



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

EXPRESIÓN HIPOTALÁMICA DE *c-Fos* DURANTE LA RESTRICCIÓN  
TEMPORAL DEL ACCESO AL ALIMENTO EN UN MODELO MURINO DE  
OBESIDAD (*Neotomodon alstoni*)

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:  
Biól. CÉSAR ENRIQUE LUNA ILLADES

DIRECTORES DE TESIS  
Dra. MARÍA TERESA MORALES GUZMÁN  
Instituto de Neurobiología, UNAM

Dr. MANUEL MIRANDA ANAYA  
Facultad de Ciencias, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. YAZMÍN MACOTELA GUZMÁN Instituto de Neurobiología, UNAM

Dr. MAURICIO DÍAZ MUÑOZ Instituto de Neurobiología, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX.

.....

DICIEMBRE 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de “Neuroanatomía Funcional y Neuroendocrinología” del Departamento de Neurobiología Celular y Molecular en el Instituto de Neurobiología y en el Laboratorio de “Bio-geo-ritmos” de la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación, Facultad de Ciencias, de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. María Teresa Morales Guzmán y el Dr. Manuel Miranda Anaya.

## **AGRADECIMIENTOS**

El presente trabajo contó con el financiamiento del programa UNAM-DGAPA-PAPIIT-IN202315 y UNAM-DGAPA-PAPIIT-IN212715, además de la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (386247).

Al comité tutor del proyecto, conformado por la Dra. Yazmín Macotela Guzmán y el Dr. Mauricio Díaz, Muñoz.

A los miembros del jurado de examen de grado que no formaron parte del comité tutor, el Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera Lorenzo, la Dra. Carolina Escobar Briones y el Dr. Pavel Ernesto Rueda Orozco.

A Manuel por el apoyo y consejo brindado.

A Tere por su paciencia, trabajo y guía constante a lo largo del proyecto.

El apoyo técnico brindado por:

Biól. María Eugenia Ramos Aguilar

M. en C. Agustín Carmona Castro

Víctor Pérez

A mis compañeros de laboratorio “Emeritito” Julio Reyes, “Tokyo” César Solís, Ilektra Anagnostou y Eduardo Muñoz.

***A mis padres, Perla y Román, mi hermano Claudio,  
mi hermosa Dio y mi hijo Ronnie***

## RESUMEN

En roedores sometidos a una restricción temporal del acceso al alimento (RA) se presenta un aumento en la actividad locomotora en las 3 horas previas a la llegada del alimento, denominada Actividad Anticipatoria al Alimento (AAA) cuya expresión depende de un oscilador circadiano y que es modificada durante la condición de obesidad. El 50% de los ratones *Neotomodon alstoni* mantenidos en vivario con una dieta estándar de laboratorio desarrolla obesidad. Los mecanismos que subyacen a las diferencias interindividuales para el desarrollo de obesidad en esta especie aún son desconocidos, además los ratones obesos presentan altas concentraciones en sangre de triacilglicéridos, leptina, insulina y una disminución en amplitud y duración de la AAA. Debido a que el hipotálamo juega un papel fundamental en la regulación de la ingesta y en la expresión de la AAA, el presente estudio pretende determinar si la obesidad en ratones modifica los patrones de activación neuronal hipotalámica (medida como la presencia de la proteína FOS) durante la expresión de AAA. Los ratones obesos mostraron una tendencia hacia la reducción en la cantidad de neuronas FOS positivas (FOS+) en el núcleo supraquiasmático (NSQ) independientemente de la condición de alimentación. Durante la RA únicamente los ratones delgados mostraron un aumento en FOS+ en los núcleos hipotalámicos dorsomedial (DMH), arqueado (ARC) (núcleos que regulan la ingesta y el balance energético) y en regiones límbicas como el giro dentado del hipocampo y la corteza cingulada; la ingesta de alimento en la RA fue menor en ratones obesos. Los datos sugieren que en la condición de alimentación *ad libitum* la disminución en la activación neuronal en el NSQ y la disrupción circadiana podrían contribuir al incremento en el consumo de alimento y la excesiva acumulación de grasa en los ratones obesos. Así como la disminución en ratones obesos de la activación neuronal en el ARC y DMH durante la RA se puede relacionar con la disminución del consumo de alimento y en la expresión de AAA.

