

CAPÍTULO 5

EFECTO DE LA PRESENCIA DE FUSIONES ROBERTSONIANAS EN EL RITMO DE ACTIVIDAD MOTORA DE *Mus domesticus*

5.1. INTRODUCCIÓN

En una periodicidad natural de luz y temperatura de 24 horas, el sistema circadiano de un animal presenta un ritmo con el mismo periodo que el entorno. En esta situación se dice que el ritmo está encarrilado por el entorno ambiental. Los elementos externos que utiliza un organismo como referencias temporales para poder ajustar sus ritmos reciben el nombre de “Zeitgeber”. El Zeitgeber más conocido es la alternancia luz-oscuridad. Consiguiendo un encarrilamiento con el Zeitgeber, un animal puede dividir sus actividades siguiendo algún tipo de orden temporal. Así, los ritmos biológicos presentan un valor adaptativo que reside en la organización temporal con la finalidad de aprovechar al máximo los recursos del ambiente.

Un organismo que se encuentra en curso libre, es decir bajo condiciones ambientales constantes, muestra el periodo del ritmo endógeno (τ). Puesto que la duración de los ciclos circadianos en curso libre no es siempre de 24 horas, se refiere a ellos como días subjetivos, es decir, se dividen en 24 horas subjetivas u horas circadianas, siendo una hora circadiana $\tau/24$. La existencia de ritmos endógenos indica la presencia de un reloj endógeno interno o marcapasos (*pacemaker*) que controla la periodicidad de ciertas variables. En los mamíferos está situado en el núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo (Van Esseveldt *et al.*, 2000; Moore & Leak, 2001), que es el principal coordinador de la organización circadiana interna (Ralph *et al.*, 1990; Reppert & Weaver, 2002), y se sincroniza con los ciclos día-noche por información neuronal directa procedente de fotorreceptores especializados de la retina (Berson, 2003). El ritmo endógeno es una característica propia de cada especie que se encuentra determinada genéticamente y se transmite de forma mendeliana. Como sistemas biológicos internos, los relojes circadianos aparecen a partir de la expresión de genes y de la actividad de éstos y sus productos. La expresión génica tiene un papel más importante que el de suministrar simplemente los componentes para el reloj molecular o facilitar las respuestas de los estímulos entrantes. El reloj circadiano está constituido por las actividades reguladas en el tiempo de un conjunto específico de genes. La estructura molecular del reloj circadiano en los mamíferos está postulada como un circuito cerrado de feedback negativo basado en transcripción-traducción (figura 5.1). Los dos componentes

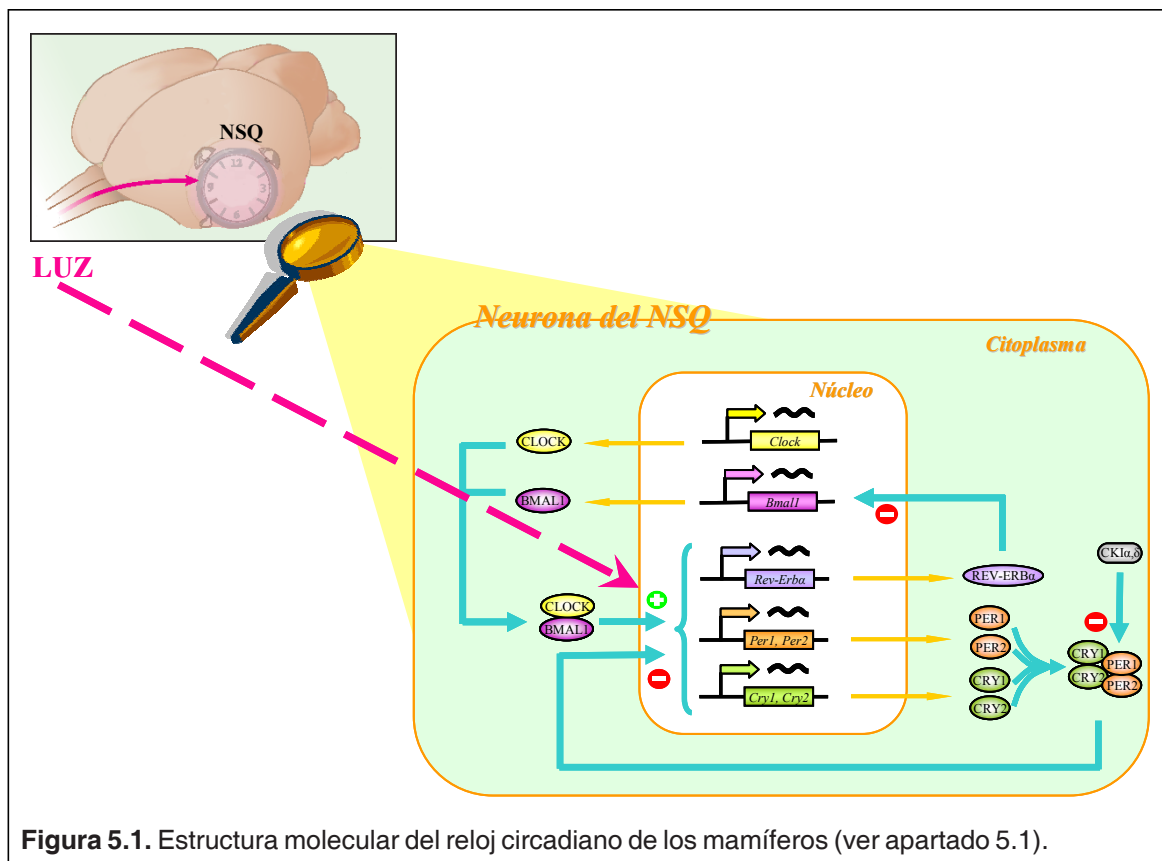


Figura 5.1. Estructura molecular del reloj circadiano de los mamíferos (ver apartado 5.1).

positivos de este circuito son los genes *Clock* y *Bmal1*, el primero ubicado aproximadamente en la mitad del cromosoma 5 (43cM) y el segundo en el cromosoma 7 (52cM). Estos genes codifican para las proteínas CLOCK y BMAL1 respectivamente, que dimerizan uniéndose a secuencias reguladoras de ADN y activan la transcripción de los genes *period* (*per*) y *cryptochrome* (*cry*), que forman la parte negativa de este circuito. Los genes *per* corresponden a dos genes localizados en diferentes cromosomas: *Per1*, ubicado en el cromosoma 11 (citobanda B), *Per2*, en el cromosoma 1 (citobanda C5), y codifican para las proteínas PER1 y PER2, respectivamente (Albrecht *et al.*, 1997; Shearman *et al.*, 1997; Sun *et al.*, 1997; Tei *et al.*, 1997). La luz actúa a nivel de estos genes estimulando la producción de ARNm *per*, y sincronizando así el reloj con el medio exterior. Los genes *cry*, *Cry1* y *Cry2*, están ubicados en los cromosomas 10 (46cM) y 2 (citobanda E), y codifican para las proteínas CRY1 y CRY2, respectivamente (Griffin *et al.*, 1999). Las proteínas PER y CRY se trasladan al citoplasma donde forman complejos heteropoliméricos de estequiometría desconocida. Estos entran en el núcleo de la célula y, una vez han alcanzado una concentración crítica, interactúan con el heterodímero CLOCK-BMAL1 inhibiendo la transcripción de sus propios genes,

previamente activada por este dímero. Como consecuencia disminuye la concentración de los ARNm de *cry* y *per* y de las proteínas para las cuales codifican. Cuando los niveles en el núcleo de los complejos CRY-PER son insuficientes para la autorepresión, empieza un nuevo ciclo de transcripción *per* y *cry* (King & Takahashi, 2000; Honma *et al.*, 2002; Reppert & Weaver, 2002; Albrecht & Eichele, 2003). Todo este ciclo representa un ciclo circadiano del reloj y el tiempo completo de este circuito de feedback es de aproximadamente 24 horas. Además de estos seis genes, que constituyen el centro del oscilador circadiano de los mamíferos, existen componentes adicionales que contribuyen a la robustez de este circuito. Por ejemplo, el receptor huérfano nuclear REV-ERB α interconecta la transcripción circadiana de la parte positiva y negativa del ciclo. La transcripción del gen *Rev-Erb α* , ubicado en el cromosoma 11, está regulada por los mismos componentes que controlan la transcripción de *Per* y *Cry*, y la acumulación circadiana resultante de REV-ERB α conduce a la represión de la transcripción de *Bmal1* y *Clock* (Preitner *et al.*, 2002). Los mecanismos post-transcripcionales como la fosforilación de proteínas, también juegan un papel importante en la generación de oscilaciones de aproximadamente 24 horas. Por ejemplo, la proteína caseína quinasa 1 ϵ (CK1 ϵ ; cromosoma 15; citobanda E1), y su paróloga la caseína quinasa 1 δ (CK1 δ), ambas citoplasmáticas, fosforilan las proteínas PER (Price *et al.*, 1998; Eide & Virshup, 2001; Lee *et al.*, 2001; Eide *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2004). Las proteínas PER fosforiladas son degradadas por los proteosomas. Se ha mostrado que las proteínas PER hipofosforiladas tienen una estabilidad metabólica mayor que sus homólogas hiperfosforiladas, incrementando por tanto su acumulación. La proteína CRY contrarresta esta degradación, uniéndose a PER en el citoplasma.

Existen varios organismos que alteran los ritmos biológicos debido a mutaciones en alguno de los genes que intervienen en el reloj circadiano. Por ejemplo, en el ratón doméstico se ha detectado una mutación, denominada *Clock*, que afecta el comportamiento circadiano del animal alargando el periodo del ritmo (Vitaterna *et al.*, 1994, King *et al.*, 1997). Existen numerosos trabajos sobre ritmos circadianos en ratón de laboratorio, la mayoría centrados en detallar y caracterizar los genes que intervienen en el control del ritmo (King *et al.*, 1997; Zylka *et al.*, 1998; Vitaterna *et al.*, 1999; Shimomura *et al.*, 2001). En otros trabajos se estudian ritmos de actividad motora en diferentes condiciones de iluminación ya sea en una misma

cepa de animales (Pittendrigh & Daan, 1976; Suzuki *et al.*, 2001; Refinetti, 2003), comparando cepas (Abe *et al.*, 1989) o bien en híbridos entre diferentes cepas (Schwartz & Zimmerman, 1990). Por el contrario, no se ha encontrado ningún estudio sobre los patrones de la actividad motora en ratones portadores de traslocaciones Robertsonianas. A pesar de que estas mutaciones no comportan aparentemente grandes cambios sobre la información genética, algunas translocaciones pueden producir modificaciones del comportamiento (Van Oortmensen, 1971; Krushinskii *et al.*, 1978, 1986; Lasalle *et al.*, 1979; Capanna *et al.*, 1984; Schröder & Otten, 1985; Mainardi *et al.*, 1986; Dyban & Baranov, 1987). Esto se debe a que cambios en el patrón espacial de los cromosomas en el núcleo interfásico pueden inducir modificaciones en las funciones del genoma (White, 1975), así como en la frecuencia de recombinación durante la meiosis (Cattanach, 1978; Davisson & Akeson, 1993; Bidau *et al.*, 2001).

