

El ayuno en ratones: una revisión

Versión española del artículo original:

Fasting of mice: a review

TL Jensen¹, MK Kiersgaard¹, DB Sørensen² and LF Mikkelsen³

Laboratory Animals 2013, Vol. 47(4) 225–240

DOI: 10.1177/0023677213501659

Laboratory Animals

THE INTERNATIONAL JOURNAL OF
LABORATORY ANIMAL SCIENCE, MEDICINE,
TECHNOLOGY AND WELFARE

Official Journal of AFSTAL, DALAS, ECLAM, ESLAV, FELASA
GV-SOLAS, ILAF, LASA, SECAL, SGV, SPCAL



journals.sagepub.com/home/lan

Published on behalf of Laboratory Animals Ltd.
by SAGE Publications Ltd



Este artículo ha sido traducido por: Gloria Martínez García
Revisado por: José Luís Martín Barrasa DVM PhD
Coordinación: Jesús Martínez Palacio

Nuestro agradecimiento al Consejo de Dirección de Laboratory Animals Limited y a SECAL por el patrocinio y colaboración en esta traducción.

El ayuno en ratones: una revisión

TL Jensen¹, MK Kiersgaard¹, DB Sørensen² and LF Mikkelsen³

Laboratory Animals
47(4) 225240
© The Author(s) 2013
Reprints and permissions:
sagepub.co.uk/
journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/0023677213501659
la.sagepub.com



Resumen

El ayuno de ratones es un procedimiento común realizado conjuntamente con muchos tipos diferentes de experimentos, principalmente para reducir la variabilidad en los parámetros de investigación o para facilitar los procedimientos quirúrgicos. Sin embargo, a menudo se ignoran los efectos del ayuno que no están directamente relacionados con los parámetros de investigación. El objetivo de esta revisión es presentar y resumir el conocimiento sobre los efectos del ayuno de los ratones para facilitar la optimización del procedimiento de ayuno para cualquier estudio y así maximizar el resultado científico y minimizar el malestar de los ratones y, por lo tanto, garantizar un alto bienestar animal. Los resultados presentados pertenecen a una serie de estudios experimentales que proporcionan evidencia de cambios inducidos por el ayuno en el equilibrio hormonal, el peso corporal, el metabolismo, las enzimas hepáticas, los parámetros cardiovasculares, la temperatura corporal y las respuestas toxicológicas. Se proporciona una descripción del comportamiento normal relevante y los parámetros fisiológicos estándar, concluyendo que los ratones son principalmente nocturnos y consumen dos tercios de su ingesta total de alimentos durante la noche. Se argumenta que el ayuno nocturno de ratones no es comparable con el ayuno nocturno en humanos porque el ratón tiene un ritmo cardíaco nocturno y una tasa metabólica más alta. Se sugiere que debido a que muchos parámetros fisiológicos están regulados por ritmos circadianos, el ayuno iniciado en diferentes puntos del ritmo circadiano tiene diferentes impactos y produce diferentes resultados.

Palabras clave

Ayuno, ratones, perfeccionamiento, nutrición, letargo

El ayuno de los ratones se considera un procedimiento estándar utilizado en conjunto con muchos tipos diferentes de experimentos. El ayuno se usa principalmente como una forma de estandarizar las pruebas o antes de la cirugía.

Las motivaciones para el ayuno de ratones incluyen: ayuno nocturno antes de medir la glucosa en sangre para reducir la variabilidad en la glucosa en sangre basal, para asegurar una absorción más uniforme del medicamento al evitar mezclar el medicamento de prueba con los alimentos; ayuno nocturno para pruebas de toxicología; ayuno inducido para investigar compuestos oxigenados, en cuyo caso los ratones generalmente están en ayunas durante 4 horas hasta la noche; y estudios farmacocinéticos en general.

En esta revisión, el término "ayuno" se refiere a un estado en el que el animal está completamente privado de alimentos pero tiene acceso al agua, que es similar a los diseños de estudio de la mayoría de las referencias. Con el fin de facilitar la comparación de datos cuantitativos, los

valores se dan en unidades internacionales y se han convertido donde sea necesario.

El objetivo de esta revisión es resumir el conocimiento actual sobre los efectos de los ratones en ayunas para facilitar una optimización del procedimiento de ayuno y, por lo tanto, asegurar mejores datos científicos, minimizar la incomodidad de los animales y, por lo tanto, aumentar el bienestar animal.

Fisiología de los ratones sin ayuno

Ingesta de alimentos y agua

Los ritmos circadianos regulan muchos aspectos de la fisiología del cuerpo, incluidos los sistemas celulares y fisiológicos, como los ritmos de secreción hormonal, la temperatura corporal, el metabolismo de la energía hepática y los ciclos de sueño-vigilia. Los ritmos circadianos son estimulados principalmente por el núcleo supraquiasmático (SCN) del hipotálamo anterior en

mamíferos. Los estímulos externos, como la luz y la oscuridad, influyen en los ritmos circadianos. La luz es el estímulo más potente, arrastrando el SCN a través del tracto retinohipotalámico. Se ha demostrado que en ratas la ingesta de alimentos y el patrón de alimentación se alteran si se lesiona el SCN.

El patrón de sueño-vigilia de los ratones tiene un patrón nocturno característico; los ratones duermen más durante la fotofase (período de luz) que durante la escotofase (período oscuro).

La ingesta de alimentos y el metabolismo están estrechamente asociados con la función del sistema hipotálamo-hipófisis-suprarrenal (HPA). La actividad del HPA es normalmente de baja amplitud al comienzo de la fotofase y de alta amplitud al comienzo de la escotofase, que corresponde con el alto nivel de actividad del ratón en la escotofase y el bajo nivel de actividad en la fotofase.

Los ratones consumen más alimentos y agua durante la escotofase que durante la fotofase (Tabla 1), de acuerdo con el patrón nocturno. Aproximadamente dos tercios de la ingesta total de alimentos y agua se consumen durante la escotofase, y un tercio durante la fotofase. Petersen informó de que la tasa de alimentación aumenta cinco veces al anochecer. Incluso cuando

se mantiene bajo condiciones de luz continua, se sabe que los ratones tienen un patrón de alimentación circadiano. El ritmo circadiano de la concentración de glucosa, la fuente de energía más importante, se caracteriza por un aumento desde el comienzo de la fotofase hasta un pico en el medio de la fotofase, que disminuye al comienzo de la escotofase, y luego permanecer en un nivel base durante la escotofase o con un pico más bajo antes del amanecer (Tabla 2).

Se observó un aumento significativo ($P < 0.05$) en la glucosa en sangre a las 13.00 h, en comparación con las 08.00, 20.00 y 01.00h (fotofase 08.00-20.00h). Esto se corresponde con el ritmo descrito anteriormente. Los ratones albinos machos muestreados a las 01.00 h muestran una tolerancia significativamente ($P < 0.01$) mayor a la glucosa que los ratones muestreados a las 08.00, 13.00 y 20.00 h. Estos resultados sugieren que la absorción de glucosa es más rápida en la escotofase que en la fotofase. Del mismo modo, los ratones muestran un ritmo circadiano con respecto a su peso corporal, que aumenta durante la escotofase y disminuye durante la fotofase.

Se han encontrado desviaciones de estos ritmos diurnos en el comportamiento alimentario y las fluctuaciones de glucosa, aunque Petersen demostró una caída significativa ($P < 0.01$) de glucosa en sangre al anochecer, y se ha encontrado un ritmo circadiano con un pico de glucosa en sangre dos horas antes de la fotofase y un pico más bajo dos horas antes de la escotofase (doce horas de luz, doce horas de oscuridad). Ahren no encontró evidencia de un ritmo circadiano de glucosa en plasma en ratones NMRI machos y hembras. Además, se mostró un ritmo diurno en un estudio en el que los ratones habían reducido la ingesta de alimentos durante la escotofase. Otro estudio demostró una mayor actividad de alimentación durante un cierto intervalo de tiempo en la fotofase, argumentando que esto podría deberse a alteraciones de los ratones en el mismo intervalo de tiempo.

Tabla 1. Ingesta de comida y agua en ratones

	Fotofase (07.00-19.00 h)	Escotofase (19.00-07.00 h)
Comida (g)	0.95±0.19	2.97±0.45
Agua (g)	0.99±0.32	3.52±0.49

Ingesta total de alimentos y agua (media ± SD) en ocho ratones C57BL/6J macho de 12 semanas de edad durante la fotofase (fase de luz) y la escotofase (fase oscura). Alimento: dieta en polvo CE-2. Los datos son de Kurokawa et al. (2000).

Tabla 2. Concentración de glucosa en ratones sin ayuno

Referencia	Cepa/género	n	Edad/Peso	Concentración de glucosa	Tiempo de medida
Tsuneki et al. 2002 ⁷⁸	ddY/macho (solución salina inyectada)	6	8-10 semanas	9.6 ±0.5 (mmol/L±SE)	10.00*
Oosterveer et al. 2008 ⁴⁶	Sv129/OlaHsd C57BL/6 J/macho	46		8.8 ±0.3 (mmol/L±SE)	08.00 Fotofase 07.00-19.00
Echavell & Epeledev, 1972 ²⁸	C3H-S/macho	59	84 días	6.05 (mmol/L)	Media de 24h
Gagliardino & Hernández, 1971 ²⁶	C3H-S/hembra	240	10 semanas	8.3 (mmol/L)	Media de 24h
Nowell 1970 ²⁴	Albino/macho	9	30 g	6.3±0.2 (mmol/L±SE)	08.00 Fotofase 08.00-20.00
Mühlbauer et al. 2009 ²⁵	tipo salvaje MeLAABB/macho	104		8.75 ±0.14 (mmol/L±SE)	Media de 24h

SE: error estándar, *12h de luz y 12h de oscuridad, pero la información sobre el tiempo no está disponible.

Esto puede ser también una posible explicación de los resultados de Bailey *et al.* En un estudio con ocho ratones, se demostró que los momentos de alimentación y bebida estaban sincronizados, pero que los ratones bebían con poca frecuencia sin comer. Kurokawa *et al.* no proporcionaron datos sobre el tiempo medio de comida, el tiempo medio de bebida, el tiempo medio de intervalo entre comidas o el intervalo medio entre el tiempo de bebida. Otro estudio encontró que los ratones tenían un promedio de 36 periodos de comida y 32 periodos de bebida durante un día y una noche, durando cada periodo aproximadamente 3.00min y 0.88min, respectivamente. El intervalo promedio entre periodos de comida fue de 34 minutos y entre periodos de bebida fue de 42 minutos. El consumo de agua, en general, se produjo dentro de los 5 minutos posteriores al consumo de comida. Los patrones de comidas se analizaron durante siete días en un estudio donde los ratones estuvieron en ayunas durante 5 horas en la fotofase y alimentados *ad libitum* durante las 19 horas restantes. El número promedio de comidas por día y noche fue de aproximadamente 20, con una duración de aproximadamente 5 minutos y con un intervalo entre comidas de aproximadamente 40 minutos. Los diferentes resultados en los estudios mencionados anteriormente pueden deberse a las diferencias en el diseño experimental, con respecto a la cepa y la edad de los ratones, la dieta, el alojamiento y el método de medición. Gannon *et al.* no proporcionaron información sobre el tipo de lecho y la temperatura ambiente. Kurokawa *et al.* no informaron del tipo de alimento, aunque se ha demostrado que afecta a los patrones de alimentación.

