nov;15(5):1003-15

Revel FG, Masson-Pévet M, Pévet P, Mikkelsen JD, Simonneaux V. Melatonin controls seasonal breeding by a network of hypothalamic targets. *Neuroendocrinology*. 2009;90(1):1-14.

Riley LG Jr, Walker AP, Dorrough CP, Schwandt SE, Grau EG. Glucose regulates ghrelin, neuropeptide Y, and the GH/IGF-I axis in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2009 Dec;154(4):541-6.

Ring LE, Zeltser LM. Disruption of hypothalamic leptin signaling in mice leads to early-onset obesity, but physiological adaptations in mature animals stabilize adiposity levels. *J Clin Invest*. 2010 Aug 2;120(8):2931-41.

Ríos-Lugo MJ, Cano P, Jiménez-Ortega V, Fernández-Mateos MP, Scacchi PA, Cardinali DP, Esquifino AI. Melatonin effect on plasma adiponectin, leptin, insulin, glucose, triglycerides and cholesterol in normal and high fat-fed rats. *J Pineal Res*. 2010 Jul 19.

Rodríguez MI, Escames G, López LC, López A, García JA, Ortiz F, Acuña-Castroviejo D. Chronic melatonin treatment reduces the age-dependent inflammatory process in senescence-accelerated mice. *J Pineal Res*. 2007 Apr;42(3):272-9.

Rolls BJ The relationship between dietary energy density and energy intake. *Physiol Behav*. 2009 Jul 14;97(5):609-15.

Rolls BJ The relationship between dietary energy density and energy intake. *Physiol Behav*. 2009 Jul 14;97(5):609-15.

Salihi HM, Bonnema SM, Alio AP. Obesity: What is an elderly population growing into? *Maturitas*. 2009 May 20;63(1):7-12.

Salinas DG, De La Fuente M, Reyes JG. Changes of enzyme activity in lipid signaling pathways related to substrate reordering. *Biophys J*. 2005

Salinas DG, De La Fuente M, Reyes JG. Changes of enzyme activity in lipid signaling pathways related to substrate reordering. *Biophys J*. 2005 Aug;89(2):885-94.

Samson WK, Resch ZT, Murphy TC. A novel action of the newly described prolactin-releasing peptides: cardiovascular regulation. *Brain Res*. 2000 Mar 6;858(1):19-25.

Samson WK, Resch ZT, Murphy TC. A novel action of the newly described prolactin-releasing peptides: cardiovascular regulation. *Brain Res*. 2000 Mar 6;858(1):19-25.

Sanchez-Hidalgo M, Lu Z, Tan DX, Maldonado MD, Reiter RJ, Gregerman RI. Melatonin inhibits fatty acid-induced triglyceride accumulation in ROS17/2.8 cells: implications for osteoblast differentiation and osteoporosis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007 Jun;292(6):R2208-15.

Sánchez-Lasheras C, Köhner AC, Brüning JC. Integrative neurobiology of energy homeostasis-neurocircuits, signals and mediators. *Front Neuroendocrinol.* 2010 Jan;31(1):4-15.

Sanchez-Mateos S, Alonso-Gonzalez C, Gonzalez A, Martinez-Campa CM, Mediavilla MD, Cos S, Sanchez-Barcelo EJ. Melatonin and estradiol effects on food intake, body weight, and leptin in ovariectomized rats. *Maturitas.* 2007 Sep 20;58(1):91-101.

Sartori C, Dessen P, Mathieu C, Monney A, Bloch J, Nicod P, Scherrer U, Duplain H. Melatonin improves glucose homeostasis and endothelial vascular function in high-fat diet-fed insulin-resistant mice. *Endocrinology.* 2009;150(12):5311-7.

Sastard JP, Maachi M, Lagathu C et al. Recent advances In the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Gylokine Netw* 2006;17:4-12.

Sastard JP, Maachi M, Lagathu C et al. Recent advances In the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Gylokine Netw* 2006;17:4-12.

Sato N, Kageyama S, Chen R, Suzuki M, Mori H, Tanioka F, Yamada H, Kamo T, Tao H, Shinmura K, Nozawa A, Sugimura H. Association between neuropeptide Y receptor 2 polymorphism and the smoking behavior of elderly Japanese. *J Hum Genet.* 2010 Sep 2.

Schade R, Rex H, Kästner D, Friedrich A, Sprang C. Biorhythms of four serum proteins of the laboratory rat: IgG transferrin alpha 2-acute phase protein and a VLD lipoprotein. *Acta Biol Med Ger.* 1980;39(11-12):1183-8.

Scheving LE, Pauly JE, Tsai TH. Circadian fluctuation in plasma proteins of the rat. *Am J Physiol.* 1968 Nov;215(5):1096-101.

Schibler U. The daily timing of gene expression and physiology in mammals. *Dialogues Clin Neurosci.* 2007;9(3):257-72.

Schulz P, Steimer T., Neurobiology of circadian systems. *CNS Drugs.* 2009;23 Suppl 2:3-13.