En los últimos años se han publicado numerosos trabajos sobre translocaciones Robertsonianas en el ratón doméstico, que abordan aspectos morfológicos (Corti & Rohlf, 2001), parasitológicos (Ressouche *et al.*, 1998), genéticos (Dumas & Britton-Davidian, 2002) o biológicos (Hauffe & Searle, 1998). No obstante se ha prestado poca atención a sus efectos sobre el comportamiento. Este último es un parámetro importante que se debe tener en cuenta en poblaciones Robertsonianas puesto que una diferenciación etológica entre poblaciones de la misma especie puede constituir un paso importante hacia la especiación, particularmente si éstas son capaces de reconocerse entre ellas como diferentes. En los animales, el registro del comportamiento se utiliza como marcador de discriminación, permitiendo que diferentes poblaciones de una especie se reproduzcan selectivamente cuando entran en contacto (Lenington, 1983; Hare, 1992).

La evidencia experimental de las consecuencias de las translocaciones Robertsonianas en el comportamiento, sobre todo en poblaciones naturales de ratón doméstico, es escasa (Capanna *et al.*, 1984; Dyban & Baranov, 1987; Corti *et al.*, 1989). Capanna *et al.* (1985) observaron incompatibilidad en la conducta de apareamiento en dos razas cromosómicas que convivían en simpatria sin evidencia de la presencia de híbridos naturales (Capanna & Corti, 1982). Ganem & Searle (1996a) detectaron diferencias en el comportamiento entre

tres poblaciones (una estándar y dos Robertsonianas de $2n=32$ y $2n=36$) próximas a la zona híbrida del norte de Escocia, revelando la existencia de tolerancia diferencial entre los individuos de estas poblaciones. Algunos estudios han utilizado ratones Robertsonianos procedentes de poblaciones salvajes hibridados con ratones de laboratorio (Schröder & Otten, 1985; Dyban & Baranov, 1987; Leitingner *et al.*, 1994), pero puesto que estos últimos tienen un componente genético artificial, estas investigaciones tienen poca relevancia en los problemas evolutivos. En estos trabajos se ha analizado la agresividad, el aprendizaje y el comportamiento exploratorio, pero en ninguno de ellos se ha relacionado la presencia de fusiones Robertsonianas con los patrones de actividad motora.

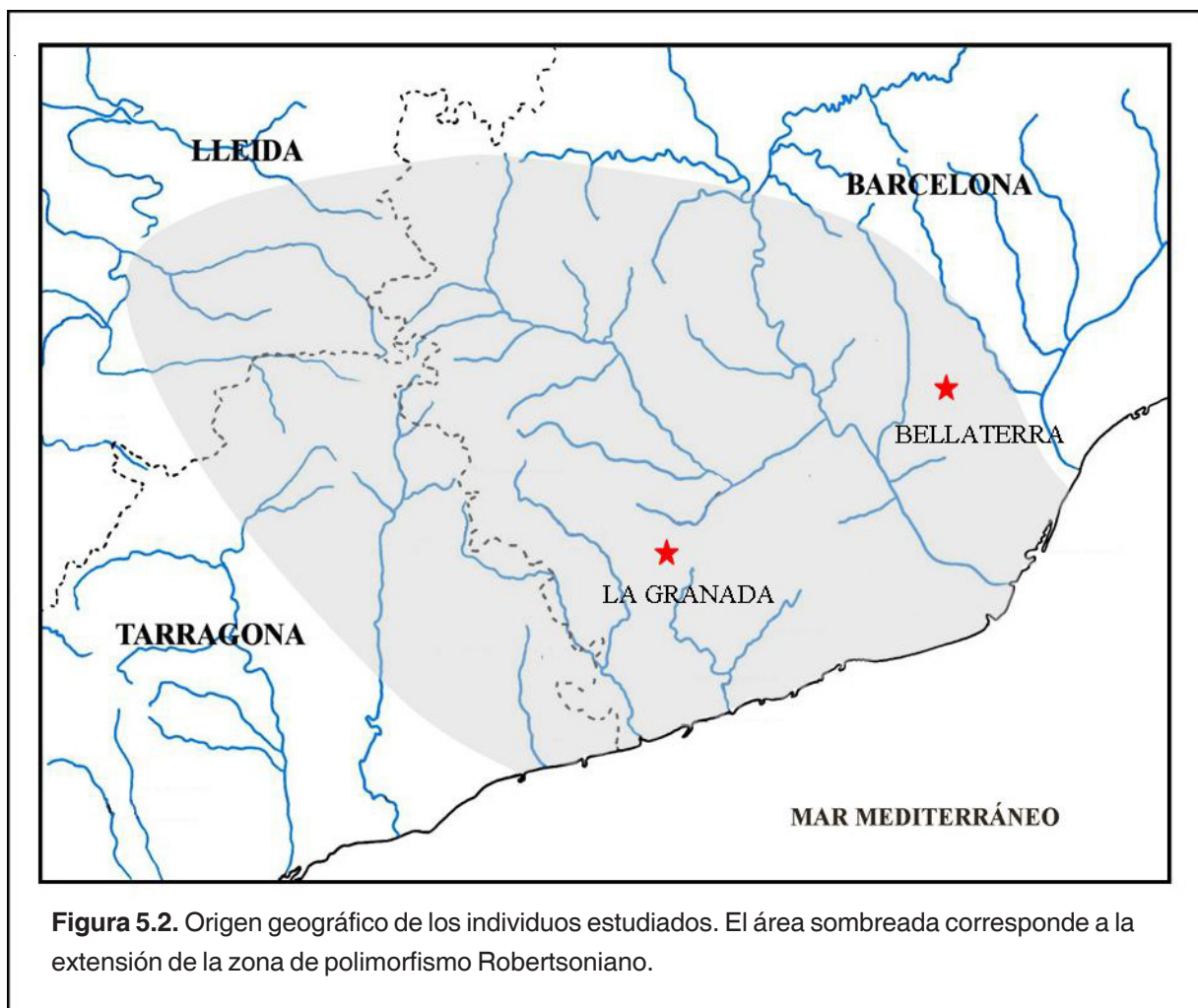
El comportamiento se puede estudiar a diversos niveles pero el primero debe ser la descripción de los patrones motores que fabrican el repertorio básico de comportamiento (Mackintosh, 1981). Se debe considerar que la actividad motora es una variable compleja que incluye diferentes tipos de comportamientos, y es por ello que debería reflejar las características genéticas de los animales. Esta variable, como otras fisiológicas y de comportamiento, está regulada por el sistema circadiano. La mayor parte de los genes que intervienen en el reloj circadiano están localizados en los cromosomas involucrados en las fusiones Robertsonianas descritas en la zona de polimorfismo Robertsoniano de Barcelona, y variaciones en la posición espacial de estos principales genes, y otros que contribuyen en múltiples aspectos del comportamiento circadiano (Shimomura *et al.*, 2001), podrían modificar algunas características del reloj biológico. Así pues, el objetivo de la presente investigación es determinar si existe una relación entre las divergencias cromosómicas y los patrones diarios de actividad motora, bajo distintas condiciones de iluminación, entre individuos de dos poblaciones, una formada por animales con cariotipo estándar y otra compuesta por especímenes que presentan polimorfismo Robertsoniano. Se trata del primer estudio de ritmos circadianos en ratones con fusiones Robertsonianas y aporta un nuevo enfoque a los estudios de comportamiento en poblaciones naturales que presentan este tipo de mutación cromosómica.

5.2. MATERIAL Y MÉTODOS

5.2.1. Muestra analizada

Para este estudio se utilizaron animales con dotación cromosómica estándar (grupo-AC), e individuos con fusiones Robertsonianas (grupo-Rb), procedentes de las localidades de Bellaterra y La Granada, respectivamente (figura 5.2). Entre las localidades con polimorfismo Robertsoniano, se seleccionó La Granada por: i) mostrar los valores más altos de heterocigosidad media y de porcentaje de loci polimórficos, atendiendo a la composición cromosómica estructural, ii) existir en ella los animales con menor número cromosómico ($2n=27$), y iii) registrarse todas las fusiones detectadas en el área de estudio.

Las capturas se realizaron en diciembre del 2001 mediante trampas de vivo Scherman, las cuales se ubicaron el 21 de diciembre y se retiraron al día siguiente. Se capturaron 9 animales



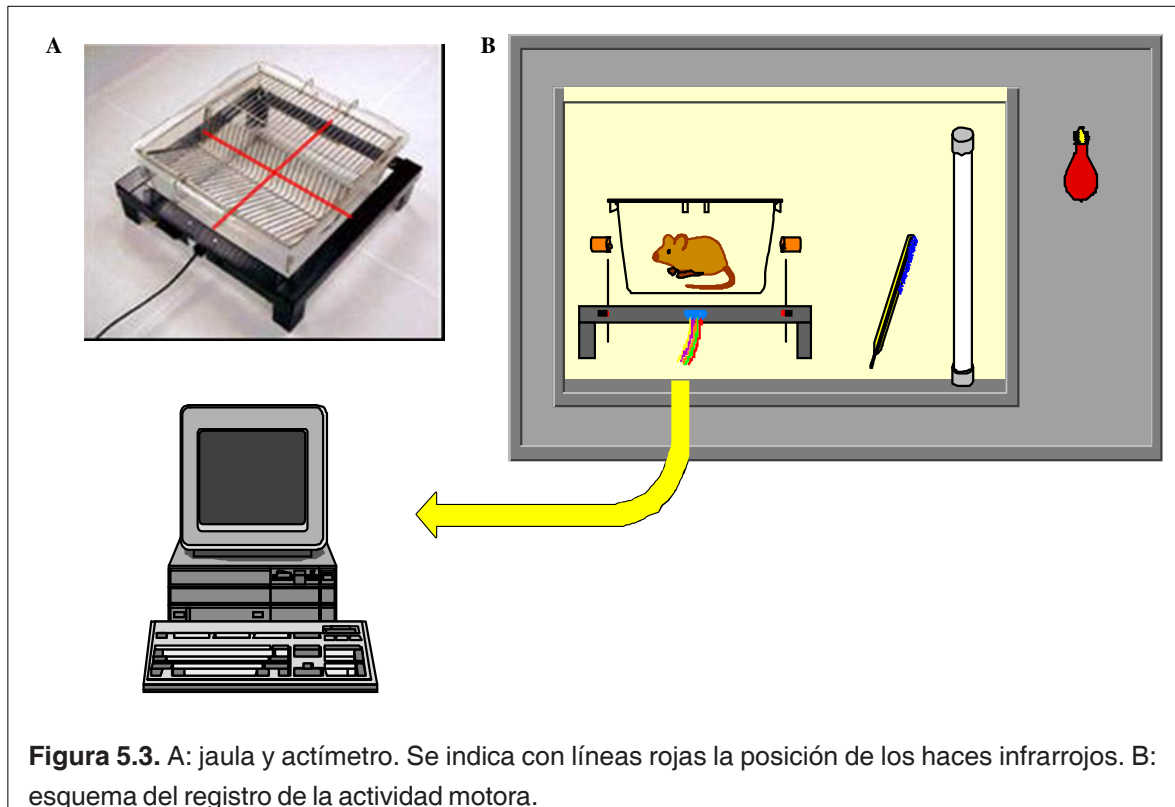
por localidad que fueron trasladados al estabulario, donde se mantuvieron en condiciones naturales de temperatura, luz y humedad. Seguidamente se inició un proceso de desparasitación para evitar el posible contagio a los animales de laboratorio utilizados en experimentos que se realizan en las mismas cabinas. Para eliminar los parásitos intestinales se utilizó citrato de piperazina, diluyendo 2,25 gr en 450 ml de agua. Este se administró durante dos semanas, con una semana de descanso entre ambas. Para eliminar los parásitos externos se utilizó una solución de permetrina de 0,06 gr en 100 ml de agua destilada, que se aplicó sobre los animales y sobre el lecho de la jaula una vez cada tres días durante dos semanas. Se interrumpió el proceso una semana y seguidamente se aplicó dos veces más el tratamiento con tres días de intervalo.