Los ratones alimentados *ad libitum* mantenidos a termoneutralidad a 33 °C comieron aproximadamente un 50% menos que los ratones mantenidos a 23 °C. En un estudio realizado por Bronson, los ratones alojados a 11 °C tenían una ingesta de alimentos 37% mayor en comparación con los ratones alojados a 22 °C. Los ratones alojados a 11 °C tenían nidos de algodón con una temperatura interna de 18 °C y, por lo tanto, solo estaban expuestos al frío cuando se

alimentaban. De manera similar, Overton y Williams informaron de una reducción en la ingesta de alimentos cuando la temperatura ambiente aumentó de 23 °C a 30 °C. Los ratones alojados a 20 °C tuvieron una ingesta de alimentos significativamente mayor que los ratones alojados a 25 °C, lo que demuestra que una diferencia de 5° en la temperatura ambiente puede causar una variación significativa en la ingesta de alimentos.

Bachmanov *et al.* midieron la ingesta de alimentos y agua de 323 ratones machos de 28 cepas endogámicas, incluidos C57BL / 6J y BALB / cByJ. (Tabla 3). Se encontraron diferencias significativas entre cepas en cuanto a la ingesta de comida y agua, con una diferencia de al menos el doble entre las cepas con los valores más altos y más bajos.

El contenido gástrico en ratones alimentados *ad libitum* muestra un ritmo circadiano, siendo el más alto en el medio de la escotofase y el más bajo hacia el final de la fotofase, que es analizado utilizando mediciones cada cuatro horas. El contenido gástrico fue similar para animales con y sin lecho.

En conclusión, la ingesta de alimentos y agua en ratones parece seguir un patrón de comidas pequeñas y frecuentes asociadas con la bebida. La ingesta de alimentos depende de la temperatura y la cepa, y dos tercios de los alimentos se consumen durante la fase oscura.

Hormonas

La corticosterona suprarrenal se produce cuando la glándula suprarrenal es estimulada por la hormona adrenocorticotrópica. Varios estudios muestran que el nivel de corticosterona sérica alcanza su punto máximo cerca de la transición de la fotofase a la escotofase, seguido de una disminución gradual durante la escotofase, y permanece en el nivel base durante la fotofase hasta la transición a la escotofase. El pico más bajo está cerca de la transición de la escotofase a la fotofase. Existen diferencias significativas en los niveles de corticosterona durante veinticuatro horas. La corticosterona dirige el nivel de actividad del ratón,

Table 3. Media de ingesta de comida y agua de ratones

	Media general de la cepa (media ± SE)	Media de cepa más baja- Media de cepa más alta (media ± SE)
Ingesta de comida diaria - sin alterar (g/Ratón)	4.4 ±0.1	3.1±0.1 6.3 ±0.3
Ingesta de comida diaria - alterada (g/30g peso corporal)	5.7 ±0.2	4.3±1.1 8.8 ±0.2
Ingesta de agua diaria - sin alterar (mL/ratón)	5.8 ±0.2	3.9±0.2 8.2 ±0.3
Ingesta de agua diaria - alterada (mL/30g peso corporal)	7.7 ±0.3	5.7±0.2 11.4 ±0.5

Ingesta media de comida y agua en 28 cepas endogámicas de ratones. Alimento: granulado Teklad Rodent Diet 8604. Temperatura ambiente: 23 °C. SE: erros estándar. Datos de Bachmov et al. (2002).

La corticosterona dirige el nivel de actividad del ratón, aumentando a medida que aumenta el nivel de actividad en la escotofase y disminuyendo a medida que el nivel de actividad disminuye en la fotofase.

La ingesta de alimentos estimula la liberación pancreática de insulina. En un estudio de Ahrén, la insulina plasmática mostró una variación diurna con un pico nocturno en ratones NMRI, y el nivel de insulina plasmática alcanzó un pico significativamente más alto en los machos que en las hembras, pero no hubo diferencias entre los géneros con respecto al aumento relativo. Otros investigadores han encontrado un ritmo circadiano caracterizado por un pico de insulina (6ng/mL) en o justo antes de la transición de la fotofase a la escotofase. El nivel de insulina en aproximadamente una hora en la fotofase es de 1.59ng/mL.

La hormona grelina se produce principalmente en el estómago y regula la actividad alimentaria, se eleva durante el ayuno y se suprime después de la ingesta de alimentos. La ingesta de alimentos se estimula mediante la activación de neuronas neuropéptidas Y-érgicas en el hipotálamo. Entre otras hormonas que regulan el metabolismo se incluyen la adrenalina, la noradrenalina, el glucagón, la hormona del crecimiento, las hormonas tiroideas, la leptina y la resistina.

Temperatura corporal

La temperatura corporal de los ratones sigue un ritmo circadiano, con una temperatura corporal máxima al comienzo de la escotofase y la temperatura corporal más baja a la mitad de la fotofase. Se ha demostrado que la temperatura media durante veinticuatro horas es de aproximadamente 37.7 °C, la media horaria más baja 36.7 °C y el rango de medias por hora 1.9 °C. En correspondencia con estos resultados, Swoap informó de una temperatura corporal media fotofásica de 36.7 °C y una temperatura corporal media de escotofase de 37.8 °C. Como en otras especies de mamíferos, la temperatura es más alta en el período de actividad y más baja en el período de descanso.

El ayuno en ratones: cambios fisiológicos

Sin ingesta de comida; y agua

Los ratones alojados en suelos compactos tienen la oportunidad de consumir heces (coprofagia) durante los períodos de ayuno, así como camas, enriquecimiento ambiental, palos para morder y material de anidación si se proporciona. Los ratones generalmente tienen acceso al agua *ad libitum* durante el ayuno, pero como se describió anteriormente la ingesta de agua está relacionada con la ingesta de alimentos, el ayuno también influye en la ingesta

de agua.

En un estudio realizado por Kutscher, los ratones en ayunas durante un periodo de hasta cinco días (no pudieron sobrevivir más tiempo) mostraron diferentes patrones de bebida: polidipsia constante, polidipsia esporádica o polidipsia restringida al comienzo o al final del ayuno. En total el 35% tenía polidipsia y el 42% había disminuido la actividad de beber (en comparación con su consumo medido mientras no estaban en ayunas). Cinco de los ratones polidipsicos mostraron este patrón en el día 1. Tanto los ratones polidipsicos como los no polidipsicos mantuvieron su patrón de consumo nocturno durante tres días de ayuno, excepto que los ratones no polidipsicos parecieron tener un patrón de consumo alterado después de tres días de ayuno.

Algunas cepas de ratones consanguíneos muestran polidipsia durante el ayuno, mientras que otras cepas muestran hipodipsia. En un estudio en el que se midió el ritmo circadiano de la ingesta de agua durante el ayuno, los ratones en ayunas mostraron un pronunciado ritmo circadiano en su ingesta de agua. Williams notificó una reducción significativa ($P < 0.05$) de la ingesta de agua en ratones en ayunas de 24 y 48h.

Hormonas

Entre otros, se sabe que la hormona corticosterona responde al estrés y, por lo tanto, es relevante cuando se exploran los efectos del ayuno. El estrés se ha definido como una respuesta de un organismo a estímulos o cambios externos. Se caracteriza por la activación del sistema nervioso autónomo y el eje HPA y, por lo tanto, un aumento de los glucocorticoides, como la corticosterona.

El ayuno también estimula el sistema nervioso simpático. En ratas se demostró que el aumento en el volumen de noradrenalina causó una actividad simpática elevada, lo que resultó en la liberación de ácidos grasos.

Los ratones de la cepa C57BL/6J, en ayunas durante 2, 4, 6 y 12 horas tuvieron niveles de corticosterona significativamente más bajos ($P < 0.05$) que los ratones en ayunas durante 16 horas (durante la noche). El nivel más alto se alcanzó después de 16 horas de ayuno, 477 nmol/L para los machos y 1251 nmol/L para las hembras. Los ratones machos, en ayunas durante 24 horas, tuvieron un aumento significativo ($P < 0.05$) en la corticosterona, alcanzando 612.68 nmol/L; y el ayuno de ratones machos durante 48 horas, resultó en un aumento significativo ($P < 0.05$) de corticosterona, alcanzando 982.6 nmol/L.

En comparación, los ratones de la cepa BALB/c (sexo no indicado), estresados al nadar hasta estar exhaustos,

tuvieron un aumento significativo ($P < 0.05$) en la corticosterona sérica durante todo el ritmo circadiano en comparación con el grupo de control. La concentración más alta medida fue aproximadamente 1445 nmol/L. Los ratones machos suizos expuestos a una jaula que contenía una rata (un depredador) tenían niveles de corticosterona en plasma significativamente mayores ($P < 0.05$) después de 5 minutos de exposición, que los ratones expuestos a una jaula vacía. El nivel plasmático de corticosterona alcanzó 404.6 nmol/L después de 15 minutos.

Los niveles de corticosterona son complejos de comparar, ya que hay diferencias de sexo, como muestran Champy *et al.*, y puede haber diferencias de cepa.

La leptina es una hormona secretada por el tejido adiposo en proporción a las reservas de almacenamiento de grasa, regulando el equilibrio energético de todo el cuerpo. Los ratones en ayunas durante 2, 4 y 6 horas tuvieron un nivel de leptina significativamente más alto ($P < 0.05$) que los ratones en ayunas durante 16 horas. No hubo diferencias significativas entre las 12 y las 16 horas de ayuno. Los ratones en ayunas durante 24 horas tuvieron un nivel de leptina en suero significativamente más bajo que los ratones sin ayuno. Esto indica que se puede alcanzar un nivel de leptina estable y bajo después de 6-12 horas de ayuno.

El neuropéptido Y (NPY) está sub-regulado como resultado del aumento del tejido adiposo y la secreción de leptina. NPY es estimulante del apetito. Los ratones en ayunas durante 48 horas tuvieron un aumento significativo ($P < 0.05$) en NPY, correspondiente a la bajada de nivel de la leptina, disminuyendo la sub-regulación de NPY.

La grelina se eleva en respuesta al ayuno y al hambre. La alta

producción de grelina durante el ayuno podría estar asociada con un aumento en el glucagón. La grelina estimula el comportamiento de alimentación a través del sistema nervioso y es antagonista de la leptina. La expresión del gen de la grelina en el estómago de los ratones aumentó en 48 horas de ayuno.