Schwartz MW and Morton GJ. Keeping hunger at bay. *Nature* 2002;418

Schwartz GJ. Brainstem integrative function in the central nervous system control of food intake. *Forum Nutr.* 2010; 63:141-51.

Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature.* 2000 Apr 6;404(6778):661-71.

Seal LJ, Small CJ, Kim MS, Stanley SA, Taheri S, Ghatei MA, Bloom SR. Prolactin releasing peptide (PrRP) stimulates luteinizing hormone (LH) and

follicle stimulating hormone (FSH) via a hypothalamic mechanism in male rats. *Endocrinology*. 2000 May;141(5):1909-12.

Sephton S, Spiegel D Circadian disruption in cancer: a neuroendocrine-immune pathway from stress to disease? *Brain Behav Immun*. 2003 Oct;17(5):321-8.

Soulban G, Labrecque G. Circadian rhythms of blood clotting time and coagulation factors II, VII, IX and X in rats. *Life Sci*. 1989;45(25):2485-9.

Stylianou C, Galli-Tsinopoulou A, Farmakiotis Det al. Ghrelin and leptin levels in obese adolescents. Relationship with body fat and insulin resistance. *Hormones (Athens)* 2007;6:295-303.

Sukumaran S, Xue B, Jusko WJ, Dubois DC, Almon RR. Circadian variations in gene expression in rat abdominal adipose tissue and relationship and to physiology. *Physiol Genomics*. 2010 Aug 3

Sumarac-Dumanovic M, Jeremic D.[Adipokines and lipids] *Med Pregl*. 2009;62 Suppl 3:47-53.

Suzuki Y, Kurose Y, Takahashi H, Asakuma S, Azuma Y, Kobayashi S. The differences in feeding-inhibitory responses to peripheral and central leptin between non-lactating and lactating rats. *J Endocrinol*. 2010 Jul 30.

Takamoto I, Terauchi Y, Kubota N, Ohsugi M, Ueki K, Kadowaki T. Crucial role of insulin receptor substrate-2 in compensatory beta-cell hyperplasia in response to high fat diet-induced insulin resistance. *Diabetes Obes Metab*. 2008 Nov;10 Suppl 4:147-56.

Takayanagi Y, Matsumoto H, Nakata M, Mera T, Fukusumi S, Hinuma S, Ueta Y, Yada T, Leng G, Onaka T. Endogenous prolactin-releasing peptide regulates food intake in rodents. *J Clin Invest*. 2008 Dec;118(12):4014-24.

Tamura H, Nakamura Y, Narimatsu A, Yamagata Y, Takasaki A, Reiter RJ, Sugino N. Melatonin treatment in peri- and postmenopausal women elevates serum high-density lipoprotein cholesterol levels without influencing total cholesterol levels. *J Pineal Res*. 2008 Aug;45(1):101-5.

Tartaglia LA. The leptin receptor. *J Biol Chem*. 1997 Mar 7;272(10):6093-6

Thirone AC, Huang C, Klip A. Tissue-specific roles of IRS proteins in insulin signaling and glucose transport. *Trends Endocrinol Metab*. 2006 Mar;17(2):72-

Tsutsui K, Bentley GE, Bedecarrats G, Osugi T, Ubuka T, Kriegsfeld LJ. Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) and its control of central and peripheral reproductive function. *Front Neuroendocrinol*. 2010 Jul;31(3):284-95.

Tsutsui K. A new key neurohormone controlling reproduction, gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH): Biosynthesis, mode of action and functional significance. *Prog Neurobiol*. 2009 May;88(1):76-88.

Tudurí E, Marroquí L, Soriano S, Ropero AB, Batista TM, Piquer S, López-Boado MA, Carneiro EM, Gomis R, Nadal A, Quesada I. Inhibitory effects of leptin on pancreatic alpha-cell function. *Diabetes*. 2009 Jul; 58(7):1616-24.

Turek FW, Joshu C, Kohsaka A, Lin E, Ivanova G, McDearmon E, Laposky A, Losee-Olson S, Easton A, Jensen DR, Eckel RH, Takahashi JS, Bass J. Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science*. 2005 May 13;308(5724):1043-5.

Valassi E, Scacchi M, Cavagnini F. Neuroendocrine control of food intake. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2008 Feb;18(2):158-68.

Van der Steen WJ, Ho VK. Diets and circadian rhythms: challenges from biology for medicine. *Acta Biotheor*. 2006;54(4):267-75.

Vandewalle G, Maquet P, Dijk DJ. Light as a modulator of cognitive brain function. *Trends Cogn Sci*. 2009 Oct;13(10):429-38.

Verwey M, Amir S. Food-entrainable circadian oscillators in the brain. *Eur J Neurosci*. 2009 Nov;30(9):1650-7.

Villanua MA, Agrasal C, Tresguerres JA, Vaughan MK, Esquifino AI. Melatonin effects on prolactin secretion in pituitary-grafted male rats. *J Pineal Res*. 1989;6(1):33-41.