5.2.2. Condiciones del experimento

Transcurrido el periodo de desparasitación, cada ratón se alojó individualmente en una caja transparente Makrolom[®] de medidas 25×25×12 cm. Puesto que la principal información externa del sistema circadiano es la procedente de la luz (Klein *et al.*, 1991), el patrón diario de actividad motora se estudió en tres condiciones de luz diferentes: durante dos semanas los animales estuvieron bajo un ciclo de luz-oscuridad (LD) de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. La semana siguiente la luz fue cambiada por oscuridad (DD) y se mantuvieron en estas condiciones también durante dos semanas. Finalmente se sometieron a condiciones de luz constante (LL) durante dos semanas más. En los periodos de luz se aplicó una intensidad de iluminación de luz blanca de 300 lux y en los de oscuridad una luz roja menor de 0,5 lux. Durante todo el experimento los animales se mantuvieron en una habitación insonorizada con condiciones de temperatura ambiente controladas de 21°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) y con suministro de agua y comida (Dieta Estándar, Prolabor, España) *ad libitum*.

5.2.3. Análisis del comportamiento

La actividad motora de cada ratón fue registrada por actímetros. Estos aparatos constan de dos haces de luz infrarroja cruzados perpendicularmente y situados a 3 cm por encima del fondo de la caja (figura 5.3). La actividad motora se midió contando el número de interrupciones



de estos haces, producidos por cada animal, cada 15 minutos durante todo el experimento. Estos datos fueron registrados por un ordenador.

5.2.4. Determinación cariológica

Finalizado el experimento se procedió a la determinación cariológica de los ejemplares utilizados mediante preparaciones cromosómicas obtenidas a partir de médula ósea, siguiendo el método de Ford (1966). La identificación de los cromosomas, necesaria para saber qué tipos de fusiones Robertsonianas estaban implicadas, se efectuó mediante la tinción de bandas G con colorante de Wright (Mandahl, 1992) de los cromosomas en metafase.

5.2.5. Análisis de los datos

La actividad motora de cada individuo se representó por el método de doble gráfica (*double-plot*). Las filas representan los diferentes días y el ancho de las columnas corresponden a las 24 horas. Esta gráfica se duplica para la mejor visualización de los datos. La actividad

del animal corresponde a los tramos marcados en negro. La existencia de un ritmo de 24 horas se refleja en la aparición de una columna vertical de actividad. Si el animal se deja en condiciones constantes de oscuridad o iluminación, se producirá un cambio de su periodo endógeno, lo que provocará el desplazamiento de la columna de actividad hacia la derecha o hacia la izquierda, según se traten de periodos mayores o menores de 24 horas. Con este tipo de representación se pueden visualizar diferentes características rítmicas de la variable a estudiar, tales como el periodo y el patrón del ritmo, la estabilidad, etc.

El análisis de los datos de la actividad motora se llevó a cabo independientemente para cada uno de los tres estadios del experimento (LD, DD y LL). En la condición LD se analizaron todos los días de registro bajo esta situación (14 días). Bajo las condiciones LL y DD se estudiaron sólo los últimos ocho días de cada situación debido a que en los primeros días el patrón variaba por el cambio de condiciones ambientales. Los datos fueron suavizados mediante una media móvil de tres puntos. Para cada una de las fases se obtuvo el periodo del ritmo (τ) y su porcentaje de varianza explicada mediante el cálculo de periodogramas de Sokolove-Bushell (Sokolove & Bushell, 1978). Las series temporales de datos para la actividad motora que mostraron un nivel de probabilidad de ritmicidad circadiana mayor de 0,95 se consideraron ritmos estadísticamente significativos.

Se estudió la forma de onda o patrón diario medio de actividad motora sólo en LD y DD, puesto que bajo LL el ritmo de actividad no fue evidente. En los análisis, el periodo fundamental fue 24 horas para los animales en condiciones LD, y τ (periodo del ritmo endógeno) para los animales que se encontraban en oscuridad constante (DD). A partir del patrón del ritmo diario se calculó el valor medio de la actividad motora diaria cada 15 minutos (AMM), la duración de la fase de actividad ($t\alpha$), es decir, el tiempo en que la actividad motora está por encima de la mediana, y la cantidad de la actividad motora en la fase de actividad ($AM\alpha$). También se calcularon las variables $Pt\alpha$ y $PAM\alpha$, que correspondieron a los porcentajes de $t\alpha$ y $AM\alpha$ respecto a la duración total del ciclo y a la cantidad de actividad motora por ciclo, respectivamente. Puesto que en LD la fase de actividad está centrada en la fase de oscuridad, en esta condición también se obtuvo el porcentaje de actividad motora en la primera y segunda mitad de la fase oscura respecto a la actividad motora total.

El estudio cuantitativo del patrón diario de actividad motora se realizó mediante un análisis de Fourier (también llamado descomposición espectral) sobre los datos originales. Este análisis se basa en el principio de que toda función periódica se puede descomponer en la suma de infinitas funciones sinusoidales de frecuencias armónicas a la fundamental. Se entiende por función sinusoidal de frecuencia armónica aquella cuya frecuencia es la fundamental multiplicada por un entero. Se considera que el primer armónico (o primera función sinusoidal armónica) tendrá la frecuencia fundamental, el segundo armónico la fundamental multiplicada por dos, el tercero multiplicada por tres, etc. En el análisis de Fourier cada función sinusoidal está definida por su amplitud, un desplazamiento de fase y un periodo específicos. La función general $Y_{(t)}$ se puede definir como la suma de sus armónicos: $Y_{(t)} = M + A_1 \cos(\omega_1 t - \varphi_1) + A_2 \cos(\omega_2 t - \varphi_2) + \dots + A_n \cos(\omega_n t - \varphi_n)$ donde ω_i es la velocidad angular del armónico $i = 2\pi/T$, t es la variable tiempo, $Y_{(t)}$ es el valor de la variable en el tiempo t , M es el valor medio de la función, A_i es la amplitud del armónico i , T el periodo del armónico 1 ($i=1$) y φ es el desplazamiento de la fase. Se considera que M es el armónico 0, ya que se puede deducir que la función $A_0 \cos(\omega_0 t - \varphi_0)$ tiene velocidad angular 0 y por tanto equivale a un valor constante. La parte de la variación global de los datos explicada por un armónico i recibe el nombre de potencia (P): $P_i = 100 A_i / (A_1 + A_2 + \dots + A_n)$. El análisis de éstas permite determinar cuáles son los componentes rítmicos más importantes de la serie de datos que se analiza. Tomando la tau (τ) de cada animal como periodo del armónico fundamental, se aplicó un análisis de Fourier a los datos de actividad motora y se calculó el espectro de potencias con 15 armónicos para cada día y cada animal. El espectro de potencias medio de cada animal se obtuvo promediando el espectro de potencias de todos los días en la condición de iluminación LD y de los últimos 8 días bajo las condiciones DD y LL. Estos valores se utilizaron para clasificar los animales por localidades en cada una de las condiciones de luz.

5.2.6. Análisis estadísticos

Todos los datos fueron estudiados para la normalidad y homogeneidad de varianzas, mediante las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Levene. Las diferencias entre grupos cromosómicos de los parámetros referentes a la forma de onda se estudiaron mediante ANOVAs de dos factores (grupo y sexo) con interacción. Los valores de estos parámetros se representaron como la media \pm ET (error típico de la muestra).

La clasificación de los animales por grupo cromosómico se realizó mediante análisis discriminantes siguiendo el método de inclusión de variables por pasos. Las variables independientes fueron los diferentes armónicos y la variable de clasificación fue el grupo cromosómico. Dado el pequeño tamaño de la muestra, se realizó una preselección de las variables independientes: en el análisis discriminante sólo se utilizaron aquellos armónicos que presentaron diferencias significativas entre grupos cromosómicos pero no entre sexos (ANOVA de dos factores). También se realizó un análisis discriminante incluyendo todos los armónicos para comparar los resultados con los análisis previos. Puesto que se llevaron a cabo tres análisis discriminantes, uno para cada condición de iluminación, los valores de significación obtenidos fueron corregidos por el método secuencial de Bonferroni (Rice, 1989), utilizando como criterio de corrección las tres condiciones de iluminación. La normalidad de las distribuciones multivariantes de las variables independientes y la homogeneidad de las matrices de covarianzas fueron estudiadas mediante diagramas cuantil-cuantil (basados en las distancias de Mahalanobis entre los centroides al cuadrado) y pruebas M de Box, respectivamente.

Los periodogramas de Sokolove & Bushell, la extracción de variables relacionadas con la actividad motora así como el análisis de Fourier se realizó mediante el programa “El Temps” (A. Díez-Noguera, Universitat de Barcelona, 1999). Los análisis estadísticos se realizaron mediante el paquete estadístico SPSS (SPSS Inc., 1989-2001), excepto la prueba de normalidad para distribuciones multivariantes, que se realizó mediante una macro para SAS 8.02 (<http://www.math.yorku.ca/SCS/sasmac/cqplot.html>).

5.3. RESULTADOS

Las características citogenéticas de los animales capturados se muestran en la tabla 5.1. Todos los animales de la localidad de Bellaterra (grupo-AC) presentaron el cariotipo estándar de $2n=40$ cromosomas. Los animales de La Granada (grupo-Rb) presentaron un número diploide comprendido entre 29 y 32, siendo todos heterocigotos estructurales excepto uno, que presentó las fusiones Rb(4.14), Rb(5.15), Rb(6.10), Rb(9.11) y Rb(12.13) en homocigosis.

5.3. RESULTADOS

Tabla 5.1. Características citogenéticas de los animales analizados. h: hembra; m: macho; H: heterocigoto; M: homocigoto

Localidad	Individuo	sexo	2n	Heterocigosidad estructural	Cromosomas metacéntricos	
					Homocigotos	Heterocigotos
La Granada (grupo-Rb)	480	h	30	H	4.14, 5.15, 9.11, 12.13	3.8, 6.10
	481	m	30	H	4.14, 5.15, 9.11, 12.13	3.8, 6.10
	482	h	30	H	4.14, 5.15, 9.11, 12.13	3.8, 6.10
	483	m	31	H	4.14, 5.15, 9.11, 12.13	3.8
	484	h	31	H	4.14, 5.15, 9.11, 12.13	3.8
	485	m	31	H	4.14, 5.15, 9.11, 12.13	6.10
	486	h	30	M	4.14, 5.15, 6.10, 9.11, 12.13	-
	487	h	29	H	3.8, 4.14, 5.15, 9.11, 12.13	7.17
	488	m	32	H	5.15, 9.11, 12.13	4.14, 6.10
Bellaterra (grupo-AC)	489	h	40	M	-	-
	490	m	40	M	-	-
	491	m	40	M	-	-
	492	h	40	M	-	-
	493	h	40	M	-	-
	494	h	40	M	-	-
	495	h	40	M	-	-
	496	h	40	M	-	-
	497	h	40	M	-	-

Puesto que se obtuvo homogeneidad de varianzas y normalidad de las distribuciones de las variables, todos los análisis se realizaron mediante pruebas paramétricas. Las dobles gráficas obtenidas para cada uno de los animales de ambas poblaciones se muestran en las figuras 5.4 y 5.5. En la tabla 5.2 se encuentran los valores del periodo del ritmo en cada una de las condiciones de iluminación y su porcentaje de varianza explicada. Los animales presentaron un patrón diferente de actividad motora en función de las condiciones de luz. En LD, todos los individuos de ambos grupos cromosómicos mostraron una actividad motora que fue rítmica cada 24 horas. En DD todos los individuos de ambos grupos presentaron un ritmo estadísticamente significativo según el periodograma de Sokolove-Bushell (tabla 5.2). El valor medio de τ fue $23,73 \pm 0,08$ h (media \pm ET) para el grupo-Rb, y $23,78 \pm 0,11$ h, para los animales del grupo-AC. Para la condición LL se observó que la mayoría de los animales de ambos grupos perdieron el ritmo circadiano. El periodograma de Sokolove-Bushell sólo mostró 3 animales de cada grupo con un ritmo estadísticamente significativo (grupo-Rb: 481, 483, 485; grupo-AC: 490, 492, 493; tabla 5.2). A pesar de esto, en la mayoría de los