La resistina es, como la leptina, una hormona secretada por los adipocitos. La resistina aumenta con la alimentación rica en grasas y provoca una disminución de la sensibilidad a los efectos de la insulina. Se reduce en 48 horas de ayuno.

Se considera que una caída de insulina impulsa la adaptación metabólica al ayuno. No hubo diferencias significativas en los niveles de insulina en plasma entre los ratones en ayunas durante 16 horas y los ratones en ayunas durante 4 horas. Cuando se midió en condiciones hiperglucémicas, los ratones en ayunas de 16 horas tuvieron un nivel de insulina en plasma significativamente menor ($P < 0.01$), lo que sugiere un aumento de la eliminación de insulina. El índice de sensibilidad a la insulina de todo el cuerpo fue significativamente ($P < 0.01$) más alto en ratones en ayunas de 16 horas que en ratones en ayunas de 4 horas. En otro estudio, hubo un nivel de insulina más bajo ($P < 0.05$) después de 16 horas de ayuno en comparación con 2, 4 y 6, pero no 12 horas de ayuno. Los ratones en ayunas durante 18 horas tuvieron un nivel de insulina significativamente menor ($P < 0.05$) que los ratones en ayunas durante 5 horas. Los ratones en ayunas durante 24 horas tuvieron niveles de insulina significativamente menores ($P \leq 0.001$) que los que no estaban en ayunas.

La tiroxina (T4) y la triyodotironina (T3) son reguladores de la tasa metabólica basal. Ambas disminuyeron

Tabla 4: Pérdida de peso relativa en ratones

Referencia	Raza/género	n	Edad/Peso	Duración ayuno (h)	Pérdida de peso (%)
Prior et al. 2009	CD-1/macho	8	35-51g	3	0 '
Ayala et al. 2006	C57BL/6J/macho	6	9 semanas	5	5 '
Prior et al. 2009	CD-1/ macho	8	35-51g	6	6 '
Sokolović et al. 2007	FVB/ macho	8	6 semanas	12	12*
Ayala et al. 2006	C57BL/6J/macho	6	9 semanas	18	16 '
Prior et al. 2009	CD-1/macho	8	35-52g	18	14 '
Warwick et al. 1985	Albino	7	15-18g	18	17*
Furner & Feller 1971	Swiss/macho	20	39.3g (media)	24	11*
Strubelt et al. 1981	-/macho	20	25-32g	24	20 '
Kanizsai et al. 2009	NMRI/macho	20	25-32g	24	20 '
Kanizsai et al. 2009	C57BL/6/-	-	-	48	21 '
Furner & Feller 1971	-/macho	16	39.3g (media)	48	21*
Furner & Feller 1971	-/macho	17	39.3g (media)	72	23*
Sokolovic et al. 2007	FVB/macho	8	6 semanas	72	30*

* Diferencia significativa con ratones sin ayuno. ' Sin datos sobre su importancia.

significativamente ($P < 0.05$) después de 24 horas de ayuno y después de 16 horas de ayuno en comparación con 2 horas de ayuno. También disminuyó significativamente ($P < 0.05$) después de 48 horas de ayuno, pero no hubo cambios significativos en la estimulación de la hormona tiroidea. Una reducción de T3 en relación con el ayuno puede contribuir a conservar la energía porque T3 estimula la descomposición de carbohidratos, proteínas y lípidos.

La testosterona disminuyó significativamente ($P < 0.05$) después de 24 horas y 48 horas de ayuno, y después de 16 horas de ayuno en comparación con 4 horas. El peso de los testículos no se vio afectado por el ayuno.

En resumen, la corticosterona, NPY, grelina y resistina aumentan y T4, T3, testosterona, insulina y leptina disminuyen en respuesta al ayuno.

Pérdida de peso

Varios autores informan diferencias en la pérdida de peso de los ratones tras diferentes duraciones del ayuno (Tabla 4). Los ratones experimentan una pérdida de peso significativa después de 12 horas de ayuno, 18 horas de ayuno, 24 horas de ayuno, así como después de 48 y 72 horas de ayuno.

Los ratones perdieron significativamente más peso después de 16 horas de ayuno en comparación con 4 horas, y se informó una pérdida de peso significativamente mayor ($P < 0.05$) después de 18 horas de ayuno en comparación con 5 horas de ayuno, 16% y 5%, respectivamente. Sokolović *et al.* descubrieron que después de 12 horas de ayuno, la pérdida de peso era constante a una tasa de aproximadamente 7% por día, en base a un total de 72 horas

de grabaciones.

Los ratones se usan habitualmente para experimentos a una edad relativamente joven, y normalmente aumentarían de peso a través del crecimiento natural, por lo que la pérdida de peso relativa es más grave si se ha corregido para un determinado aumento de peso, dependiendo de la duración del ayuno.

El peso del tracto gastrointestinal de los ratones en ayunas durante 18 horas fue significativamente más bajo ($P < 0.05$) que en los ratones sin ayunas, pero no hubo diferencias en el peso cerebral.

En este caso, el 40% de la pérdida de peso se debió a la reducción gastrointestinal y el 60% a la aparente pérdida de masa corporal. El peso del hígado, los riñones y el corazón también se redujo significativamente. De acuerdo con esto, el peso del hígado se redujo significativamente ($P < 0.05$) en un 31% en ratones en ayunas de 24 horas, así como después de 48 horas (33%) y 72 horas (32%) de ayuno, en comparación con los ratones sin ayuno. No se observó ningún cambio en el contenido del agua hepática o la proporción de hígado a peso corporal después de 24 horas. La proporción de: peso hepático / 100 gramos peso corporal, disminuyó significativamente ($P < 0.05$) en 24 y 48 horas de ratones en ayunas, pero no después de 72 horas de ayuno.

Los depósitos de grasa disminuyeron drásticamente después de 28 horas de ayuno, de forma poco distinta a la disminución en ratones muertos por inanición.

Vaciado gastrointestinal

Es posible que en algunos estudios, incluida la cirugía o la investigación de la absorción oral/gastrointestinal, se requiera que el estómago, el intestino delgado y/o el

Tabla 5. Concentración de glucosa en ratones en ayunas

Referencia	Raza/género	n	Edad/Peso	Duración del ayuno (h)	Concentración de glucosa (mmol/L $\pm$ SE)	Momento de medida
Oosterveer et al. 2008	Sv129/OlaHsd C57BL/6J/macho	4-6	-	9	5.2 $\pm$ 0.3	08.00 Fotofase: 07.00-19.00 09.00*
Heijboer et al. 2005	C57BL/6/ macho	..	912-16 semanas	24 4 16	3.5 $\pm$ 0.4 5.9 $\pm$ 0.7 4.9 $\pm$ 0.9	
Pessacq et al. 1976	C3H-S/ hembra	12	8 semanas	29+cama 29/cama	5.8 $\pm$ 0.2 7.2 $\pm$ 0.2	Media de 24h
Tsuneki et al. 2002	ddY/macho (solución salina inyectada)	6	8-10 semanas	6 10-14 16-20	6.6 $\pm$ 0.3 4.7 $\pm$ 0.2 3.9 $\pm$ 0.0	10.00* 10.00* 16.00*
Nowell 1970	Albino/macho	9	30 g	24	3.4 $\pm$ 0.4	08.00-09.00 Fotofase: 08.00-20.00

SE: Error Estándar. *12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, pero no hay información disponible sobre el tiempo con luz y el tiempo a oscuras.

intestino grueso estén vacíos. En un estudio de Prior et al., los ratones estuvieron en ayunas durante 0, 3, 6 y 18 horas. No hubo diferencia significativa en el peso del contenido gástrico entre 6 y 18 horas en ayunas, y no hubo diferencia entre 0 y 3 horas en ayunas, pero hubo un aumento significativo entre 0 o 3 horas, en comparación con 6 o 18 horas. Se observó el mismo patrón para el tiempo de tránsito intestinal del carbón vegetal. Se concluyó que el ayuno durante 6 horas dio resultados similares al ayuno durante 18 horas con respecto al vaciado gástrico y al tiempo de tránsito intestinal del carbón vegetal.

Otro autor mostró que los ratones en ayunas durante 4 y 8 horas, con el inicio del ayuno desde 4 horas antes de la fotofase, tenían contenidos gástricos significativamente más bajos que los ratones sin ayuno. Curiosamente, los ratones en ayunas durante 12 horas, informados en el estudio como un vaciado completo del estómago, no tenían un contenido significativamente menor que los ratones sin ayuno. Los ratones sin ayuno tuvieron una disminución espontánea en su actividad de alimentación, lo que resultó en un bajo contenido gástrico en un punto que coincidía con los ratones en ayunas durante 12 horas, y por lo tanto no se observó una diferencia significativa después de 12 horas de ayuno. Bronson informó de que la mayoría de los alimentos consumidos durante la escotofase son eliminados del estómago dentro de las 6 horas de ayuno de la fotofase, y que después de 14 horas de ayuno en la fotofase, el intestino delgado estaba esencialmente vacío.

Durante tres días de ayuno, los ratones excretaron bolos de su material de cama, esterolit (un material de arcilla granular), con un peso medio de 1,8, 1,1 y 0,5 gramos, respectivamente, durante los primeros tres días de ayuno, lo que indica que existe una ingesta de material de lecho. Yeung *et al.* descubrieron que los ratones en ayunas durante 24 horas en un suelo enrejado tenían un contenido gástrico significativamente menor ($P < 0.01$) que los ratones mantenidos en un suelo sólido de polipropileno, lo que indica coprofagia.

El contenido gástrico residual medio después de 18 horas de ayuno fue de 0.076 g.

El ayuno durante 29 horas resultó en un contenido gástrico significativamente menor en comparación con los ratones sin ayuno. El contenido gástrico de los ratones en ayunas mostró un ritmo circadiano similar al de los animales sin ayuno. Los ratones que tenían lechos tenían un descenso medio del 72% en el contenido gástrico, mientras que los ratones sin lechos solo tenían un descenso del 50%. Se enfatizó que la variación relativa era idéntica en ambas circunstancias de ayuno, pero no se explicó la diferencia en

la disminución total del contenido gástrico medio. El contenido gástrico de los ratones en ayunas por 29 horas podrían ser secreciones del estómago.

El vaciado gástrico después de la administración de una solución oral simple fue más rápido en ratones en ayunas por 24 horas que en ratones sin ayuno, aunque no se proporcionó información sobre su significado. El tiempo de vaciado gástrico está asociado con el volumen del estómago y el tamaño corporal.

En conclusión, el contenido gástrico de los ratones sigue un ritmo circadiano asociado con la ingesta de alimentos. Los períodos más cortos de ayuno no conducen necesariamente a un menor contenido gástrico que el que experimentarían los ratones sin ayuno en ciertos puntos del ritmo circadiano. Después de 29 horas de ayuno, aun se puede encontrar alguna forma de contenido gástrico.

Metabolismo

La glucosa en sangre disminuye durante el ayuno debido a la falta de ingesta de alimentos y, por lo tanto, a la falta de glucosa absorbida por los intestinos.