## ÍNDICE

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b>  | <b>8</b>  |
| <b>2. ANTECEDENTES GENERALES</b>  | <b>9</b>  |
| <b>2.1 Ritmos biológicos</b>  | <b>9</b>  |
| 2.1.1 Definición características y clasificación de los ritmos biológicos | 9         |
| 2.1.2 Ritmos circadianos y sus propiedades                                | 10        |
| <b>2.2 Oscilador endógeno y sistema circadiano</b>                        | <b>10</b> |
| 2.2.1 Oscilador maestro en mamíferos, Núcleo Supraquiasmático             | 10        |
| 2.2.2 Mecanismo molecular de las oscilaciones en el NSQ                   | 11        |
| 2.2.3 El Sistema Circadiano (SC)  | 11        |
| 2.2.4 Osciladores periféricos   | 12        |
| <b>2.3 Oscilador Sincronizado por el Alimento (OSA)</b>                   | <b>12</b> |
| 2.3.1 Antecedentes  | 12        |
| 2.3.2 Regulación hipotalámica de la ingesta de alimentos                  | 12        |
| 2.3.3 Sincronización al alimento y el OSA                                 | 14        |
| <b>2.4 Genes de expresión temprana en el Sistema Nervioso Central</b>     | <b>15</b> |
| 2.4.1 Genes de expresión temprana: proto-oncogén <i>c-Fos</i>             | 15        |
| 2.4.2 Mecanismos de inducción de <i>c-Fos</i>                             | 16        |
| 2.4.3 FOS como marcador de activación neuronal                            | 16        |
| 2.4.4 Expresión de <i>c-Fos</i> durante la sincronización al alimento     | 16        |
| <b>3. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS</b>  | <b>17</b> |
| <b>3.1 Obesidad y alteraciones del SC</b>                                 | <b>17</b> |
| 3.1.1 Obesidad  | 17        |
| 3.1.2 Índice de masa corporal y de Lee                                    | 18        |
| 3.1.3 Alteraciones del SC relacionadas con la obesidad                    | 18        |
| <b>3.2 Modelos animales de obesidad y expresión de AAA</b>                | <b>19</b> |
| 3.2.1 Obesidad inducida genéticamente                                     | 19        |
| 3.2.2 Obesidad inducida mediante dietas hipercalóricas                    | 19        |
| <b>3.3 El ratón de los volcanes <i>Neotomodon alstoni</i></b>             | <b>19</b> |
| 3.3.1 Características generales de <i>N. alstoni</i>                      | 19        |
| 3.3.2 <i>N. alstoni</i> como modelo de obesidad                           | 20        |
| 3.3.4 Efectos de la obesidad en <i>N. alstoni</i>                         | 20        |
| <b>4. JUSTIFICACIÓN</b>   | <b>21</b> |
| <b>5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN</b>                                       | <b>22</b> |
| <b>6. HIPÓTESIS</b>   | <b>22</b> |
| <b>7. OBJETIVOS</b>   | <b>22</b> |
| 7.1 Objetivo general  | 22        |
| 7.2 Objetivos particulares  | 23        |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>8. MÉTODO Y MATERIALES</b>                           | <b>23</b> |
| 8.1 Obtención de animales y mantenimiento               | 23        |
| 8.2 Sistema de registro de actividad locomotora         | 24        |
| 8.3 Restricción de alimento                             | 24        |
| 8.4 Inmunohistoquímica: histología, detección de FOS    | 25        |
| 8.5 Análisis de datos                                   | 25        |
| <b>9. RESULTADOS</b>                                    | <b>27</b> |
| 9.1 Actogramas  | 28        |
| 9.2 Peso corporal                                       | 29        |
| 9.3 Consumo de alimento                                 | 30        |
| 9.4 Actividad locomotora                                |           |
| 9.5 Presencia de FOS en el hipotálamo                   | 31        |
| 9.5.1 Núcleo supraquiasmático                           | 31        |
| 9.5.2 Núcleo dorsomedial hipotalámico                   | 32        |
| 9.5.3 Núcleo arqueado hipotalámico                      | 33        |
| 9.6 Presencia de FOS en estructuras extra-hipotalámicas | 34        |
| <b>10. DISCUSIÓN</b>                                    | <b>36</b> |
| <b>11. CONCLUSIONES</b>                                 | <b>41</b> |
| <b>12. REFERENCIAS</b>                                  | <b>42</b> |