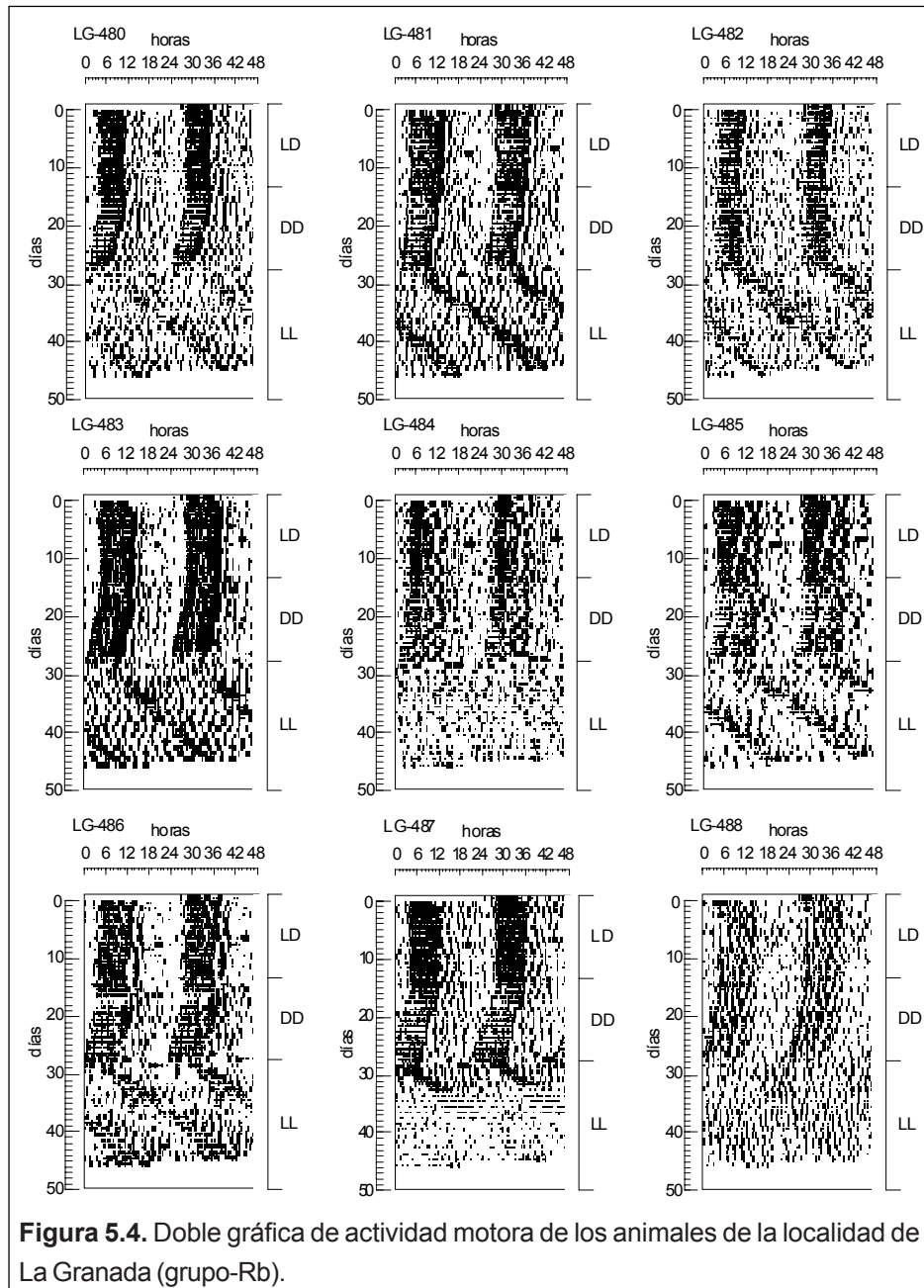


Figura 5.4. Doble gráfica de actividad motora de los animales de la localidad de La Granada (grupo-Rb).

individuos se pudo calcular visualmente el periodo del ritmo mediante el cálculo de la pendiente de la línea recta que unía los inicios de actividad del primer y último día del registro bajo LL. Este periodo se pudo cuantificar en todos los individuos excepto para dos (484 y 488) del grupo-Rb y dos (495 y 497) del grupo-AC (figuras 5.4 y 5.5). Bajo LL el valor medio de τ fue $25,87 \pm 0,16$ h para los ejemplares del grupo-Rb, y $25,75 \pm 0,15$ h para los del grupo-AC. En ninguna de las tres condiciones se encontraron diferencias entre grupos cromosómicos ni entre sexos. Tampoco el análisis del porcentaje de la varianza explicada por el ritmo circadiano mostró diferencias significativas ni entre grupos ni entre sexos.

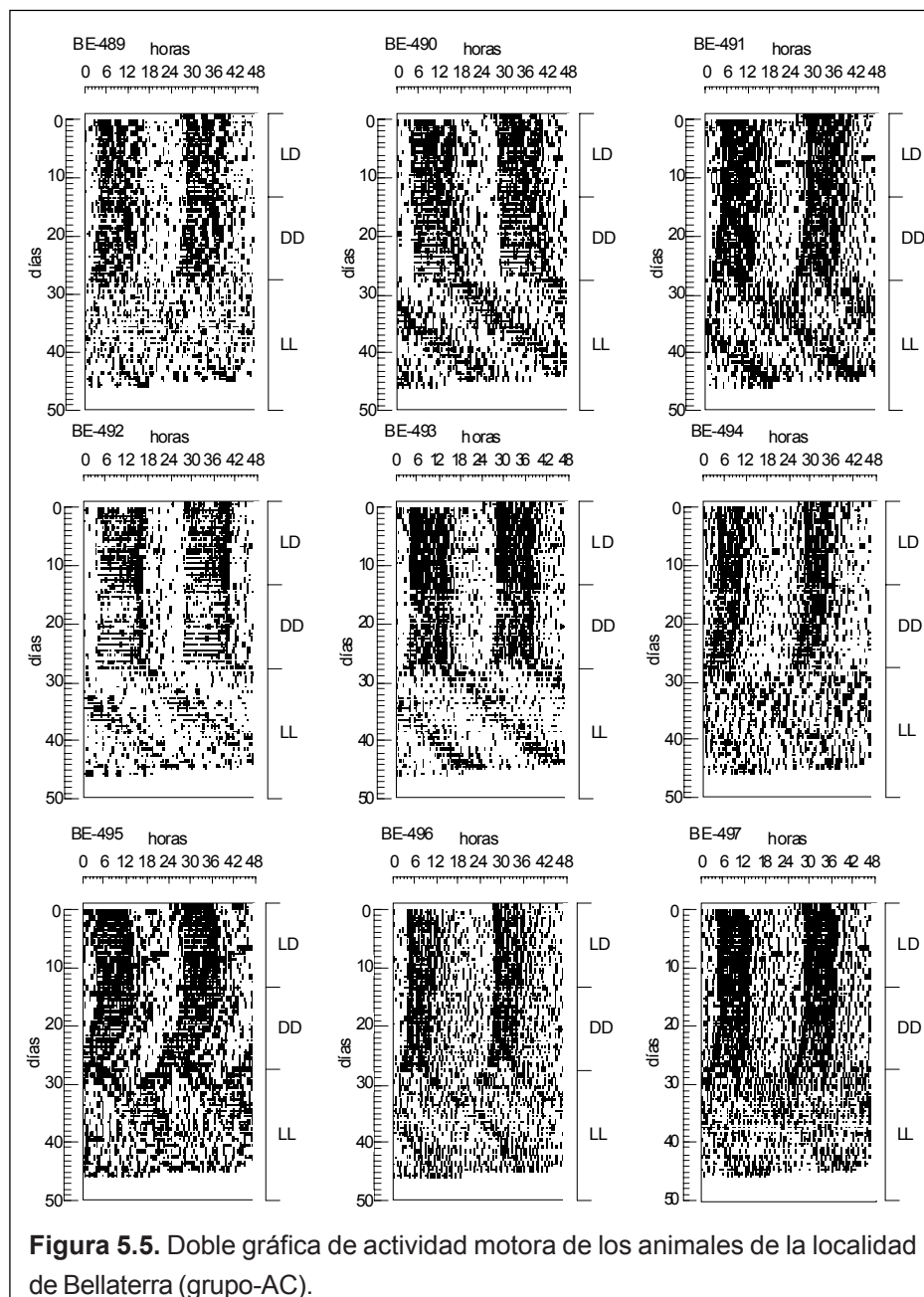


Figura 5.5. Double gráfica de actividad motora de los animales de la localidad de Bellaterra (grupo-AC).

La forma de onda media, correspondiente a cada grupo, para las condiciones de luz LD y DD, está representada en la figura 5.6 y 5.7, respectivamente. Los valores de las variables extraídas del análisis de la forma de onda se muestran en la tabla 5.3. El patrón diario medio de actividad motora bajo LD y DD fue aparentemente diferente en los dos grupos. Bajo LL éste fue muy inestable con lo que la forma de onda no se calculó. Bajo LD, el valor medio de la actividad motora diaria cada 15 minutos (AMM) fue mayor en el grupo-AC que en el grupo-Rb (grupo-AC: $10,72 \pm 1,10$; grupo-Rb: $8,32 \pm 0,75$; $F=4,91$, $p<0,05$). No se encontraron

Tabla 5.2. Valores individuales del periodo del ritmo y el porcentaje de varianza explicada en cada una de las condiciones de iluminación. Bajo LD el periodo del ritmo fue siempre 1440, por lo que no se muestra en la tabla.

Grupo cromosómico	Individuo	τ DD	τ LL	varLD	varDD	varLL
Grupo-Rb	480	1413	1540	35,70	19,90	-
	481	1419	1560	29,53	31,15	21,74
	482	1445	1560	29,60	23,90	-
	483	1425	1496	43,31	32,60	23,65
	484	1439	-	25,66	22,40	-
	485	1422	1575	21,25	25,00	26,45
	486	1406	1580	30,87	20,30	-
	487	1439	1554	32,19	22,80	-
	488	1408	-	17,36	22,11	-
Grupo-AC	489	1437	1533	28,06	23,90	-
	490	1456	1557	20,12	22,11	26,09
	491	1437	1548	31,49	31,50	-
	492	1424	1575	43,88	28,90	28,98
	493	1437	1575	43,53	36,20	29,70
	494	1412	1506	27,08	27,17	-
	495	1385	-	17,24	24,28	-
	496	1430	1520	33,39	25,00	-
	497	1426	-	22,76	22,80	-

diferencias significativas entre sexos. La AMM bajo DD no mostró diferencias entre grupos ni entre sexos (figura 5.7).