Los ratones en ayunas durante 9 horas tuvieron una glucosa en sangre significativamente ($P < 0.05$) más baja que los ratones sin ayuno y una disminución significativa adicional ($P < 0.05$) de 9 a 24 horas de ayuno. Los ratones en ayunas durante 16 horas tuvieron una concentración de glucosa en plasma significativamente más baja ($P < 0.05$) que los ratones en ayunas durante 4 horas. Los ratones en ayunas durante 48 horas sufrieron una disminución del 50% en los niveles de glucosa en plasma. No hubo una disminución adicional después de 72 horas. El ayuno durante 29 horas (con o sin ropa de cama) causó una disminución significativa ($P < 0.001$) de glucosa en sangre, siendo esta inferior al 26% en ratones con cama y un 6% más bajo para los ratones sin ropa de cama. Una posible explicación para esto sería suponer que la extracción de una jaula a otra y/o la ausencia de ropa de cama puede causar un aumento en el nivel de glucosa en la sangre.

En ratones que recibieron inyecciones de solución salina cada dos horas durante 6 horas de ayuno, se observó una disminución gradual de aproximadamente el 40% en la glucosa en sangre. La disminución durante 6 horas de ayuno, precedida por 10 a 14 horas de ayuno, fue de 12 a 17%. Esto ilustra que los ratones tuvieron una disminución más rápida en las primeras 6 horas de ayuno que 6 horas después de haber estado en ayunas durante 16 a 20 horas (Tabla 5). Se encuentra una variabilidad significativa ($P < 0.01$) entre diferentes cepas de ratones con respecto a la

glucosa sanguínea media en ratones en ayunas durante 4 a 6 horas. Cuando se midió el nivel de glucosa en suero en ratones en ayunas por 29 horas cada cuatro horas durante 24 horas, se pudo observar un ritmo circadiano, de la misma magnitud y forma que en los controles. La producción de glucosa hepática no fue significativamente diferente de 4 a 16 horas de ayuno.

La absorción de glucosa específica del músculo bajo condiciones hiperinsulinémicas fue significativamente ($P < 0.01$) mayor en ratones en ayunas durante 16 horas que en ratones en ayunas durante 4 horas. Esto indica que la sensibilidad a la insulina muscular aumenta con el ayuno.

La glucosa se puede almacenar como glucógeno en el hígado, los riñones, el corazón y los músculos. Esta reserva se moviliza por glucogenólisis durante la etapa temprana del ayuno para mantener la concentración de glucosa en sangre. En ratones, el glucógeno hepático es significativamente ($P < 0.05$) más bajo después de 18 horas de ayuno que después de 5 horas de ayuno. Disminuye significativamente ($P < 0.05$) después de 24 horas de ayuno, siendo solo el 7% de su concentración original. Después de 48 horas y 72 horas de ayuno se reduce en gran medida.

No hubo un cambio significativo ($P < 0.05$) en el contenido de glucógeno del músculo gastrocnemio después de 18 horas de ayuno en comparación con 5 horas de ayuno. En ratones en ayunas por 24 horas, el glucógeno muscular se redujo aproximadamente a la mitad del nivel presente en ratones sin ayuno. Los depósitos de glucógeno de los músculos no están previstos para mantener la glucosa en sangre, sino para la contracción muscular.

El ayuno prolongado induce un aumento en el glucagón en plasma, glucocorticoides en plasma, epinefrina en plasma (nor) y una disminución en las concentraciones de insulina en plasma. Esto conduce a la hidrólisis de triglicéridos (TRIG) en el tejido adiposo, lo que provoca un aumento en la concentración de ácidos grasos libres en el plasma (FFA). En ratones en ayunas durante 18 horas hubo una pérdida de masa grasa significativamente mayor ($P < 0.05$) en comparación con los ratones en ayunas durante 5 horas. Existen diferencias de tensión en relación con los niveles de FFA en plasma durante el ayuno: los ratones BALB / c tuvieron un aumento significativo ($P < 0.05$) en FFA en plasma después de 6 horas de ayuno, y un aumento significativo adicional después de 14 horas de ayuno. Los ratones C57BL y SWR no presentaron diferencias significativas después de las 6 horas de ayunas, pero sí después de 14 horas. No hubo diferencias en las concentraciones plasmáticas de FFA en los ratones en

ayunas durante 16 horas en comparación con los ratones en ayunas durante 4 horas. Después de un ayuno de 24 horas, la concentración de FFA en plasma fue significativamente mayor en los ratones en ayunas que en los que no lo estaban. Después de 48 horas de ayuno, hubo un aumento de casi el doble en el FFA plasmático, y después de 72 horas de ayuno, el nivel casi volvió a la normalidad. La carnitina transporta los FFA del citosol a las mitocondrias donde tiene lugar la oxidación a acetil-CoA. Se observó un aumento espectacular en la carnitina hepática después de 48 y 72 horas de ayuno.

Los FFA son absorbidos por el hígado y reesterificados u oxidados (b-oxidación). La reesterificación lleva a la síntesis de TRIG. Estos se secretan como lipoproteínas de muy baja densidad, que pueden proporcionar FFA para otros tejidos. La esteatosis hepática es un aumento patológico en el TRIG hepático. El TRIG hepático fue seis veces mayor en ratones en ayunas por 16 horas que en ratones en ayunas durante 4 horas ($P < 0.01$), con un aumento significativo ($P < 0.05$) en ratones en ayunas durante 24 horas. Aumentó aproximadamente 10 veces después de 48 y 72 horas de ayuno. Hay diferencias entre las cepas de ratones con respecto a los niveles de TRIG hepáticos durante el ayuno: los ratones BALB / c y C57BL tuvieron un aumento significativo ($P < 0.05$) en el TRIG hepático después de 6 horas de ayuno y un aumento significativo después de 14 horas de ayuno, pero los ratones SWR no mostraron ninguna diferencia significativa antes de las 14 horas de ayuno. Hubo un aumento significativo ($P < 0.01$) en los niveles de expresión de ARNm del hígado para los factores de transcripción y las proteínas involucradas en la síntesis del TRIG después de 16 horas de ayuno en comparación con los niveles de 4 horas de ayuno. El TRIG en plasma disminuyó de 2 a 16 horas de ayuno y después de 48 y 72 horas. No hubo ningún cambio significativo en el contenido TRIG del músculo entre 16 horas y 4 horas de ayuno. No hubo aumentos en el contenido TRIG de riñones o corazón, posiblemente debido a una absorción controlada que no requiere un exceso.

La mayoría de los FFA que se oxidan en el hígado se oxidan parcialmente a acetil-CoA, que se condensa en cuerpos cetónicos, proporcionando una fuente de energía para el cerebro.

Los cuerpos cetónicos en plasma fueron significativamente ($P < 0.01$) más altos en los ratones en ayunas durante 16 horas que en los ratones en ayunas durante 4 horas. Después de 6 horas de ayuno no se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en el b-hidroxibutirato (antiguo 3-

hidroxibutirato) en plasma en tres cepas de ratones (BALB/c, C57BL y SWR), pero después de 14 horas de ayuno hubo un aumento significativo. El ayuno durante 24 horas aumentó significativamente el b-hidroxibutirato en plasma, y esto aumentó 21 veces en un estudio de Gavrilova *et al.* El ayuno durante 48 y 72 horas también produjo un aumento significativo en el b-hidroxibutirato. Los genes que codifican las enzimas utilizadas en la b-oxidación de los ácidos grasos estaban altamente regulados después de 24 y 48 horas de ayuno, porque el cuerpo comienza a descomponer el tejido graso para proporcionar energía. Por el contrario, los genes que codifican las enzimas de síntesis de grasa se regulan negativamente.

Los FFA completamente oxidados por las mitocondrias, proporcionan energía para la gluconeogénesis hepática, utilizando sustratos como el glicerol de la hidrólisis de TRIG en tejido adiposo, lactato de glucogenólisis en el músculo esquelético y aminoácidos. Los niveles de lactato plasmático disminuyeron gradualmente durante 72 horas de ayuno. Los niveles de expresión del RNAm hepático y las proteínas relacionadas involucradas en la gluconeogénesis se elevaron, mientras que los niveles de glucogenólisis se redujeron, en ratones en ayunas de 16 horas en comparación con ratones en ayunas durante 4 horas. Esto último se debe a que los depósitos de glucógeno en el hígado están disminuyendo, agotando así el sustrato para la glucogenólisis. La producción total de glucosa hepática no se vio alterada. No se observaron cambios en la urea (un producto del catabolismo proteico) después de 24 horas de ayuno o durante 2 a 16 horas de ayuno. Estos resultados indican que el glucógeno se utiliza rápidamente. El lactato y el glicerol se utilizan para la gluconeogénesis, pero la descomposición de las proteínas se retiene después de 24 horas de ayuno. En conclusión, el estado metabólico del ayuno se puede describir como catabólico o post absorbente, caracterizado por la movilización de glucógeno que proporciona glucosa y una mayor movilización del tejido adiposo, que nuevamente proporciona FFA, utilizado para la producción de cuerpos cetónicos y TRIG y que proporciona energía para la gluconeogénesis utilizando lactato, aminoácidos y glicerol como sustratos.

Parámetros del hígado

Se observa esteatosis hepática después de 16 horas de ayuno. Después de 48-72 horas de ayuno se observa esteatosis sutil en el hígado en hepatocitos centrizonales. Después de 66-72 horas, el cambio graso es mínimo con pocas gotas de lípidos microvesiculares. Después de 96 horas, no se observaron cambios grasos y los hepatocitos revelaron características de atrofia citoplasmática.

No se observó una diferencia significativa en el nivel de citocromo P-450 después de 12 horas de ayuno, pero fue significativamente ($P < 0.05$) menor (aproximadamente 33%) después de 24 horas de ayuno en ratones. Esto es interesante ya que el citocromo P-450 contribuye a la desintoxicación de xenobióticos. La actividad de anilina hidroxilasa y la actividad de aminopirina N-desmetilasa aumentaron significativamente ($P < 0.05$) al igual que la actividad de glucuronil transferasa ($P < 0.01$).

El glutatión reducido es un antioxidante que disminuye significativamente después de 17 horas y 24 horas de ayuno.

Temperatura corporal

Los ratones en ayunas durante 24 horas tuvieron una temperatura corporal significativamente menor ($P \leq 0.01$) que los ratones sin ayuno. La caída de temperatura fue de aproximadamente 3 °C. El ayuno durante dos días provocó caídas progresivas de temperatura durante la fotofase, con temperaturas de aproximadamente 27 °C al final del segundo día. La temperatura volvió a la normalidad en la escotofase.

El letargo se ha definido como una supresión de la tasa metabólica a un nivel tan bajo como el 30% de la tasa metabólica basal durante un período de varias horas debido a la disminución de la temperatura corporal. El letargo también se ha definido como una temperatura corporal de menos de 31 °C.