## **INTRODUCCIÓN**

La capacidad de anticipar la disponibilidad periódica de alimento es de gran relevancia adaptativa y conlleva la integración de señales temporales y del estado del balance energético de los organismos. El sistema digestivo cumple una función básica para la supervivencia y su funcionamiento está regulado por una serie de señales externas e internas, que se integran en el sistema nervioso central (SNC), particularmente en el hipotálamo. En esta región cerebral se han descrito diferentes poblaciones neuronales que participan tanto en la integración de referencias temporales ambientales, como en la regulación de los patrones de ingesta de alimento y el balance energético. A su vez el hipotálamo se relaciona con otras áreas cerebrales capaces de modular las respuestas conductuales ante la disponibilidad periódica de alimento. Actualmente se cuenta con protocolos experimentales en los que se modifica la disponibilidad de alimento y que permiten estudiar la conducta de los animales ante este estímulo. Por otro lado, uno de los mayores problemas en materia de salud pública en México, es la obesidad. Esta enfermedad, se caracteriza por una desregulación en el balance energético, como consecuencia de la alteración en los patrones de alimentación. Por esto es importante analizar en modelos animales experimentales las alteraciones neurales que ocurren en la condición de obesidad y la respuesta de los centros de regulación de la ingesta de alimento ante retos fisiológicos. En particular, resulta de interés conocer los patrones de activación neuronal hipotalámica durante un protocolo de restricción temporal del acceso al alimento, usado para el estudio de la manifestación del Oscilador Sincronizado al Alimento (OSA). Estos estudios brindarán información acerca de las alteraciones en la integración central de información del balance energético durante la condición de obesidad; y aportarán conocimiento sobre las poblaciones neurales que forman parte del OSA y los procesos neurofisiológicos que subyacen al mismo.

## 2. ANTECEDENTES GENERALES

### 2.1 Ritmos biológicos

Debido a los ciclos geofísicos inherentes al planeta Tierra, la mayoría de los seres vivos están expuestos a fenómenos ambientales que se repiten en un intervalo de tiempo constante. Un fenómeno ambiental rítmico e invariable que se repite cada 24 horas (zona intertropical), es la sucesión del día y la noche. Por lo anterior, a lo largo de la evolución, los organismos han desarrollado un sistema que les permita percibir el paso del tiempo con base en el ciclo diario de luz y así anticipar funciones o conductas de acuerdo al contexto ambiental rítmico (Refinetti, 2005).

#### **Definición, características y clasificación de los ritmos biológicos**

Ritmos biológicos se definen como los cambios en sistemas biológicos, ya sea en variables bioquímicas, fisiológicas o de la conducta que se repiten en un intervalo constante de tiempo (Willard y Koukkari, 2006). Como ejemplos de ritmos biológicos tenemos el patrón de secreción de hormonas, la frecuencia cardiaca, el ciclo sueño-vigilia, la floración en plantas, conidiación en hongos, o la reproducción de algunos animales.