El análisis de la varianza para $t\alpha$ y $Pt\alpha$ bajo LD no mostró diferencias significativas entre grupos cromosómicos pero sí entre sexos ($F=7,79$, $p<0,05$; $F=7,88$, $p<0,05$, respectivamente). Las hembras presentaron valores menores que los machos, tanto para $t\alpha$ (hembras: $10,82\pm 0,45$ h; machos: $12,39\pm 0,13$ h) como para $Pt\alpha$ (hembras: $45,16\pm 1,84$; machos: $51,70\pm 0,56$). La actividad motora en alfa ($AM\alpha$) bajo LD fue también diferente entre sexos ($F=6,19$; $p<0,05$), mostrando las hembras los valores más bajos (hembras: $561,42\pm 81,34$; machos: $844,01\pm 103,65$). No se encontraron diferencias entre grupos. Tampoco se encontraron diferencias significativas, ni entre grupos ni entre sexos, para $PAM\alpha$.

En LD se pudo observar un patrón bimodal de la actividad motora durante la fase de oscuridad (figura 5.6) en los individuos de ambos sexos del grupo-AC, con un descenso de la actividad al cabo de 4 horas respecto el inicio de esta fase. En el grupo-Rb se observó un comportamiento diferencial entre ambos sexos. En el análisis de la varianza sobre el porcentaje de actividad motora en cada parte de la noche en el grupo-Rb se observó un

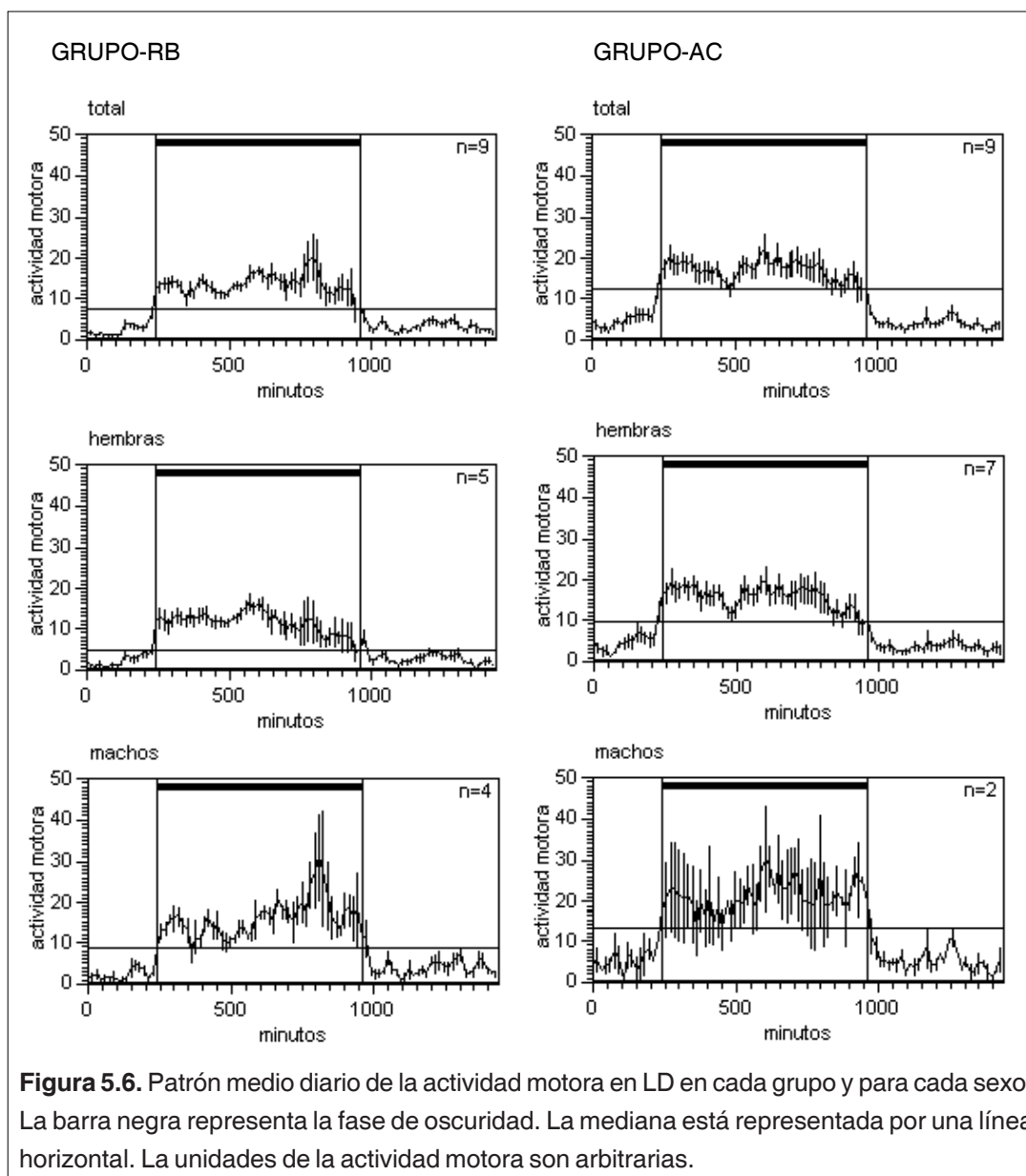
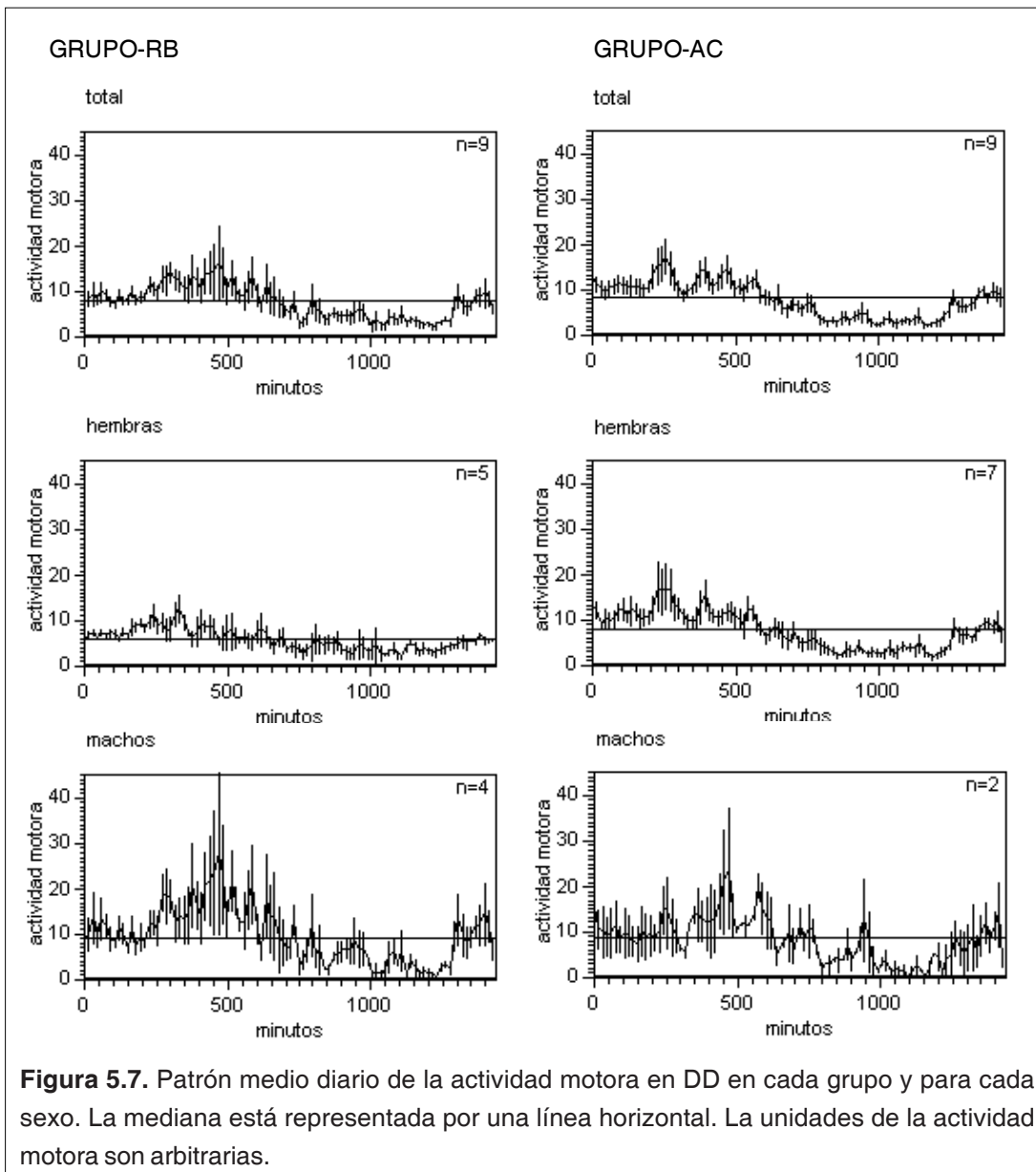


Figura 5.6. Patrón medio diario de la actividad motora en LD en cada grupo y para cada sexo. La barra negra representa la fase de oscuridad. La mediana está representada por una línea horizontal. La unidades de la actividad motora son arbitrarias.

efecto significativo de la interacción entre grupo y sexo ($F=17,01$, $p<0,001$). Un estudio más detallado de esta interacción mostró una mayor actividad de las hembras, respecto a los machos, en la primera parte de la noche (hembras: $44,95\pm 2,53$; machos: $33,02\pm 0,78$; $F=16,32$, $p<0,01$), mientras que en la segunda parte de la noche la situación fue inversa, presentando los machos mayor actividad (hembras: $34,91\pm 4,42$; machos: $47,83\pm 1,77$; $F=6,05$, $p<0,05$). En condiciones de iluminación DD no se obtuvieron diferencias significativas ni entre grupos ni entre sexos para ninguna de las variables de la forma de onda estudiadas. El análisis cuantitativo del patrón diario de actividad motora fue llevado a cabo mediante el



análisis de contenido de potencia para cada animal y para cada condición de iluminación. En las figuras 5.8 y 5.9 están representados la evolución en función del tiempo de los espectros de potencia para cada una de las poblaciones y los espectros medios de potencia de los dos grupos cromosómicos para cada una de las condiciones de iluminación, respectivamente. Bajo ciclos de LD el componente principal fue el primer armónico, que corresponde a un periodo próximo a 24 horas. Bajo DD, el contenido de potencia del primer armónico disminuyó, y los armónicos cuya frecuencia es mayor que un día (armónicos ultradianos) incrementaron el contenido de potencia. Esta tendencia fue mayor cuando los

Grupo cromosómico	Individuo	AMM LD	AMM DD	AMM LL	ta LD	AMa LD	PTa LD	PAMa LD	ta DD	AMa DD	Pta DD	PAMa LD
Grupo-Rb	480	3,55	7,31	6,70	741,74	546,53	51,51	83,60	876,00	512,00	62,01	77,00
	481	7,36	8,10	7,22	738,22	600,13	51,27	81,83	669,36	525,75	46,87	72,58
	482	4,18	4,80	4,54	660,92	337,53	45,90	77,72	662,01	297,38	45,41	73,01
	483	10,80	13,20	17,90	731,23	1072,00	50,78	88,49	840,13	1323,10	58,83	81,17
	484	2,52	7,40	4,90	741,75	528,20	51,51	78,79	651,33	295,13	44,43	65,66
	485	3,62	9,78	4,70	731,25	701,33	50,78	76,84	674,74	337,50	47,12	72,90
	486	4,51	8,36	7,09	727,73	684,20	50,54	89,21	724,19	461,13	50,29	71,85
	487	3,07	8,10	4,70	706,57	586,80	49,07	78,50	793,54	295,50	55,41	69,98
	488	4,64	7,80	7,60	664,46	540,67	46,14	75,71	768,47	648,82	54,19	82,00
Grupo-AC	489	3,13	7,70	7,40	734,72	588,47	51,02	84,67	687,73	470,00	48,09	73,00
	490	5,33	9,80	7,23	769,85	688,20	53,46	77,19	561,92	368,00	38,33	57,80
	491	9,38	16,30	10,70	738,22	1292,20	51,27	83,09	725,19	789,88	50,29	80,74
	492	2,28	5,60	3,50	731,21	443,80	50,78	86,70	494,75	202,25	33,93	58,86
	493	2,65	13,90	5,50	727,68	1094,80	50,53	88,84	730,18	532,38	50,29	84,53
	494	6,13	9,89	12,17	724,15	746,20	50,29	82,76	633,49	780,26	44,67	81,59
	495	7,01	11,84	8,08	783,92	827,33	54,44	73,93	501,87	362,63	35,64	50,80
	496	4,72	8,70	7,60	706,60	659,73	49,07	83,45	661,84	518,63	45,90	71,40
	497	6,98	12,79	11,70	653,84	798,87	45,41	68,57	694,32	648,13	49,31	66,77

Tabla 5.4. Resultados obtenidos en los análisis discriminantes para cada condición de luz. Rb: grupo-Rb; AC: grupo-AC. ** P<0,01; *P<0,05 después de la corrección de Bonferroni.