Los ratones que no están en ayunas normalmente no muestran sopor. Los ratones pueden volverse letárgicos después de aproximadamente 7 horas de ayuno, con una caída de la temperatura corporal de hasta 15 °C. En un estudio de Brown y Staples se informó que el tiempo medio desde el inicio del ayuno hasta el primer sopor fue de 13.3 horas. Se ha dicho

que el letargo ocurre típicamente después de 8 horas de ayuno, y/o al final del ciclo oscuro, que coincide con el pico de grelina circulante. La grelina es capaz de profundizar el letargo. Una restricción alimentaria del 50% durante tres días también indujo letargo.

El letargo inducido por el ayuno se ha reconocido en ambos sexos, jóvenes y adultos, animales alojados individualmente y en grupos y en varias cepas de ratones, tanto consanguíneos como exogámicos. También se encontraron ratones vivos tórpidos en nidos durante los meses fríos. Después de 24 horas de ayuno, el 35% de los ratones estaban tórpidos, y después de 48 horas de ayuno, el 100% estaban tórpidos. Los ratones alojados en grupos tuvieron una incidencia de sopor significativamente mayor que los ratones alojados individualmente. Los ratones puestos en ayunas en varias ocasiones experimentaron letargo en algún momento.

La temperatura corporal mínima posible en ratones es de 16-19 °C. Durante tres días de ayuno, los ratones generalmente sufren al menos un episodio de letargo cada día, generalmente comenzando al final de la escotofase. Swoap et al. descubrieron que la tasa de disminución de la temperatura es de 0.16 °C por minuto. Algunos ratones se vuelven hipotérmicos, presentando una incapacidad aparente para despertar espontáneamente sin ayuda, y es probable que no puedan sobrevivir tanto tiempo como aquellos que sufren un letargo diario. El surgimiento del letargo generalmente termina dentro de los 30-45 minutos desde el inicio de la recuperación, obteniendo un máximo de 0.26 °C por minuto. El manejo de ratones para inyección subcutánea o la inserción de una sonda rectal provoca una excitación inmediata del estado letárgico. También se informa de que los ratones se despiertan espontáneamente y como resultado del ruido o movimiento de la jaula.

Se sugiere que la entrada en letargo es consecuencia de un ambiente frío o en ayunas. La liberación de norepinefrina induce la activación simpática mediada por β_3 de los adipocitos blancos, provocando la supresión de la secreción de leptina y una elevación de la lipólisis, lo que resulta en una liberación de FFA a la sangre. El letargo probablemente esté regulado por una interacción compleja entre grelina, leptina, insulina y neuronas del hipotálamo. La respiración mitocondrial se suprime activamente durante el letargo diario en ratones en ayunas. La tasa de respiración mitocondrial es una medida de la actividad de los componentes de la fosforilación oxidativa que la controlan. En conclusión, el letargo parece ser una forma de reducir el

gasto de energía en tiempos de escasez real o prevista de alimentos, y los ratones pueden entrar en letargo cuando las temperaturas son bajas o en tiempos de ayuno.

Parámetros cardiovasculares

Un balance de energía negativo conduce a una disminución de la frecuencia cardíaca y la presión arterial. La presión arterial media se reduce significativamente ($P < 0.05$) durante la escotofase, pero no durante la fotofase en ratones en ayunas de 24 y 48 horas. La frecuencia cardíaca disminuye significativamente ($P < 0.05$) después de 24 y 48 horas de ayuno en ratones con un inicio rápido 2 horas antes de la escotofase. Después de 4 horas en la escotofase, la frecuencia cardíaca comienza a disminuir, alcanzando el punto más bajo en la transición de la escotofase a la fotofase. El consumo de oxígeno disminuye significativamente ($P < 0.05$) después de 48 horas de ayuno, pero no después de 24 horas.

Se sugiere que la bradicardia y la hipotensión son parte de la respuesta de letargo. Los patrones de bradicardia se notaron dentro de las 6 horas del ayuno. El gen que estaba mayormente regulado después de 24 y 48 horas de ayuno fue el citocromo P-450 4A14. La interrupción de este gen se ha asociado con hipertensión.

El volumen sanguíneo obtenible disminuyó significativamente después de 24 horas de ayuno y se informó una disminución significativa adicional después de cinco días de ayuno.

Los glóbulos blancos y rojos, la hemoglobina, el volumen celular promedio y las plaquetas disminuyeron significativamente después de 2 horas de ayuno en comparación con las 16 horas de ayuno, mientras que el hematocrito aumentó significativamente ($P < 0.05$). No se observaron diferencias en la hemoglobina corpuscular media y la concentración de hemoglobina celular media.

Toxicología

En las pruebas con bunitrolol o pindolol (bloqueadores de los adrenorreceptores β), los ratones en ayunas durante 17 a 20 horas desarrollaron signos clínicos comparables con los ratones sin ayuno aproximadamente 10 minutos antes, la toxicidad oral aguda fue significativamente mayor y la muerte se aceleró en comparación con los ratones sin ayuno. El metabolito azul de pindolol (bloqueador de los β adrenérgicos) apareció en la orina de los ratones sin ayuno

después de una hora, pero en la orina de los ratones en ayunas de 17 a 20 horas, después de media hora, en pruebas con bunitrolol o pindolol (bloqueadores de los adrenoreceptores β).

En un estudio de toxicidad que prueba la respuesta hepatotóxica al tetracloruro de carbono, no hubo diferencias significativas en la aspartato aminotransferasa (AST), la alanina aminotransferasa (ALT) y la sorbitoldehidrogenasa (SDH) se detectaron después de 6 horas de ayuno, pero después de 12, 24 y 36 horas de AST, ALT y SDH en ayunas, se incrementaron significativamente en ratones en ayunas en comparación con los ratones sin ayuno. El aumento fue reforzado después de 24 horas pero no después de 36 horas. Del mismo modo, en las pruebas de 24 horas con tioacetamida, paracetamol, bromobenceno, alcohol alílico y faloidina, se observó un aumento significativo en al menos uno de los parámetros AST, ALT y SDH en comparación con los ratones sin ayuno.

El tetracloruro de carbono causó necrosis centrilobular hepática masiva en ratones en ayunas durante 24 horas, donde los ratones sin ayuno solo mostraron alteraciones tóxicas moderadas. El ayuno no influyó en las concentraciones de enzimas después del tratamiento con solución salina, alfa-amanitina y praseodimio. La unión *in vitro* de proteínas de tetracloruro de carbono y paracetamol a la proteína microsómica hepática no se vio afectada después de 24 horas de ayuno. La cantidad hepática total de tetracloruro de carbono aumentó significativamente ($P < 0.05$) (aproximadamente 30%) en animales en ayunas durante 24 horas. Con respecto al paracetamol, el ayuno no tuvo influencia sobre la concentración hepática total o la cantidad unida covalentemente a las proteínas hepáticas. La administración de tetracloruro de carbono produjo un aumento similar en la peroxidación de lípidos en ratones con ayuno y sin ayuno de 24 horas.

La etilmorfina, el p-nitroanisol y la anilina son fármacos que sufren degradación enzimática oxidativa por microsomas hepáticos. El metabolismo de etilmorfina y p-nitroanisol se elevó significativamente después de dos y tres días de ayuno, pero no después de un día. El metabolismo de la anilina se elevó significativamente después de uno, dos y tres días de ayuno.

Los ratones en ayunas por 12 horas durante la noche antes de la administración oral de paracetamol (por ejemplo, acetaminofeno), un medicamento que puede causar hipotermia, necrosis hepática y congestión hepática en ratones, produjeron una unión covalente significativamente mayor ($P < 0.01$) del paracetamol o su metabolito a la

proteína del hígado 3 horas después de la administración, pero no 0,75, 1,5 o 6 horas después de la administración. 1.5 horas, 3 horas y 6 horas después de la administración, los ratones en ayunas tuvieron una mayor prevalencia de congestión centrilobular hepática, congestión y necrosis. La mortalidad (20%) solo ocurrió en animales en ayunas 4-6 horas después de la administración.

Los ratones en ayunas desarrollaron una proporción significativa ($P < 0.001$) de aumento de peso hepático/peso corporal después del tratamiento con paracetamol en comparación con los ratones sin ayuno.

En un estudio que examinó la mortalidad por toxicidad de la digitoxigenina administrada por vía intravenosa, la mortalidad fue significativamente ($P < 0.05$) menor en ratones con ayunas de 18 horas que en ratones sin ayuno. La distribución de la droga también fue alterada por el ayuno: en la corteza cerebral de los ratones en ayunas había un contenido de fármacos significativamente menor ($P < 0.05$), cerebelo, corazón y riñón no diferían, y en el hígado y la sangre el contenido de fármacos fue significativamente mayor. Aunque estos órganos también perdieron peso, la concentración relativa fue mayor que la pérdida de peso. Los ratones en ayunas pueden beneficiarse del hecho de que fueron dosificados después del peso corporal, y tenían un peso corporal más bajo. En los intentos por corregir esta diferencia, se observó una diferencia significativa en la toxicidad entre los ratones sin ayuno y en ayunas.

En conclusión, el ayuno es capaz de influir en la toxicidad de los fármacos, ya sea aumentando o disminuyendo la dosis de los mismos.

Discusión

El ayuno de los ratones a menudo se usa para evaluar la glucosa en sangre y la insulina en asociación con enfermedades metabólicas, como la diabetes. Las pruebas de tolerancia a la glucosa, las pruebas de tolerancia a la insulina y los clamps hiperglucémico, hiperinsulinemia-euglucemia e hiperinsulinemia-hipoglucemia incluyen pruebas de uso común en las que se recomienda una duración de ayuno de 5 a 6 horas. El ayuno durante 5 a 6 horas en lugar de durante la noche (16 a 18 horas) podría ofrecer una mejor comparación con los humanos, que generalmente están en ayunas durante la noche antes de pruebas similares. Los niveles de glucosa e insulina en sangre en humanos después de un ayuno nocturno representan "un estado estacionario basal", mientras que el ayuno nocturno de ratones no puede considerarse un evento

de rutina, debido a su patrón de alimentación nocturna.

El ayuno de los ratones cambia varios parámetros fisiológicos y, además, estos cambios dependen de una variedad de factores ambientales.

Glucosa, insulina y corticosterona, entre otros, fluctúan con ritmos circadianos en ratones. Para comparar estos parámetros entre ratones en el mismo estudio o entre estudios, es necesario tener información sobre los ciclos de luz/oscuridad (duración y tiempo de la escofófase y fotofase), y exactamente cuándo se recolectan las muestras. Si hay falta de información, las diferencias reportadas pueden ser causadas total o parcialmente por fluctuaciones normales en el ritmo circadiano, o las diferencias reales podrían enmascarse.