Waki H, Tontonoz P. Endocrine functions of adipose tissue, *Annu Rev Pathol* 2007;2:31-56.

Wang CH, Wang CC, Wei YH. Mitochondrial dysfunction in insulin insensitivity: implication of mitochondrial role in type 2 diabetes. *Ann N Y Acad Sci*. 2010 Jul;1201:157-65.

Wauters M, Mertens I, Chagnon M, Rankinen T, Considine RV, Chagnon YC, Van Gaal LF, Bouchard C. Polymorphisms in the leptin receptor gene, body composition and fat distribution in overweight and obese women. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2001 May;25(5):714-20.

Webb IC, Baltazar RM, Lehman MN, Coolen LM. Bidirectional interactions between the circadian and reward systems: is restricted food access a unique zeitgeber? *Eur J Neurosci*. 2009 Nov;30(9):1739-48.

White MF. Regulating insulin signaling and beta-cell function through IRS proteins. *Can J Physiol Pharmacol*. 2006 Jul;84(7):725-37.

Williams DL, Kaplan JM, Grill HJ. The role of the dorsal vagal complex and the vagus nerve in feeding effects of melanocortin-3/4 receptor stimulation. *Endocrinology*. 2000 Apr;141(4):1332-7

Wilson CR, Tran MK, Salazar KL, Young ME, Taegtmeyer H. Western diet, but not high fat diet, causes derangements of fatty acid metabolism and contractile dysfunction in the heart of Wistar rats. *Biochem J.* 2007 Sep 15;406(3):457-67

Wilson CR, Tran MK, Salazar KL, Young ME, Taegtmeyer H. Western diet, but not high fat diet, causes derangements of fatty acid metabolism and contractile dysfunction in the heart of Wistar rats. *Biochem J.* 2007 Sep 15;406(3):457-67

Wolden-Hanson T, Mitton DR, McCants RL, Yellon SM, Wilkinson CW, Matsumoto AM, Rasmussen DD. Daily melatonin administration to middle-aged male rats suppresses body weight, intraabdominal adiposity, and plasma leptin and insulin independent of food intake and total body fat. *Endocrinology.* 2000 Feb;141(2):487-97

Xie H, Sun L, Lodish HF. Targeting microRNAs in obesity. 2009 Aug 4. PMID: 19650761

Xu J, Lee WN, Phan J, Saad MF, Reue K, Kurland IJ. Lipin deficiency impairs diurnal metabolic fuel switching. *Diabetes.* 2006 Dec;55(12):3429-38.

Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. 2003; *Nature* 423 762–779.[

Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M et al. 2003 Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423 762–779.[CrossRef][Medline]

Yamauchi T, Nio Y, Maki T, Kobayashi M, Takazawa T, Iwabu M, Okada-Iwabu M, Kawamoto S, Kubota N, Kubota T et al. 2007 Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nature Medicine* 13 332–339.

Yan G, Chen G, Lü J, Fu ZQ. Synchronization performance of complex oscillator networks. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys.* 2009 Nov;80(5 Pt 2):056116.

Yiannakouris N, Yannakoulia M, Melistas L, Chan JL, Klimis-Zacas D, Mantzoros CS The Q223R polymorphism of the leptin receptor gene is significantly associated with obesity and predicts a small percentage of body weight and body composition variability. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Sep;86(9):4434-9.

Yoshimura T. Neuroendocrine mechanism of seasonal reproduction in birds and mammals. *Anim Sci J.* 2010 Aug 1;81(4):403-10.

Young JB. Diabetes, obesity, and heart failure: the new pandemic. *Methodist Debaque Cardiovasc J.* 2010 Apr-Jun; 6(2):20-6.

Zhang J, Sun TQ. IRS-2 and its involvement in diabetes and aging. *Vitam Horm.* 2009;80:389-407.

Zhang X, Lam KS, Ye H, Chung SK, Zhou M, Wang Y, Xu A. Adipose tissue-specific inhibition of hypoxia inducible factor 1{alpha} induces obesity and glucose intolerance by impeding energy expenditure in mice. *J Biol Chem.* 2010 Aug 16.

Zheng H, Shin AC, Lenard NR, Townsend RL, Patterson LM, Sigalet DL, Berthoud HR. Meal patterns, satiety, and food choice in a rat model of Roux-en-Y gastric bypass surgery. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009 Nov;297(5):R1273-82.

Zheng H, Shin AC, Lenard NR, Townsend RL, Patterson LM, Sigalet DL, Berthoud HR. Meal patterns, satiety, and food choice in a rat model of Roux-en-Y gastric bypass surgery. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009 Nov;297(5):R1273-82.

Zieba DA, Szczesna M, Klocek-Gorka B, Molik E, Misztal T, Williams GL, Romanowicz K, Stepień E, Keisler DH, Murawski M. Seasonal effects of central leptin infusion on secretion of melatonin and prolactin and on SOCS-3 gene expression in ewes. *J Endocrinol.* 2008 Jul;198(1):147-55.

Zucker TF. Fatty, a new mutation in the rat. *J. Hered.* 1961; 52: 275-278.