Condición de iluminación	λ de Wilks	Armónicos incluidos en la función	% medio de casos bien clasificados	% de casos bien clasificados en Rb	% de casos bien clasificados en AC
LD	0,457**	A10, A11	88,9	88,9	88,9
DD	0,703*	A9	72,2	66,7	77,8
LL	0,719*	A11	72,2	66,7	77,8

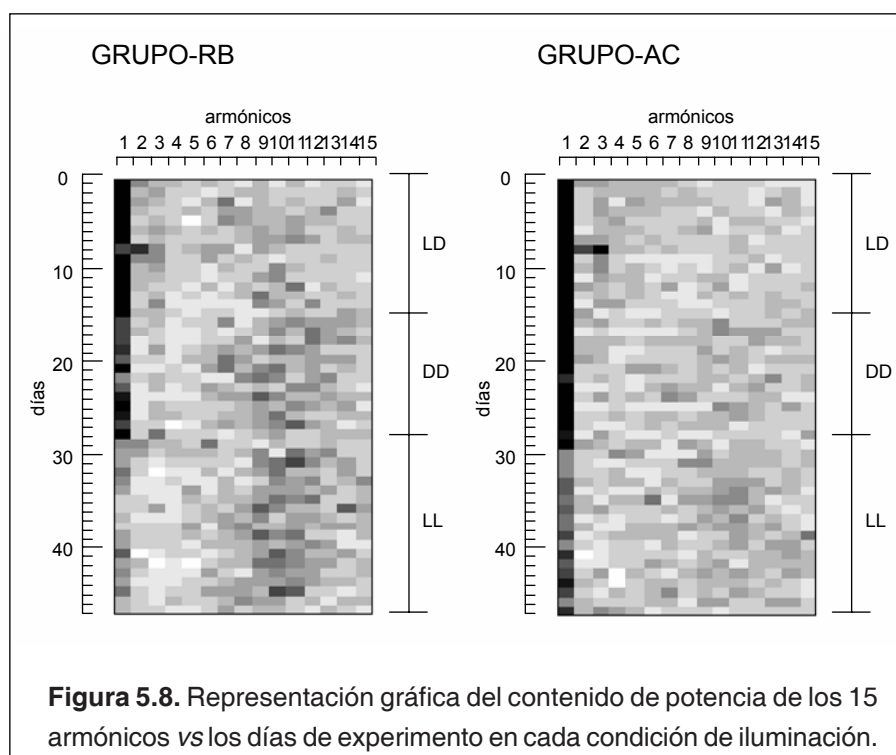
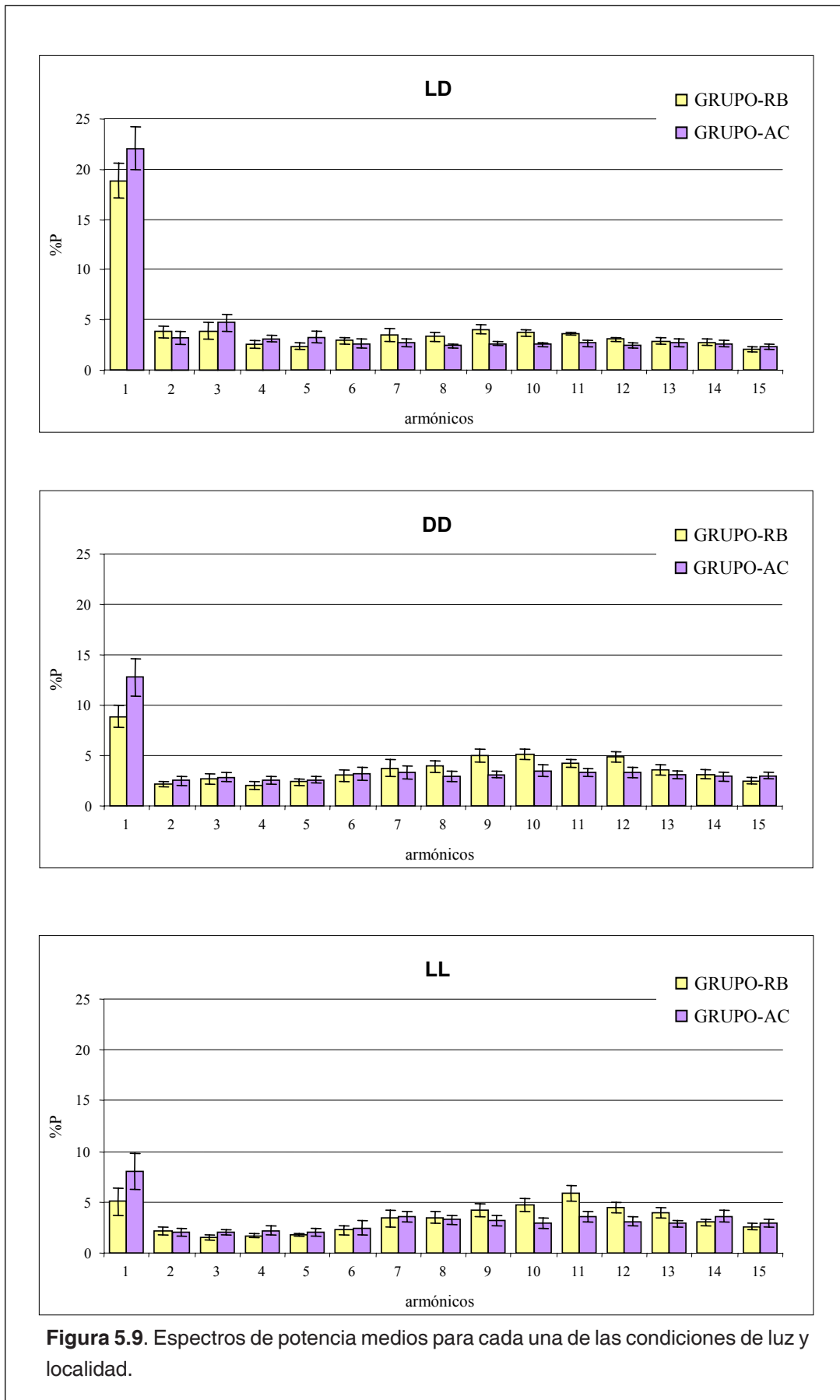


Figura 5.8. Representación gráfica del contenido de potencia de los 15 armónicos vs los días de experimento en cada condición de iluminación.

animales fueron transferidos a luz constante. Se puede apreciar un incremento en el contenido de potencia en los armónicos del 9 al 12 cuando los animales fueron transferidos de LD a DD, y más tarde a LL (figuras 5.8 y 5.9). Estos armónicos corresponden a ritmos entre 2 y 2,5 horas. Los valores de estos armónicos fueron mayores en el grupo-Rb.

Los armónicos incluidos como variables independientes en el análisis discriminante fueron aquellos que mostraron diferencias significativas entre grupos pero no entre sexos, es decir, A9 ($F=9,06$, $p<0,01$), A10 ($F=9,83$, $p<0,01$) y A11 ($F=9,68$, $p<0,01$) bajo la condición LD, A9 ($F=6,77$, $p<0,05$) y A10 ($F=5,15$, $p<0,05$) bajo la condición DD y A10 ($F=5,63$, $p<0,05$) y A11 ($F=6,25$, $p<0,05$) bajo LL. En la tabla 5.4 se muestran los resultados del análisis discriminante bajo cada situación de iluminación. En todas las condiciones de iluminación el análisis discriminante permitió la clasificación de los dos grupos. En LD el método incluyó dos armónicos, A10 y A11, mientras que bajo DD y LL sólo incluyó un armónico, A9 y A11 respectivamente. En todas las condiciones de iluminación el método permitió un porcentaje elevado de clasificación correcta (>66%). Bajo DD y LL el porcentaje de clasificación fue mayor en el grupo-AC. Cuando se realizó el análisis discriminante con los 15 armónicos se obtuvieron resultados similares.

5.3. RESULTADOS



5.4. DISCUSIÓN

El mecanismo circadiano de los seres vivos funciona de manera innata y el periodo de su ritmo endógeno es un parámetro que viene determinado genéticamente (Davis & Menaker, 1981). Sin embargo las condiciones ambientales, especialmente las de iluminación, pueden incidir de manera importante en la manifestación del ritmo. Es por ello que en el presente estudio se analizó el patrón diario de actividad motora, considerado como un todo, bajo distintas situaciones de iluminación. La actividad motora cuantificada como el número de movimientos por unidad de tiempo es una variable compleja, ya que viene modulada por múltiples factores (acceso a la comida, aseo, secreción hormonal,...). Esta complejidad resulta de gran importancia ya que permite establecer un patrón característico para cada animal.

Los resultados de este experimento muestran que las fusiones Robertsonianas encontradas en una población salvaje de ratones no afecta la manifestación de las principales características del marcapasos circadiano, como son el periodo del ritmo endógeno, la amplitud del ritmo o la relación de fases del ritmo encarrilado con el "Zeitgeber", en este caso el ciclo de luz-oscuridad. Sin embargo sí que parece afectar a la forma del ritmo circadiano, existiendo diferencias significativas entre los dos grupos analizados en lo que se refiere a la modulación ultradiana del ritmo circadiano. Esto nos permite sugerir que las fusiones Robertsonianas no afectan al marcapasos circadiano pero sí al sistema efector de actividad motora.

Existen pocos estudios sobre el patrón de actividad en poblaciones naturales del ratón doméstico. Según se conoce, la actividad de dicha especie, en condiciones naturales, muestra un ritmo circadiano (Poirel, 1968; citado en Mackintosh, 1981) con picos de actividad al amanecer y en el crepúsculo además de series de picos de corta duración, grandes durante la fase oscura y pequeños durante la luminosa. Los resultados obtenidos en el presente estudio bajo condiciones LD mostraron que el grupo que más se ajustó al patrón general de la especie fue el compuesto por animales de 40 cromosomas, que presentaron una distribución de la actividad bimodal a lo largo de la fase de oscuridad. Sin embargo, hay que

tener en cuenta que los resultados obtenidos por Poirel (1968) y los aquí presentados no son comparables, ya que la transición entre las fases de luz y de oscuridad en el medio natural sucede de forma gradual, mientras que en nuestras condiciones experimentales tuvo lugar de forma brusca. Los valores mayores de actividad motora encontrados en los machos pueden ser consecuencia de una respuesta al aislamiento, como indicó Guo *et al.* (2003). Estos autores encontraron que los machos aislados presentaban mayor actividad motora que las hembras. Cabe destacar las diferencias entre sexos encontradas en el grupo-Rb para el perfil del patrón diario de actividad motora, no detectadas en el grupo-AC. En los ejemplares Robertsonianos, la distribución de la actividad durante la fase de oscuridad (bajo condiciones LD) fue diferente para ambos sexos, mostrando las hembras más actividad que los machos en la primera parte de la noche, mientras que en la segunda parte de la noche fueron los machos los que presentaron mayor actividad. No se encontró explicación para estos resultados más allá de la existencia de una estructura social diferente entre ambos grupos. Otra característica diferencial a destacar fue el mayor valor de AMM detectado en el grupo-AC bajo LD, sugiriendo que las fusiones Robertsonianas pueden provocar alteraciones en el comportamiento, como por ejemplo una disminución en la actividad motora.