Existen varias características útiles para el estudio de los ritmos biológicos, las cuales se desprenden del análisis matemático que describe a cualquier oscilación periódica auto-sostenida. Primero definimos a la *fase*, como cualquier punto francamente distinguible en la oscilación. Se le denomina *acrofase* a un máximo relativo en la oscilación, al mínimo relativo de la oscilación se le denomina *batifase*. El *mesor* representa el promedio para todos los valores de la oscilación. El *periodo* se define como el tiempo que transcurre en la repetición de fases equivalentes en la función, la *frecuencia* se calcula como el inverso del periodo y representa el número de ciclos en una unidad de tiempo determinada, la *amplitud* se define como la diferencia instantánea entre cualquier fase y el mesor (Prosser, 1991).

Los ritmos biológicos se pueden clasificar de acuerdo con su frecuencia en relación a un día o al tiempo que transcurre para completar un ciclo. Si el periodo de un ritmo biológico observado en condiciones constantes (ausencia de cualquier estímulo que pueda brindar una referencia temporal al organismo), se encuentra en el rango de 20 a las 28 horas, se considera circadiano, como es el caso del ciclo sueño-vigilia o la variación en la temperatura corporal en el ser humano. Si el periodo del ritmo es menor a 20 horas, se considera ultradiano (varios ciclos en un día) y cuando es mayor a 28 horas se denomina infradiano (requiere más de un día para completarse). Cuando son clasificados con base en la similitud de su periodo a la de un ciclo geofísico, reciben el prefijo latino *circa* (cerca a) y después el sufijo correspondiente al ciclo geofísico, tal como día (circadiano), año (circaanual), marea (circamareal) etc. (Refinetti, 2005).

### **Ritmos circadianos y sus propiedades**

Los ritmos biológicos que presentan periodos aproximados de 24 horas o circadianos, están presentes prácticamente en todos los organismos a la fecha estudiados, desde bacterias hasta mamíferos, lo que refleja su gran importancia adaptativa (Willard y Koukkari, 2006). Existen varias propiedades en común en los organismos para los ritmos circadianos: son innatos (se generan de manera endógena, y por lo tanto persisten en ambientes constantes), su periodo circadiano compensa los cambios de la temperatura, y su principal sincronizador es la luz (Bass y Takahashi, 2010).

## **2.2 Oscilador endógeno y sistema circadiano**

### **Oscilador maestro en mamíferos, Núcleo Supraquiasmático**

Para que un organismo sea capaz de generar una ritmicidad endógena debe poseer mecanismos con propiedades semejantes a las de un sistema oscilador-marcapasos interno, parecido a un reloj, que sea capaz de ajustarse con las señales ambientales (Shibata *et al.*, 2010).

En los mamíferos existe un sistema marcapasos circadiano capaz de ajustarse al ciclo lumínico de día y noche y que recibe información desde los foto receptores y neuronas ganglionares de la retina, principalmente a través del tracto retino-hipotalámico y actúa como un reloj interno. Este marcapasos maestro se localiza en el hipotálamo anterior, y se constituye por un núcleo pequeño bilateral (8,000 neuronas cada uno) adyacente al tercer ventrículo y que descansa sobre el quiasma óptico, por lo que se le denomina Núcleo Supraquiasmático (NSQ).

### **Mecanismo molecular de las oscilaciones en el NSQ**

El mecanismo molecular mediante el cual las neuronas del NSQ son capaces de oscilar, surge de la interacción de los productos proteínicos de cuatro genes principales, denominados genes reloj: *Clock*, *Bmal1*, *Per* y *Cry*. Las proteínas CLOCK y BMAL se heterodimerizan en el citosol y de esta manera son capaces de translocarse al núcleo celular y promover la transcripción de los genes *Per* y *Cry*. Las proteínas PER y CRY se acumulan en el citosol y también forman heterodímeros, que al ser fosforilados, son capaces de translocarse al núcleo celular e inhibir su propia transcripción al inhibir la actividad de CLOCK-BMAL1. A su vez la expresión cíclica de genes reloj, modifica la expresión de un vasto conjunto de otros genes, referidos como "genes controlados por reloj" y de esta manera el NSQ es capaz de modificar de manera rítmica tanto la fisiología como la conducta de los organismos (Refinetti, 2005; Sassone-Corsi, 1998).