Cuando los animales están en ayunas en un estudio, es necesario informar de cuándo los animales estuvieron en ayunas y durante cuánto tiempo, de lo contrario, la comparación es difícil o casi imposible. Dado que la temperatura normal en una habitación de animales es 20-24 °C, los ratones se alojan a menos de su temperatura termoneutral de aproximadamente 30 °C. La temperatura ambiente afecta a la ingesta de alimentos de los ratones, y la ingesta de alimentos afecta a otros aspectos del metabolismo, por lo tanto, el conocimiento sobre la temperatura ambiente también es importante.

Algunos parámetros oscilan durante el ayuno, por lo tanto, no se puede suponer que, por ejemplo, un aumento de un punto a otro es igual a un aumento gradual.

Es complejo evaluar si el bienestar animal está influenciado por el ayuno. La duración y el momento del ayuno son factores importantes. Parece difícil probar cuándo el ratón reconoce que está ayunando, ya que esto es probablemente individualista y está asociado con hábitos y factores externos. El intervalo entre comidas voluntario más largo reportado en esta revisión fue de 5 horas. Esto ofrece una idea de cuándo el ratón comienza a experimentar que está en ayunas, pero este intervalo se registró en la fotofase y no puede usarse como argumento para hacer ayunar a los ratones durante 5 horas durante la escofófase. En segundo lugar, se deben esperar diferencias de tensión. Se ha afirmado que muchos ratones salvajes solo se alimentan durante la noche, o que a menudo encuentran restricción o privación de alimentos. Si el ayuno se considera parte del ciclo diario del ratón, se puede argumentar que los cambios que resultan del ayuno pueden considerarse fisiológicamente normales. Esto solo puede afirmarse por el ayuno en la fotofase, no hay evidencia de que los ratones omitan comer en la escofófase. Los experimentos se realizan principalmente en la fotofase, lo que significa que los

ratones generalmente estarán en ayunas durante la escofófase porque en la práctica es fácil retirar la comida la tarde anterior, excepto cuando el período de ayuno es solo de un par de horas.

Se puede hacer ayunar a los ratones mantenidos bajo un ciclo de luz/oscuridad opuesto fácilmente durante la fotofase. Mantener a los ratones en un ciclo de luz/oscuridad opuesto también podría proporcionar ventajas con respecto al hecho de que la limpieza, la alimentación y las actividades en general se realizarían durante el período de actividad de los ratones. Las desventajas incluyen problemas y molestias al trabajar en la oscuridad: en los casos de habitaciones de animales grandes, todos deben ponerse de acuerdo en tener ciclos opuestos de luz/oscuridad y tiempo extra cuando los ratones tienen que adaptarse al ciclo opuesto de luz/oscuridad; por ejemplo, los niveles de corticosterona tardan unos seis días en normalizarse. Si los ratones tienen que ser transferidos a una habitación iluminada para realizar un trabajo experimental, y luego volver a colocarlos en la escofófase, debe considerarse si estos cambios entre la luz y la oscuridad pueden ser más molestos que si fueran realizados en la fotofase. Una investigación previa evaluó que hasta 24 horas de ayuno es mínimamente estresante, pero informó de que faltan datos sobre ratones.

La administración de terrones de sacarosa a ratas y ratones se ha presentado como una alternativa al ayuno. Esta alimentación puede producir cambios marcados en el peso del tracto gastrointestinal, estructura y función pancreática y hepática. Por lo tanto, no se recomienda el uso de sacarosa para estudios de toxicología o cualquier estudio que examine la función hepática. Obviamente, no es una alternativa válida si el objetivo del ayuno es evaluar el nivel de glucosa en sangre.

Se ha recomendado colocar a los ratones en un piso de rejilla durante el ayuno para evitar la ingesta de material de cama. También impide que los ratones practiquen la coprofagia. Se deben evaluar las implicaciones para el bienestar animal de cambiar el entorno al colocar a los ratones en el suelo de rejilla, así como las consecuencias de la posibilidad de que los ratones coman material de lecho o heces. En un estudio de Llanos y Nash, el contenido gástrico después del ayuno durante 12 horas no fue diferente del contenido gástrico de los ratones sin ayunar en un momento particular del día (al final de la fotofase), y los autores argumentaron que el ayuno no siempre es necesario. La actividad de alimentación de los ratones se restringió a la escofófase, por lo tanto, estos resultados pueden no ser aplicables también a los ratones que comen en la fotofase. No hubo una descripción de cómo se midió la actividad alimentaria.

Hay poca evidencia de cómo se comporta el ratón durante un ayuno, pero se ha mencionado que el estrés y la agresión que generan pueden hacer requerir de una cubeta individual. Un estudio mostró que los ratones en ayunas aumentaron significativamente su actividad general en comparación con los ratones sin ayuno y argumentaron que el aumento podría ser debido a la motivación para encontrar alimentos. Otro estudio encontró una mayor actividad de los ratones en ayunas durante la escotofase, y niveles de actividad

similares a los de los ratones sin ayunar durante la fotofase, mientras que otros investigadores encontraron hiperactividad de la fotofase durante un ayuno de 24 horas. Williams *et al.* informaron de que la actividad durante el ayuno aumenta, pero no aumenta significativamente durante la fotofase. Se ha sugerido que un aumento en la actividad locomotora asociada con el ayuno puede interpretarse como un comportamiento de búsqueda de alimentos o termogénesis inducida por el ejercicio.

Tabla 6. Efectos del ayuno

Parametros	Efectos	Referencias
Tejido adiposo	↓	Bronson 1987; ³³ Ayala et al. 2006 ²¹
Actividad de aminopirina N-desmetilasa	↑	Strubelt et al. 1981 ¹
Actividad de anilina hidrolasaemetilasa	↑	Strubelt et al. 1981 ¹
Actividad aril hidrocarburo hidrolasa	↔	Walker et al. 1982 ⁸²
Glucagón en sangre	↑	Moitra et al. 1998; ⁶⁵ Kersten et al. 1999 ⁷⁹
Temperatura corporal	↓	Hudson & Scott 1979; ⁸⁷ Webb et al. 1980; ⁸⁸ Webb et al. 1982; ⁸⁶ Kanizsai et al. 2009; ⁸⁴ Brown & Staples 2010; ⁸⁹ Wankhade et al. 2010 ⁶¹
Volumen sanguíneo	↓	Hodge & MacLachlan 1947 ⁹³
Peso corporal	↓	Furner & Feller 1971; ⁷⁰ Strubelt et al. 1981; ¹ Warwick et al. 1985; ⁶⁹ Williams et al. 2002; ⁵³ Ayala et al. 2006; ²¹ Sokolović et al. 2007; ⁶⁸ Prior et al. 2009 ⁷¹
Peso cerebral	↔	Warwick et al. 1985 ⁶⁹
Carnitina	↑	Hashimoto et al. 2000 ⁷⁷
Corticosterona	↑	Ahima et al. 1996; ⁸ Gavrilova et al. 1999; ⁵⁷ Champy et al. 2004 ⁵⁶
Citocromo P-450	↓	Strubelt et al. 1981; ¹ Walker et al. 1982 ⁸²
Contenido gástrico	↓	Llanos & Nash 1971; ³⁷ Pessacq et al. 1976; ³⁸ Yeung et al. 2001; ⁷³ Osinski et al. 2002; ⁷⁴ Prior et al. 2009 ⁷¹
Vaciado gástrico	↑	Watanabe et al. 1977 ⁷⁵
Peso del tracto gastrointestinal.	↓	Warwick et al. 1985 ⁶⁹
Grelinina	↑	Asakawa et al. 2001; ⁶³ Kojima & Kangawa 2005 ⁶²
Glucosa, sangre	↓	Pessacq et al. 1976; ³⁸ Hashimoto et al. 2000; ⁷⁷ Tsuneki et al. 2002; ⁷⁸ Champy et al. 2004; ⁵⁶ Oosterveer et al. 2008 ⁴⁶
Actividad de glucuronil transferasa	↑	Walker et al. 1982 ⁸²
Frecuencia cardíaca	↓	Williams et al. 2002 ⁵³
Triglicéridos del corazón	↔	Hashimoto et al. 2000 ⁷⁷
Peso del corazón	↓	Warwick et al. 1985 ⁶⁹
Hematocrito	↓	Champy et al. 2004 ⁵⁶
Hemoglobina	↑	Champy et al. 2004 ⁵⁶
Alanina transaminasa	↔	Strubelt et al. 1981; ¹ Champy et al. 2004 ⁵⁶
Aspartamo hepático transaminasa	↔	Strubelt et al. 1981; ¹ Champy et al. 2004 ⁵⁶
Glucógeno hepático	↓	Strubelt et al. 1981; ¹ Hashimoto et al. 2000; ⁷⁷ Yeung et al. 2001; ⁷³ Ayala et al. 2006 ²¹
Sorbitol hepático deshidrogenasa	↔	Strubelt et al. 1981 ¹
Triglicérido hepático	↑	Strubelt et al. 1981; ¹ Hashimoto et al. 2000; ⁷⁷ Heijboer et al. 2005; ⁶⁶ Lin et al. 2005 ⁸⁰
Contenido de agua hepática	↔	Strubelt et al. 1981 ¹
Tiempo de tránsito intestinal del carbón vegetal	↓	Prior et al. 2009 ⁷¹
Triglicéridos renales	↔	Hashimoto et al. 2000 ⁷⁷
Peso del riñón	↓	Warwick et al. 1985 ⁶⁹
Leptina	↓	Rayner et al. 1998; ⁵⁸ Trayhurn et al. 1998; ⁵⁹ Champy et al. 2004; ⁵⁶ Swoap et al. 2006; ⁶⁰ Wankhade et al. 2010 ⁶¹
Peso del hígado	↓	Furner & Feller 1971; ⁷⁰ Strubelt et al. 1981; ¹ Warwick et al. 1985 ⁶⁹
Peso del hígado/100 g de peso corporal	↓	Furner & Feller 1971 ⁷⁰
Relación del hígado a peso corporal	↔	Strubelt et al. 1981 ¹
Presión arterial media	↓	Williams et al. 2002 ⁵³
Media de hemoglobina conc.	↔	Champy et al. 2004 ⁵⁶
Volumen celular medio	↑	Champy et al. 2004 ⁵⁶
Hemoglobina corpuscular media	↔	Champy et al. 2004 ⁵⁶
HMG-CoA sintasa mitocondrial	↑	Bauer et al. 2004 ⁸¹
Glucógeno muscular	↓	Gavrilova et al. 1999 ⁵⁷
Absorción de glucosa específica del músculo	↑	Heijboer et al. 2005 ⁶⁶
Triglicérido muscular	↔	Heijboer et al. 2005 ⁶⁶

(Continúa)