A estas diferencias generales entre ambas poblaciones hay que añadir las obtenidas del estudio de la descomposición espectral del ritmo en las distintas fases. En este análisis se observa un mayor número de componentes ultradianos en los animales del grupo-Rb, tanto en LD como en DD. Los ratones de dicho grupo se caracterizaron por una mayor frecuencia de picos cortos de actividad motora, que dio como resultado una fuerte modulación del patrón diario de ésta. Este aumento en los componentes ultradianos quedó patente con la descomposición espectral de la función del patrón de actividad motora diario. La función discriminante obtenida a partir de los armónicos resultó ser un buen método para clasificar los animales de ambas localidades lo que sugiere, junto con las diferencias encontradas anteriormente, que ambas localidades presentan divergencia genética en grado no desestimable. Las herramientas aquí utilizadas han demostrado ser muy potentes en la detección de diferencias entre cepas de ratas y ratones, y para la clasificación de animales de la misma familia (Cambras & Díez-Noguera, 1988; Cambras *et al.*, 1988; Díez-Noguera *et al.*, 1989). Esto sugiere que este tipo de análisis es un buen instrumento para el estudio de

poblaciones Robertsonianas, en que se espera que las divergencias genéticas entre animales de una zona de polimorfismo Robertsoniano no sean muy grandes. Hay que destacar que el análisis discriminante fue más resolutivo en la fase de luz-oscuridad, en la que se manifiesta interacción entre el ritmo endógeno y el ambiente, que no en la fase de oscuridad constante, en la que sólo se observa el ritmo endógeno.

Los resultados aquí obtenidos permiten discriminar entre animales con diferente composición cromosómica utilizando el patrón diario de actividad motora. Esto está en concordancia con los resultados obtenidos en diversos estudios en los que se han analizado diferencias entre grupos Robertsonianos utilizando otros caracteres fisiológicos y de comportamiento (Krushinski *et al.*, 1978; Gérard *et al.*, 1994, Leitinger *et al.*, 1994; Ganem & Searle, 1996a, 1996b). Sin embargo, como Leitinger *et al.* (1994) indican, la relación causal entre el comportamiento y las translocaciones no es clara. Está descrito que las fusiones Robertsonianas pueden jugar un papel importante, principalmente, a dos niveles: en la información génica y en la función del genoma. Las translocaciones Robertsonianas pueden favorecer la aparición de diferencias en el genoma como consecuencia de cambios genéticos acumulados de generación en generación (Lane & Eicher, 1985; Eppig & Eicher, 1988; Bidau *et al.* 2001; Castiglia & Capanna, 2002; Dumas & Britton-Davidian, 2002). Así, los cromosomas Robertsonianos muestran supresión de la recombinación en estado heterocigoto (Lane & Eicher, 1985; Eppig & Eicher, 1988; Bidau *et al.*, 2001; Castiglia & Capanna, 2002) como resultado de un mal apareamiento de los trivalentes durante el paquiteno (Davisson & Akeson, 1993), o en estado homocigoto (Dumas & Britton-Davidian, 2002) por la pérdida de heterocromatina céntrica (Yamamoto & Miklos, 1978; Choo, 1998), o por la reorganización espacial de los cromosomas durante la profase meiótica (John, 1990; Roeder, 1990; Zickler and Kleckner, 1998, 1999). Estas situaciones pueden cambiar las frecuencias de alelos relevantes en el comportamiento que son transferidos con las translocaciones, a causa del desequilibrio del ligamiento. Puesto que el comportamiento circadiano es el resultado de loci múltiples que interactúan (Shimomura *et al.*, 2001), las diferencias encontradas en este estudio entre los dos grupos cromosómicos podrían ser debidas al efecto del polimorfismo en estos loci. Además, se han propuesto los ritmos ultradianos como el resultado de modificaciones fisiológicas y neuronales en las vías de

5.5. BIBLIOGRAFÍA

salida (Klante *et al.*, 1999). Cambios espaciales en la estructura de la cromatina, ya sea en la metafase o en la interfase, están relacionados con la replicación y la transcripción, afectando la función de las células (Qumsiyeh, 1999), y por consiguiente influenciando el ritmo ultradiano del metabolismo celular. Se sabe que los ritmos ultradianos están presentes en diversos procesos fisiológicos como la emisión del dióxido de carbono (Stupfel *et al.*, 1995), en el consumo de oxígeno (Bailey *et al.*, 1973), en la temperatura interna (Roussel, 1986), en la secreción hormonal (Bradenberger *et al.*, 1987), etc. Se ha indicado que los ritmos ultradianos pueden tener una importante función integrativa en los animales endodermos (Lloyd & Stupfel, 1991). Considerando esto, sugerimos que las reordenaciones cromosómicas podrían afectar algunos aspectos de la regulación génica relacionada con las vías metabólicas. Además, parece probable que dos poblaciones de la misma especie que viven en el mismo nicho ecológico no han de diferir en el funcionamiento del reloj circadiano, puesto que están sometidas a una misma presión ambiental. Sin embargo, los ritmos ultradianos no parecen estar controlados por el ambiente externo, y por tanto son más susceptibles de diferir entre poblaciones.

A pesar del tamaño de muestra, el elevado porcentaje de clasificación correcta de los individuos en cada uno de los grupos cromosómicos permite sugerir que el patrón de actividad motora es una variable apropiada para la discriminación entre grupos de ratones diferenciados cromosómicamente. Esto es especialmente interesante en estudios de especiación en mamíferos puesto que, como Mayr (1963) indicó, el comportamiento animal es uno de los factores que pueden determinar cambios microevolutivos en las poblaciones.

5.5. BIBLIOGRAFÍA

Abe, H., Kida, M., Tsuji, K. & T. Mano (1989). Feeding cycles entrain circadian rhythms of locomotor activity in CS mice but not in C57BL/6J mice. *Physiology & Behavior*, 45: 397-401.

Albrecht, U. & G. Eichele (2003) The mammalian circadian clock. *Current Opinion in Genetics & Development*, 13: 271–277.

- Albrecht, U., Sun, Z., Eichele, G. & C. Lee (1997). A differential response of two putative mammalian circadian regulators, *mper1* and *mper2*, to light. *Cell*, 91: 1055–1064
- Bailey, D., Harry, D., Johnson, R. E., and Kupprat, I. (1973). Oscillations in oxygen consumption of man at rest. *Journal of Applied Physiology*, 34: 467-470.
- Berson, D. M. (2003). Strange vision: ganglion cells as circadian photoreceptors. *Trends in Neurosciences*, 26: 314-320.
- Bidau, C. J., Giménez, M. D., Palmer, C. L. & J. B. Searle (2001). The effects of Robertsonian fusions on chiasma frequency and distribution in the house mouse (*Mus musculus domesticus*) from a hybrid zone in northern Scotland. *Heredity*, 87: 305-313.
- Bradenberger, G., Simon, C. & Follenius, M. (1987). Ultradian endocrine rhythms: a multioscillatory system. *Journal Interdisciplinary Cycle Research*, 18: 307-315.
- Cambras, T. & A. Díez-Noguera (1988). Generational variability in the patterns of motor activity circadian rhythm in the rats. *Revista Española de Fisiología*, 44: 243-246.
- Cambras, T., Díez-Noguera, A. & M. Ribot (1988). Classification of familiar motor activity patterns using a cluster method and spectral analysis. *Journal Interdisciplinary Cycle Research*, 19: 17-22.
- Capanna, E. & M. Corti (1982). Reproductive isolation between two chromosomal races of *Mus musculus* in the Rhaetian Alps (Northern Italy). *Mammalia*, 46: 107-109.
- Capanna, E., Corti, M., Mainardi, D., Parmigiani, S. & P. F. Brain (1984). Karyotype and intermale aggression in wild house mice: ecology and speciation. *Behavior Genetics*, 14: 195-208.
- Capanna, E., Corti, M., Nascetti, G. & L. Bullini (1985). Pre- and post-mating isolating mechanisms in the speciation of the European long-tailed house mouse *Mus musculus domesticus*. *Acta Zoologica Fennica*, 170: 115-120.
- Castiglia, R. & E. Capanna (2002). Chiasma repatterning across a chromosomal hybrid zone between chromosomal races of *Mus musculus domesticus*. *Genetica*, 114: 35-40.
- Cattanach, B. M. (1978). Crossover suppression in mice heterozygous for tobacco mouse metacentrics. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 20: 264-281.
- Choo, K. H. A. (1998). Why is the centromere so cold?. *Genome Research*, 8: 81-82.

5.5. BIBLIOGRAFÍA

Corti, M., Parmigiani, S., Mainardi, D., Capana, E. & F. Brain. (1989). The role of intermale aggression in speciation processes in chromosomal races of house mice. *En Brain*, P. F., Mainardi, D. & S. Parmigiani (eds.): *House mouse aggression*. Pp. 49-67. Harwood Academic Publishers, London.

Corti, M & F. J. Rohlf (2001). Chromosomal speciation and phenotypic evolution in the house mouse. *Biological Journal of the Linnean Society*, 73: 99-112.

Davis, F. C. & M. Menaker (1981). Development of the mouse circadian pacemaker: independence from environmental cycles. *Journal of Comparative Physiology [A]*, 143: 527-539.

Davisson M. T. & E. C. Akeson (1993). Recombination suppression by heterozygous Robertsonian chromosomes in the mouse. *Genetics*, 133: 649-667.

Díez-Noguera, A., Cambras, T., Ribot, M. & A. Torralba (1989). Hereditary nature of the pattern of the motor activity circadian rhythm in mice. *Physiology and Behavior*, 45: 307-311.

Dumas, D. & J. Britton-Davidian (2002). Chromosomal rearrangements and evolution of recombination: comparison of chiasma distribution patterns in standard and Robertsonian populations of the house mouse. *Genetics*, 162: 1355–1366.

Dyban, A .P. & V. S. Baranov (1987). *Cytogenetics of mammalian embryonic development*. Clarendon Press, Oxford

Eide, E.J., Vielhaber, E.L., Hinz, W.A. & D. M. Virshup (2002). The circadian regulatory proteins BMAL1 and cryptochromes are substrates of casein kinase I epsilon. *Journal of Biological Chemistry*, 277:17248–17254

Eide, E.J. & D. M. Virshup (2001). Casein kinase I: another cog in the circadian clockworks. *Chronobiology International*, 18: 389–398

Eppig, J.T. & E. M. Eicher (1988). Analysis of recombination in the centromere region of mouse chromosome 7 using ovarian teratoma and backcross methods. *Journal of Heredity*, 79: 425–429.

Ford, C. E. (1966). The use of chromosomes markers. *En Micklem H. S. & J. F. Loutit (eds.): Tissue Grafting and radiation*. Pp.197-206. Academic Press, New York.

Ganem, G. & J. B. Searle (1996a). Behavioural discrimination among chromosomal races of the house mouse (*Mus musculus domesticus*). *Journal of Evolutionary Biology*, 9: 817-830.