### **El Sistema Circadiano**

Al conjunto de un oscilador o reloj auto sostenido (NSQ), una vía de sincronización aferente o vía de entrada (tracto retino-hipotalámico) y una vía de salida o eferente del ritmo manifestado por distintos parámetros (desde la liberación de factores neurohumorales hasta modificaciones en la conducta), se le denomina Sistema Circadiano (SC); (Hall, 1995). Sin embargo, las vías de salida implican también poner en fase a otros osciladores fuera del NSQ, denotados como osciladores periféricos.

## **Osciladores periféricos**

El SC también consta de la acción coordinada entre el NSQ y un conjunto de osciladores subordinados en órganos periféricos. Algunos de los órganos considerados como osciladores periféricos son el hígado, el corazón, las gónadas y el tejido graso (Bass y Takahashi, 2010). La coordinación entre el NSQ y los osciladores periféricos puede ser alterada ante condiciones no rítmicas o ritmos atípicos a los naturales, por ejemplo cuando los ciclos habituales de sueño-vigilia o de alimentación son modificados (Hastings *et al.*, 2003).

### **2.3 Oscilador sincronizado por Alimento**

#### **Antecedentes**

Para los organismos heterótrofos, la energía obtenida del alimento es indispensable para todas las reacciones metabólicas que mantienen la vida; es por ello que se han desarrollado estrategias para optimizar la adquisición e ingesta de estos sustratos energéticos, que tienen una disponibilidad sumamente variable en el ambiente.

#### **Regulación hipotalámica de la ingesta de alimentos**

La regulación de la ingesta de alimentos implica a varias regiones cerebrales, donde el hipotálamo tiene un papel preponderante. El hipotálamo incluye a varios núcleos o poblaciones neuronales que son necesarios para regular la ingesta de alimento y mantener un balance energético tanto a corto como a largo plazo. Se ha documentado que participan en esta función principalmente, los núcleos: Arqueado (ARC), Paraventricular (PVH), Dorsomedial (DMH), Ventromedial (VMH) y el área lateral hipotalámica (LHA) (Barsh y Schwartz, 2002). La función de algunos de estos núcleos fue descrita desde mediados del siglo XX en los estudios de Stellar, a partir de los cuales se generó la hipótesis del “centro-dual hipotalámico”, la cual propone que el VMH es el centro de la saciedad y el LHA el centro del hambre (Stellar, 1954).

Actualmente se reconoce al hipotálamo como uno de varios componentes de una red distribuida que controla aspectos múltiples de la conducta de ingesta. En relación directa con la regulación de la ingesta de alimento, en el ARC existen dos poblaciones diferentes de neuronas que son capaces de responder directamente ante señales humorales, por lo que se denominan de primer orden. La población neuronal localizada en la parte ventromedial del ARC, la cual expresa y libera al neuropéptido Y (NPY) y a la proteína r-Agouti (AgRP), se considera el sistema efector anabólico. Al activarse, estas neuronas promueven el incremento de las reservas energéticas y del peso corporal mediante un aumento en la ingesta de alimento y la reducción en el gasto energético. El sistema efector catabólico, está compuesto por neuronas de la porción dorso-lateral del ARC, las cuales expresan proopiomelanocortina (POMC) y liberan melanotropina ( $\alpha$ -MSH), lo que produce un decremento en las reservas energéticas y del peso corporal, mediante la reducción en la ingesta de alimento y un aumento en el gasto energético (Barsh y Schwartz, 2002).

Ambas poblaciones neuronales están influenciadas de manera opuesta por factores humorales. Hormonas como la leptina, insulina y el neurotransmisor serotonina estimulan al sistema efector catabólico e inhiben al sistema efector anabólico. Por otro lado, la hormona grelina tiene un efecto opuesto, inhibiendo al sistema efector catabólico y activando al anabólico. La respuesta coordinada de los sistemas efectores catabólico y anabólico ante factores que se generan fuera del ARC, se logra por la interacción directa entre las poblaciones neuronales dentro del mismo núcleo (NPY, POMC), ya que modulan su actividad de manera recíproca inversa (Schober *et al.*, 1996). Además el hipotálamo es una región cerebral de gran importancia para la regulación del balance energético global y el control, vía sistema nervioso autonómico, tanto de la adquisición como del gasto energético (Berthoud, 2002).