Table 6. Continuación

Parámetros	Efectos	Referencias
NADPH-citocromo	↔	Strubelt et al. 1981 ¹
Actividad c-reductasa	↑	Ahima et al. 1996 ⁸
Neuropéptido Y	↓	Williams et al. 2002 ⁵³
Consumo de oxígeno	↑	Moitra et al. 1998; ⁶⁵ Kersten et al. 1999; ⁷⁹ Gavrilova et al. 1999; ⁵⁷ Hashimoto et al. 2000; ⁷⁷ Lin et al. 2005 ⁸⁰
B-hidroxibutirato en plasma	↑	Moitra et al. 1998; ⁶⁵ Kersten et al. 1999; ⁷⁹ Hashimoto et al. 2000; ⁷⁷ Lin et al. 2005 ⁸⁰
Acidos grasos libres de plasma	↓	Moitra et al. 1998; ⁶⁵ Kersten et al. 1999; ⁷⁹ Champy et al. 2004 ⁵⁶
Insulina en plasma	↑	Heijboer et al. 2005 ⁶⁶
Cuerpos cetónicos de plasma	↓	Hashimoto et al. 2000 ⁷⁷
Lactato plasmático	↑	Moitra et al. 1998; ⁶⁵ Kersten et al. 1999 ⁷⁹
Epinefrina plasmática (nor)	↓	Hashimoto et al. 2000; ⁷⁷ Champy et al. 2004 ⁵⁶
Triglicéridos plasmáticos	↑	Champy et al. 2004 ⁵⁶
Plaquetas	↑	Champy et al. 2004 ⁵⁶
Células rojas en sangre	↑	Steppan et al. 2001 ⁶⁴
Resistina	↑	Gavrilova et al. 1999 ⁵⁷
Peso de los testículos	↔	Ahima et al. 1996; ⁸ Gavrilova et al. 1999; ⁵⁷ Champy et al. 2004 ⁵⁶
Testosterona	↓	Gavrilova et al. 1999 ⁵⁷
Hormona estimulante de la tiroides	↓	Ahima et al. 1996; ⁸ Gavrilova et al. 1999; ⁵⁷ Champy et al. 2004 ⁵⁶
Tiroxina	↔	Heijboer et al. 2005 ⁶⁶
Producción total de glucosa hepática	↔	Strubelt et al. 1981; ¹ Walker et al. 1982 ⁸²
Contenido total de proteínas de los microsomas hepáticos	↓	Gavrilova et al. 1999; ⁵⁷ Champy et al. 2004 ⁵⁶
Triyodotironina	↔	Gavrilova et al. 1999; ⁵⁷ Champy et al. 2004 ⁵⁶
Urea	↕	Kutscher 1971; ¹⁶ Kutscher 1974; ⁵² Williams et al. 2002 ⁵³
Consumo de agua	↑	Champy et al. 2004 ⁵⁶
Células blancas en sangre		

Las flechas indican si el parámetro aumenta, disminuye, las dos cosas o se mantiene a un nivel constante durante el ayuno

↑aumenta ↓disminuye ↕aumenta y disminuye ↔nivel constante.

Ver las referencias para información sobre la duración del ayuno. Genética y toxicología no se incluyen.

Declaración de conflictos de intereses

The authors declare no conflict of interest.

Financiación

This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Referencias

- Strubelt O, Dost-Kempf E, Siegers CP, et al. The influence of fasting on the susceptibility of mice to hepatotoxic injury. *Toxicol Appl Pharmacol*1981; 60: 66–77.
- Hedric HJ and Bullock GR. *The laboratory mouse*. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2004.
- Ebert BJ. Automation of rodent fasting. *J Am Assoc Lab Anim Sci*2009; 48: 537–538.
- Kinoshita M, Igarashi S, Kume E, Saito N and Arakawa K. Fasting induces impairment of gastric mucosal integrity in non-insulin-dependent diabetic (db/db) mice. *Aliment Pharmacol Ther*2000; 14: 359–366.
- Kim SH, Hyun SH and Choung SY. Anti-diabetic effect of cinnamon extract on blood glucose in db/db mice. *J Ethnopharmacol*2006; 104: 119–123.
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). *Guidelines for testing of chemicals*. No. 407–409, Section 4: health effects. Paris: OECD, 1995.
- Ellacott KLJ, Morton GJ, Woods SC, Tso P and Schwartz MW. Assessment of feeding behavior in laboratory mice. *Cell Metab*2010; 12: 10–17.
- Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, et al. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 1996; 382: 250–252.
- Froy O and Miskin R. Interrelations among feeding, circadian rhythms and ageing. *Prog Neurobiol* 2007; 82: 142–150.
- Noguchi T, Michihata T, Nakamura W, et al. Dual-color luciferase mouse directly demonstrates coupled expression of two clock genes. *Biochemistry* 2010; 49: 8053–8061.
- Reppert SM and Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*2002; 418: 935–941.
- Strubbe JH, Prins AJA, Bruggink J and Steffens AB. Daily variation of food-induced changes in blood glucose and insulin in the rat and the control by the suprachiasmatic nucleus and the vagus nerve. *J Auton Nerv Syst* 1987; 20: 113–119.
- Szentirmai E, Kapas L, Sun YX, Smith RG and Krueger JM. Restricted feeding-induced sleep, activity, and body temperature changes in normal and preproghrelin-deficient mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010; 298: R467–R477.
- Dallman MF, Akana SF, Strack AM, Hanson ES and Sebastian RJ. The neural network that regulates energy balance is responsive to glucocorticoids and insulin and also regulates HPA axis responsivity at a site proximal to CRF neurons. *Ann N Y Acad Sci*1995; 771: 730–742.
- Djordjevic J, Jasníc N, Vujovic P, Djurasevic S, Djordjevic I and Cvijic G. The effect of fasting on the diurnal rhythm of rat ACTH and corticosterone secretion. *Arch Biol Sci*2008; 60: 541–546.
- Kutscher CL. Incidence of food-deprivation polydipsia in white Swiss mouse. *Physiol Behav*1971; 7: 395–399.
- Kavaliers M and Hirst M. The influence of opiate agonists on day–night feeding rhythms in young and old mice. *Brain Res*1985; 326: 160–167.
- Gannon KS, Smith JC, Henderson R and Hendrick P. A system for studying the microstructure of ingestive behavior in mice. *Physiol Behav*1992; 51: 515–521.
- Schlingmann F, Van de Weerd HA, Baumans V, Remie R and Van Zutphen LFM. A balance device for the analysis of behavioural patterns of the mouse. *Anim Welf* 1998; 7: 177–188.
- Kurokawa M, Akino K and Kanda K. A new apparatus for studying feeding and drinking in the mouse. *Physiol Behav*2000; 70: 105–112.
- Ayala JE, Bracy DP, McGuinness OP and Wasserman DH. Considerations in the design of hyperinsulinemic–euglycemic clamps in the conscious mouse. *Diabetes* 2006; 55: 390–397.
- Petersen S. Feeding, blood glucose and plasma insulin of mice at dusk. *Nature*1978; 275: 647–649.
- Wiepkema PR, Deruiter L and Reddingh J. Circadian rhythms in feeding behaviour of CBA mice. *Nature* 1966; 209: 935–936.
- Nowell NW. Circadian rhythm of glucose tolerance in laboratory mice. *Diabetologia*1970; 6: 488–492.
- Mühlbauer E, Gross E, Labucay K, Wolgast S and Peschke E. Loss of melatonin signalling and its impact on circadian rhythms in mouse organs regulating blood glucose. *Eur J Pharmacol*2009; 606: 61–71.
- Gagliardino JJ and Hernández RE. Circadian variation of the serum glucose and immunoreactive insulin levels. *Endocrinology*1971; 88: 1532–1534.
- Tucci V, Hardy A and Nolan PM. A comparison of physiological and behavioural parameters in C57BL/6J mice undergoing food or water restriction regimes. *Behav Brain Res*2006; 173: 22–29.
- Echavell JM and Epeledev ME. Circadian rhythm in blood glucose levels in normal and hepatectomized mice. *J Interdiscipl Cycle*1972; 3: 25–32.
- Ahrén B. Diurnal variation in circulating leptin is dependent on gender, food intake and circulating insulin in mice. *Acta Physiol Scand*2000; 169: 325–331.
- Bailey CJ, Atkins TW, Conner MJ, Manley CG and Matty AJ. Diurnal variations of food consumption, plasma glucose and plasma insulin concentrations in lean and obese hyperglycemic mice. *Horm Res* 1975; 6: 380–386.
- Yu YH, South T and Huang XF. Inter-meal interval is increased in mice fed a high whey, as opposed to soy and gluten, protein diets. *Appetite*2009; 52: 372–379.
- Boss O, Samec S, Kuhne F, et al. Uncoupling protein-3 expression in rodent skeletal muscle is modulated by food intake but not by changes in environmental temperature. *J Biol Chem*1998; 273: 5–8.
- Bronson FH. Susceptibility of the fat reserves of mice to natural challenges. *J Comp Physiol B*1987; 157: 551–554.