Ganem, G. & J. B. Searle (1996b). Corticosterone and interchromosomal race discrimination in the house mouse. *Hormones and Behavior*, 30: 69–73.

Gérard, D., Bauchau, V. & S. Smets (1994). Reduced trapability in wild mice, *Mus musculus domesticus*, heterozygous for Robertsonian translocations. *Animal Behaviour*, 47: 877-883.

Griffin, E. A., Jr., Staknis, D. & C. J. Weitz (1999). Light-independent role of CRY1 and CRY2 in the mammalian circadian clock. *Science*, 286: 768-771.

Guo, M., Wu, C. F., Liu, W., Yang, J. Y., and Chen, D. (2004). Sex difference in psychological behavior changes induced by long-term social isolation in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 28: 115-121.

Hare, J. F. (1992). Colony member discrimination by juvenile columbian ground squirrels (*Spermophilus columbianus*). *Ethology*, 92: 301-315.

Hauffe, H. C. & J. B. Searle (1998). Chromosomal heterozygosity and fertility in house mice (*Mus musculus domesticus*) from northern Italy. *Genetics*, 150: 1143-1154.

Honma, S., Kawamoto, T., Takagi, Y., Fujimoto, K., Sato, F., Noshiro, M., Kato Y. & Honma K. (2002). Dec1 and Dec2 are regulators of the mammalian molecular clock. *Nature*, 24: 841-844.

John, B., 1990 *Meiosis*, Pp. 29–102. Cambridge University Press, Cambridge.

King, D. P. & J. S. Takahashi (2000). Molecular genetics of circadian rhythms in mammals. *Annual Reviews of Neuroscience*, 23: 713-742.

King, D. P., Vitaterna, M. H., Chang, A. M., Dove, W. F., Pinto, L. H., Turek, F. W. & Tankahashi, (1997). The mouse clock mutation behaves as an antimorph and maps within the W19H deletion, distal of Kit. *Genetics*, 146: 1049-1060.

Klante, G., Secci, K., Masson-Pévet, M., Vivien-Roels, B., Steinlechner, S. & F. Wollnik (1999). Interstrain differences in activity pattern, pineal function, and SCN melatonin receptor density of rats. *American Journal of Physiology*, 276: R1078-R1086.

Klein, D. C., Moore, R. Y. & S. M. Reppert (1991). *Suprachiasmatic nucleus: the mind's clock*. Oxford University Press, New York.

Krushinskii, L. V, Dyban, A. P., Bananov, V. S., Poletaeva, I. I. & L. G. Romanova (1986). Behavior of mice with Robertsonian translocations of chromosomes (Povedenie myshei s robertsonovskimi translokatsiiami khromosom). *Genetika*, 22: 434-441.

5.5. BIBLIOGRAFÍA

Krushinskii, L. V., Poletaeva, I. I., Romanova, L. G., Dyban, A. P., Bananov, V. S. & N. V. Popova (1978). The perspectives of physiological and genetic investigation of extrapolation ability in mice. *Zhurnal Vysshei Nervnoi Deyatelnosti Imeni i P Pavlova*, 28: 903-912.

Lane, P.W. & E. M. Eicher (1985). Location of plucked (*pk*) on chromosome 18 of the mouse. *Journal of Heredity*, 76: 476–477.

Lassalle, J. M., Médioni, J. & G. Le Pape (1979). A case of behavioural heterosis in mice: quantitative and qualitative aspects of performance in a water-escape task. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 93: 116-123.

Lee, C., Etchegaray, J.P., Cagampang, F.R., Loudon, A.S. & S. M Reppert (2001). Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell*, 107:855–867

Lee, C., Weaver, D.R. & S. M. Reppert (2004) Direct association between mouse PERIOD and CKepsilon is critical for a functioning circadian clock. *Molecular and Cellular Biology*, 24:584–594

Leitinger, B., Poletaeva, I. I., Wolfer, D. P. & H.-P. Lipp (1994). Swimming navigation, open-field activity, and extrapolation behavior of two inbred mouse strains with Robertsonian translocations of chromosomes 8 and 17. *Behavior Genetics*, 24: 273-284.

Lenington, S. (1983). Social preferences for partners carrying 'good genes' in wild house mouse. *Animal Behaviour*, 31: 325-333.

Lloyd, D. & M. Stupfel (1991). The occurrence and functions of ultradian rhythms. *Biological Reviews*, 66: 275-299.

Mackintosh, J. H. (1981). Behaviour of the house mouse. *Symposia of the Zoological Society of London*, 47: 337-365.

Mainardi, D., Parmigiani, S.M Jones, S. E., Brain, P. F., Capanna, E. & M. Corti (1986). Social conflict and chromosomal races of feral house mice: an assessment of combining laboratory and field investigations. Proceedings of the International Meetings on variability and behavioural evolution. *Accademia Nazionale dei Lincei, Quaderno 25*: 111-139.

Mandahl, N. (1992). Methods in solid tumor cytogenetics. *En* Rooney D. E. & B. H. Czepulkowski (eds): *Human cytogenetics. A practical approach. Vol. II*. Pp. 155-187. IRL Press, London.

Mayr, E. (1963). Animal species and evolution. Belknap Press, Cambridge.

- Moore, R. Y. & R. K. Leak (2001). Suprachiasmatic nucleus. *En* Takahashi, J. S., Turek, F. W. & R. Y. Moore (eds): *Circadian Clocks*. Pp. 141–179. Kluwer, New York.
- Pittendrigh, C. S. & S. Daan (1976). A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. *Journal of Comparative Physiology*, 106: 333-355.
- Poirel, C. (1968). Variations temporelles du comportement d'exploration chez la souris. *Cr. Séanc. Biol.*, 162: 2312-2316.
- Preitner, N., Damiola, F., Luis Lopez, M., Zakany, J., Duboule, D., Albrecht, U. & U. Schibler (2002) The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell*, 110:251–260
- Price, J.L., Blau, J., Rothenfluh, A., Abodeely, M., Kloss, B. & M. W. Young (1998). Double-time is a novel *Drosophila* clock gene that regulates PERIOD protein accumulation. *Cell*, 94: 83–95.
- Qumsiyeh, M. B. (1999). Structure and function of the nucleus: anatomy and physiology of chromatin. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 55: 1129-1140.
- Ralph, M. R., Foster, R. G., Davis, F. C. & M. Menaker (1990). Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science*, 247: 975-978.
- Refinetti, R. (2003). Effects of prolonged exposure to darkness on circadian photic responsiveness in the mouse. *Chronobiology International*, 20: 417-440.
- Refinetti, R., Kaufman, C.M., Menaker, M. (1994). Complete suprachiasmatic lesions eliminate circadian rhythmicity of body temperature and locomotor activity in golden hamsters. *Journal of Comparative Physiology [A]*, 175:223-232.
- Reppert, S. M. & D. R. Weaver (2002). Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*, 418: 935-941.
- Ressouche, L., Ganem, G., Derothe, J. M., Searle, J. B., Renaud, F. & C. Moulia (1998). Host chromosomal evolution and parasites of the house mouse *Mus musculus domesticus* in Scotland. *Zeitschrift für Säugetierkunde*, 63: 52-57.
- Rice, W. R. (1989). Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43: 223-225.
- Roeder, G. S. (1990). Chromosome synapsis and genetic recombination: their roles in meiotic chromosome segregation. *Trends in Genetics*, 6: 385-389.

5.5. BIBLIOGRAFÍA

Roussel, B. (1986). Sleep-induced ultradian internal temperature rhythms in rat. *Journal Interdisciplinary Cycle Research*, 17: 153.

Schröder, J. H. & I. -S. Otten (1985). Increase in aggressiveness of male mice carrying a reciprocal translocation, T(10,13), in the heterozygous state. *Behavior Genetics*, 15: 43-51.

Schwartz, W. J & P. Zimmerman (1990). Circadian timekeeping in BALB/c and 57BL/6 inbred mouse strains. *The Journal of Neuroscience*, 10: 3685-3694.

Shearman, L., Zylka, M., Weaver, D., Kolakowski, L. & S. Reppert (1997). Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. *Neuron*, 19: 1261–1269.

Shimomura, K., Low-Zeddies, S. S., King, D. P., Steeves, T. D. L., Whiteley, A., Kushla, J., Zemenides, P. D., Lin, A., Vitaterna, M. H., Churchill, G. A. & J. S. Takahashi (2001). Genome-wide epistatic interaction analysis reveals complex genetic determinants of circadian behavior in mice. *Genome Research*, 11: 959-980.

Sokolove, P.G. & W.N. Bushell (1978). The chi square periodogram: its utility for analysis of circadian rhythms. *Journal of Theoretical Biology*, 72: 131-160.

Stupfel, M., Gourlet, V., Perramon, A., Merat, P., Putet, G. & Court, L. (1995). Comparison of ultradian and circadian oscillations of carbon dioxide production by various endotherms. *American Journal of Physiology*, 268: R253-R265.

Sun, S., Alsbrecht, U., Zhuchenko, O., Bailey, J., Eichele, G. & C. Lee (1997). RIGUI, a putative mammalian ortholog of the *Drosophila period* gene. *Cell*, 90: 1003–1011.

Suzuki, T., Ishikawa, A., Yoshimura, T., Namikawa, T., Abe, H., Honma, S., Honma, K. & S. Ebihara (2001). Quantitative trait locus analysis of abnormal circadian period in CS mice. *Mammalian Genome*, 12: 272-277.

Tei, H., Okamura, H., Shigeyoshi, Y., Fukuhara, C., Ozawa, R., Hirose, M., & Y. Sakaki (1997). Circadian oscillation of a mammalian the homologue of the *Drosophila period* gene. *Nature*, 389: 512–516.

Van Esseveldt, L. K. E., Lehman, M. N. & G. J. Boer (2000). The suprachiasmatic nucleus and the circadian time-keeping system revisited. *Brain Research Reviews*. 33:34–77.

Van Oortmerssen, G. A. (1971). Biological significance, genetics and evolutionary origin and variability in behaviour with and between inbred strains of mice. *Behaviour*, 38: 1-92.

Vitaterna, M.H., King, D. P., Chang, A. M., Kornhauser, J. M., Lowrey, P. L., McDonal, J. D., Dove, W. F., Pinto, L. H., Turek, F. W. & J. S. Takahashi (1994). Mutagenesis and mapping of a mouse gene, *Clock*, essential for circadian behavior. *Science*, 264: 719-725.

Vitaterna, M. H., Selby, C. P., Todo, T., Niwa, H. Thompson, C., Fruechte, E. M., Hitomi, K., Thresher, R. J., Ishikawa, T., Takahashi, J. S. & A. Sancar (1999). Differential regulation of mammalian *period* genes and circadian rhythmicity by *cryptochromes 1* and *2*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 12144-12199.

White, M. J. D. (1975). Chromosome repatterning-regularities and restrictions. *Genetics*, 79 (Suppl.2): 63-72.

Yamamoto, M. & G. L. G. Miklos, (1978). Genetic studies on heterochromatin in *Drosophila melanogaster* and their implications for the functions of satellite DNA. *Chromosoma*, 66: 71–98.

Zickler, D. & N. Kleckner (1998). Leptotene-zygotene transition of meiosis. *Annual Review of Genetics*, 32: 619-697.

Zickler, D. & N. Kleckner (1999). Meiotic chromosomes: integrating structure and function. *Annual Review of Genetics*, 33: 603-754.

Zylka, M. J., Shearman, L. P., Levine, J. D., Jin, X. , Weaver, D. R. & S. M. Reppert (1998). Molecular Analysis of Mammalian *Timeless*. *Neuron*, 21: 1115-1122