### **Sincronización al alimento y el Oscilador Sincronizado por Alimento**

Una estrategia fundamental para asegurar la adquisición e ingesta de alimento, es la capacidad de anticiparse a la disponibilidad periódica del mismo. Esta capacidad fue reportada por primera vez en el año de 1919 por el grupo de trabajo de Karl von Frisch, ya que al estudiar abejas notaron que éstas se acercaban a un desayunador todos los días en búsqueda de alimento en un mismo horario por la mañana, horario que coincidía con la llegada de jarabes y frutas para los comensales y que solo estarían disponibles por un par de horas al día. Es decir, que las abejas eran capaces de anticipar la disponibilidad de alimento con una precisión cronométrica, más tarde se demostró que las abejas solo podían anticipar los horarios de alimentación que se encontraban dentro del rango circadiano (Moore, 2001).

En mamíferos, fue Richter en 1922, quien reportó que esta anticipación es notoria en ratas cuando el acceso al alimento está en la fase habitual de reposo y por un lapso breve. De manera natural, la ingesta de alimento se encuentra coordinada con el ritmo circadiano de actividad locomotora dado por el NSQ, de tal forma que un animal suele alimentarse durante la fase de mayor actividad locomotora. Sin embargo, cuando el alimento se presenta únicamente en la fase habitual de reposo o de menor actividad locomotora, se hacen evidentes una serie de cambios conductuales que permiten asegurar la ingesta diaria durante este horario atípico de la disponibilidad de alimento. Posteriormente, se demostró que esta conducta anticipatoria responde a un oscilador circadiano referido como Oscilador Sincronizado por el Alimento (OSA), independiente del NSQ, ya que ratas con ablación bilateral del NSQ, que no son capaces de exhibir un ritmo circadiano de actividad locomotora sincronizado al fotoperiodo, conservan la capacidad de presentar un componente de la actividad locomotora (incluso en condiciones constantes de oscuridad) que se anticipa a la llegada del alimento o Actividad Anticipatoria al Alimento (AAA) (Stephan y Zucker, 1972; Stephan, 2002).

A la fecha no existe consenso en un locus neural para el OSA, pero el hipotálamo se ha relacionado ampliamente con la sincronización al alimento y la expresión de la AAA (Patton y Mistlberger, 2013; Stephan, 2002). En particular se ha señalado la participación de los núcleos ARC, PVH, DMH y Ventrolateral (VLH) en la expresión de la AAA (Angeles-Castellanos *et al.*, 2003; Saper y Fuller, 2007), la cual parece depender de las características del protocolo de restricción alimentaria y del grado de restricción calórica alcanzado (Gallardo *et al.*, 2014). Lo anterior puede implicar que los desórdenes metabólicos y el patrón de alimentación alterado, asociados con la condición de obesidad, tendrían un profundo efecto en la expresión del OSA.

## **2.4 Genes de expresión temprana en el Sistema Nervioso Central**

### **Genes de expresión temprana: proto-oncogén *c-Fos***

El proto-oncogén *c-Fos*, pertenece a la familia de factores de transcripción de expresión temprana que se caracterizan por una expresión rápida y transitoria en ausencia de la síntesis *de novo* de proteínas.

El término expresión temprana, fue utilizado originalmente para designar genes virales que iniciaban su transcripción de manera inmediata al integrarse en una célula huésped. Este término también es utilizado para describir a genes celulares que se expresan de manera inmediata en células en reposo ante la estimulación con factores extracelulares. La proteína FOS presenta un motivo tipo zíper de leucina que promueve la heterodimerización con miembros de la familia *Jun*, así como otro dominio de transactivación en el extremo carboxilo terminal.