34. Overton JM and Williams TD. Behavioral and physiologic responses to caloric restriction in mice. *Physiol Behav* 2004; 81: 749–754.
35. Uchida K, Shiuchi T, Inada H, Minokoshi Y and Tominaga M. Metabolic adaptation of mice in a cool environment. *Pflugers Arch* 2010; 459: 765–774.
36. Bachmanov AA, Reed DR, Beauchamp GD and Tordoff MG. Food intake, water intake, and drinking spout side preference of 28 mouse strains. *Behav Genet* 2002; 32: 435–443.
37. Llanos JME and Nash RE. Circadian rhythm in the gastric content of normal and hepatectomized mice. *J Interdiscipl Cycle* 1971; 2: 445–454.
38. Pessacq MT, Mercer RG, Rebolledo OR and Gagliardino JJ. Effect of fasting on circadian-rhythm of serum insulin levels. *Chronobiologia* 1976; 3: 20–26.
39. Ungar F and Halberg F. Circadian rhythm in vitro response of mouse adrenal to adrenocorticotrophic hormone. *Science* 1962; 137: 1058–1060.
40. Halberg F, Peterson RE and Silber RH. Phase relations of 24-hour periodicities in blood corticosterone, mitoses in cortical adrenal parenchyma, and total body activity. *Endocrinology* 1959; 64: 222–230.
41. Shimizu K, Amagaya S and Ogihara Y. Analysis of corticosterone in the serum of mice and rats using high performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1983; 272: 170–175.
42. Hayashi O and Kikuchi M. The influence of phase shift in the light–dark cycle on humoral immune responses of mice to sheep red blood cells and polyvinylpyrrolidone. *J Immunol* 1985; 134: 1455–1461.
43. Harris SB, Gunion MW, Rosenthal MJ and Walford RL. Serum glucose, glucose tolerance, corticosterone and free fatty acids during aging in energy restricted mice. *Mech Ageing Dev* 1994; 73: 209–221.
44. Weinert D, Eimert H, Erkert HG and Schneyer U. Resynchronization of the circadian corticosterone rhythm after a light–dark shift in juvenile and adult mice. *Chronobiol Int* 1994; 11: 222–231.
45. Barriga C, Martin MI, Tabla R, Ortega E and Rodriguez AB. Circadian rhythm of melatonin, corticosterone and phagocytosis: effect of stress. *J Pineal Res* 2001; 30: 180–187.
46. Oosterveer MH, Van Dijk TH, Grefhorst A, et al. LXR alpha deficiency hampers the hepatic adaptive response to fasting in mice. *J Biol Chem* 2008; 283: 25437–25445.
47. Awad S, Constantin-Teodosiu D, Macdonald IA and Lobo DN. Short-term starvation and mitochondrial dysfunction – a possible mechanism leading to postoperative insulin resistance. *Clin Nutr* 2009; 28: 497–509.
48. Connolly MS and Lynch CB. Circadian variation of strain differences in body temperature and activity in mice. *Physiol Behav* 1981; 27: 1045–1049.
49. Lacy RC and Lynch CB. Quantitative genetic-analysis of temperature regulation in *Mus musculus*. 1. Partitioning of variance. *Genetics* 1979; 91: 743–753.
50. Nelson W and Halberg F. Meal-timing, circadian rhythms and life span of mice. *J Nutr* 1986; 116: 2244–2253.
51. Swoap SJ. Altered leptin signaling is sufficient, but not required, for hypotension associated with caloric restriction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281: H2473–H2479.
52. Kutscher CL. Strain differences in drinking in inbred mice during ad libitum feeding and food deprivation. *Physiol Behav* 1974; 13: 63–70.
53. Williams TD, Chambers JB, Henderson RP, Rashotte ME and Overton JM. Cardiovascular responses to caloric restriction and thermoneutrality in C57BL/6J mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002; 282: R1459–R1467.
54. Amaral VCS, Gomes KS and Nunes-de-Souza RL. Increased corticosterone levels in mice subjected to the rat exposure test. *Horm Behav* 2010; 57: 128–133.
55. Rayner DV. The sympathetic nervous system in white adipose tissue regulation. *Proc Nutr Soc* 2001; 60: 357–364.
56. Champy MF, Selloum M, Piard L, et al. Mouse functional genomics requires standardization of mouse handling and housing conditions. *Mamm Genome* 2004; 15: 768–783.
57. Gavrilova O, Leon LR, Marcus-Samuels B, et al. Torpor in mice is induced by both leptin-dependent and -independent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 14623–14628.
58. Rayner DV, Simon E, Duncan JS and Trayhurn P. Hyperleptinaemia in mice induced by administration of the tyrosine hydroxylase inhibitor alpha-methyl-tyrosine. *FEBS Lett* 1998; 429: 395–398.
59. Trayhurn P, Duncan JS, Hoggard N and Rayner DV. Regulation of leptin production: a dominant role for the sympathetic nervous system? *Proc Nutr Soc* 1998; 57: 413–419.
60. Swoap SJ, Gutilla MJ, Liles LC, Smith RO and Weinshenker D. The full expression of fasting-induced torpor requires beta 3-adrenergic receptor signaling. *J Neurosci* 2006; 26: 241–245.
61. Wankhade UD, Vella KR, Fox DL and Good DJ. Deletion of Nhlh2 results in a defective torpor response and reduced beta adrenergic receptor expression in adipose tissue. *PLoS One* 2010; 5: e12324.
62. Kojima M and Kangawa K. Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev* 2005; 85: 495–522.
63. Asakawa A, Inui A, Kaga T, et al. Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology* 2001; 120: 337–345.
64. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 2001; 409: 307–312.
65. Moitra J, Mason MM, Olive M, et al. Life without white fat: a transgenic mouse. *Genes Dev* 1998; 12: 3168–3181.
66. Heijboer AC, Donga E, Voshol PJ, et al. Sixteen hours of fasting differentially affects hepatic and muscle insulin sensitivity in mice. *J Lipid Res* 2005; 46: 582–588.
67. Quimby FW. *The clinical chemistry of laboratory animals*. Philadelphia: Taylor & Francis, 1999.
68. Sokolović M, Wehkamp D, Sokolović A, et al. Fasting induces a biphasic adaptive metabolic response in murine small intestine. *BMC Genomics* 2007; 8: 361.

69. Warwick RO, Smith MP, Graffy MA and Lage GL. Altered distribution and toxicity of digitoxigenin in fasted mice. *Life Sci*1985; 37: 775–782.
70. Furner RL and Feller DD. Influence of starvation upon hepatic drug metabolism in rats, mice, and guinea pigs. *Proc Soc Exp Biol Med*1971; 137: 816–819.
71. Prior H, Ewart L, Fantham E, Pimlott P, Cowell F and Valentin JP. Refinement of the charcoal meal GI study: reduction in the fasting period required. *J Pharmacol Toxicol Methods*2009; 58: 174.
72. Im R, Mano H, Matsuura T, Nakatani S, Shimizu J and Wada M. Mechanisms of blood glucose-lowering effect of aqueous extract from stems of *Kothala himbutu* (*Salacia reticulata*) in the mouse. *J Ethnopharmacol* 2009; 121: 234–240.
73. Yeung CK, McCurrie JR and Wood D. A simple method to investigate the inhibitory effects of drugs on gastric emptying in the mouse in vivo. *J Pharmacol Toxicol Methods*2001; 45: 235–240.
74. Osinski MA, Seifert TR, Cox BF and Gintant GA. An improved method of evaluation of drug-evoked changes in gastric emptying in mice. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2002; 47: 115–120.
75. Watanabe J, Okabe H, Ichihashi T, Mizojiri K, Yamada H and Yamamoto R. Gastric emptying rate constants after oral administration of drug solution to mice, rats, and rabbits. *Chem Pharm Bull*1977; 25: 2147–2155.
76. Lin JH. Species similarities and differences in pharmacokinetics. *Drug Metab Dispos*1995; 23: 1008–1021.
77. Hashimoto T, Cook WS, Qi C, Yeldandi AV, Reddy JK and Rao MS. Defect in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-inducible fatty acid oxidation determines the severity of hepatic steatosis in response to fasting. *J Biol Chem*2000; 275: 28918–28928.
78. Tsuneki H, Sugihara Y, Honda R, Wada T, Sasaoka T and Kimura I. Reduction of blood glucose level by orexins in fasting normal and streptozotocin-diabetic mice. *Eur J Pharmacol*2002; 448: 245–252.
79. Kersten S, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B and Wrahl W. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest*1999; 103: 1489–1498.
80. Lin X, Yue P, Chen Z and Schonfeld G. Hepatic triglyceride contents are genetically determined in mice: results of a strain survey. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288: G1179–G1189.
81. Bauer M, Hamm AC, Bonaus M, et al. Starvation response in mouse liver shows strong correlation with life-span-prolonging processes. *Physiol Genomics* 2004; 17: 230–244.
82. Walker RM, Massey TE, Mcelligott TF and Raczy WJ. Acetaminophen toxicity in fed and fasted mice. *Can J Physiol Pharmacol*1982; 60: 399–404.
83. Brooks RR and Pong SF. Effects of fasting, body weight, methylcellulose, and carboxymethylcellulose on hepatic glutathione levels in mice and hamsters. *Biochem Pharmacol*1981; 30: 589–594.
84. Kanizsai P, Garami A, Solymar M, Szolcsanyi J and Szelenyi Z. Energetics of fasting heterothermia in TRPV1-KO and wild type mice. *Physiol Behav* 2009; 96: 149–154.
85. Hudson JW. Shallow, daily torpor – thermoregulatory adaptation. *J Therm Biol*1978; 3: 87.
86. Webb GP, Jagot SA and Jakobson ME. Fasting-induced torpor in *Mus musculus* and its implications in the use of murine models for human obesity studies. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*1982; 72: 211–219.
87. Hudson JW and Scott IM. Daily torpor in the laboratory mouse, *Mus musculus var albino*. *Physiol Zool*1979; 52: 205–218.
88. Webb GP, Jagot SA, Rogers PD and Jakobson ME. Effects of fasting on thermoregulation in normal and obese mice. *IRCS Med Sci Biochem*1980; 8: 163–164.
89. Brown JCL and Staples JF. Mitochondrial metabolism during fasting-induced daily torpor in mice. *Biochim Biophys Acta*2010; 1797: 476–486.
90. Swoap SJ and Weinshenker D. Norepinephrine controls both torpor initiation and emergence via distinct mechanisms in the mouse. *PLoS One*2008; 3: e4038.
91. Gluck EF, Stephens N and Swoap SJ. Peripheral ghrelin deepens torpor bouts in mice through the arcuate nucleus neuropeptide Y signaling pathway. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*2006; 291: R1303–R1309.
92. Morton SR. Torpor and nest-sharing in free-living *Sminthopsis crassicaudata* (Marsupialia) and *Mus musculus* (Rodentia). *J Mammal*1978; 59: 569–575.
93. Hodge HC and MacLachlan PL. Lipides of the fasting mouse; phospholipide to neutral fat relationship in the blood lipides. *J Biol Chem*1947; 169: 707–711.
94. Kast A and Nishikawa J. The effect of fasting on oral acute toxicity of drugs in rats and mice. *Lab Anim*1981; 15: 359–364.
95. Ayala JE, Samuel VT, Morton GJ, et al. Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice. *Dis Model Mech* 2010; 3: 525–534.
96. McGuinness OP, Ayala JE, Laughlin MR and Wasserman DH. NIH experiment in centralized mouse phenotyping: the Vanderbilt experience and recommendations for evaluating glucose homeostasis in the mouse. *Am J Physiol Endocrinol Metab*2009; 297: E849–E855.
97. Gaskill BN, Rohr SA, Pajor EA, Lucas JR and Garner JP. Some like it hot: mouse temperature preferences in laboratory housing. *Appl Anim Behav Sci*2009; 116: 279–285.
98. Gaskill BN, Rohr SA, Pajor EA, Lucas JR and Garner JP. Working with what you've got: changes in thermal preference and behavior in mice with or without nesting material. *J Therm Biol*2011; 36: 193–199.
99. Cao J, Zhang L-N and Zhao Z-J. Trade-off between energy budget, thermogenesis and behavior in Swiss mice under stochastic food deprivation. *J Therm Biol* 2009; 34: 290–298.
100. Rowland NE. Food or fluid restriction in common laboratory animals: balancing welfare considerations with scientific inquiry. *Comp Med*2007; 57: 149–160.

101. Turner PV, Albassam MA and Walker RM. The effects of overnight fasting, feeding, or sucrose supplementation prior to necropsy in rats. *Contemp Top Lab Anim Sci* 2001; 40: 36–40.
102. Hau J and Van Hoosier GL Jr. *Handbook of Laboratory animal Science*, 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2003.
103. Gelegen C, Collier DA, Campbell IC, Oppelaar H and Kas MJ. Behavioral, physiological, and molecular differences in response to dietary restriction in three inbred mouse strains. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 291: E574–E581.
104. Roda A, Mezzanotte L, Aldini R, Michelini E and Cevenini L. A new gastric-emptying mouse model based on in vivo non-invasive bioluminescence imaging. *Neurogastroenterol Motil* 2010; 22: 1117–e288.