Al dimerizar FOS con la proteína JUN, forman el factor de transcripción temprana AP-1, el cual está implicado en la regulación de la expresión de genes de expresión tardía, a su vez relacionada con cambios celulares a largo plazo ante diversos estímulos (Hoffman, 1993; Kovács, 1998; Morgan y Curran, 1991).

### **Mecanismo de inducción de *c-Fos***

La región regulatoria del gen *c-Fos* contiene elementos de respuesta *cis* y varios factores pueden inducir su expresión, entre ellos tenemos: factores neurotróficos, despolarización, incremento en el influjo celular de  $Ca^{2+}$  y la elevación de  $Ca^{2+}$  intracelular/intranuclear (Kovács, 1998). Los incrementos en AMPc provocan la fosforilación de CREB vía proteína cinasa-A, CREB actúa a través de los elementos de respuesta en el gen *c-Fos* (CRE), de esta manera se da la activación transcripcional y la transducción de señales. La región promotora de *c-Fos* también cuenta con una región AP-1, que se puede unir al heterodímero FOS/JUN y otros factores de transcripción que modulan de manera negativa su propia transcripción (Sassone-Corsi, 1998).

### **FOS como marcador de activación neuronal**

La expresión de *c-Fos* tiene dos características importantes por las cuales se le ha considerado como un buen marcador de activación neuronal: bajos niveles de transcripción en condiciones basales y la capacidad de ser inducido por un rango amplio de estimulación transcripcional/trans-sináptica (Kovács, 1998). Esta técnica se basa en la demostración de un aumento en la expresión del gen *c-Fos* ante la estimulación extracelular química o eléctrica. Por lo tanto, los patrones de expresión resultan sumamente útiles para lograr identificar los grupos neuronales que son activados por algún tratamiento experimental (Hoffman, 1993; Morgan y Curran, 1991).

### **Expresión de *c-Fos* durante la sincronización al alimento**

En diferentes estudios se han descrito los núcleos hipotalámicos que muestran cambios en los patrones de activación neuronal vista como la expresión del gen *c-Fos* durante la RA. Los núcleos hipotalámicos que muestran un aumento en la activación durante la RA son: ARC, DMH, LHA, VMN. De manera contraria, los núcleos que muestran una disminución en su activación durante la RA son: NSQ y PVN (Angeles-Castellanos *et al.*, 2003; Gallardo *et al.*, 2014).

Cabe resaltar que el aumento registrado durante la condición de RA en la activación de los núcleos ARC y DMH, persiste aun después de varios días en condiciones de alimentación *ad libitum* (Blum *et al.*, 2012; Gooley *et al.*, 2006; Mieda *et al.*, 2006). Por lo anterior la presencia de la proteína FOS es una herramienta muy útil para el estudio neuroanatómico-funcional de las regiones cerebrales involucradas con la sincronización por alimento y la expresión de la AAA.

Se ha propuesto que en condiciones de RA, es necesaria la inhibición de la actividad del NSQ para la expresión de AAA y que esta inhibición depende directamente de las proyecciones GABAérgicas que se originan en neuronas del DMH. Las lesiones en el DMH resultan en la pérdida parcial o disminución de la expresión de AAA y a su vez aumentan los niveles de activación basal en el NSQ. Además, la subsecuente lesión del NSQ, genera la recuperación en la expresión de la AAA (Acosta-Galván *et al.*, 2010).

### **3. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS**

#### **3.1 Obesidad y alteraciones del SC**

##### **Obesidad**

La obesidad es definida como una condición de desequilibrio crónico en la adquisición y el gasto de energía, caracterizada por la acumulación excesiva de grasa corporal (Carmona-Alcocer *et al.*, 2012).

Esta condición afecta la salud y es el factor principal de riesgo de las enfermedades que son las primeras causas de muerte en el mundo; como enfermedades cardiovasculares (hipertensión, hemorragias cerebrales), diabetes mellitus tipo 2, hiperlipidemias, problemas óseos y predisposición a ciertos tipos de cáncer, entre otras (OMS, 2011).

## **Índice de masa corporal y de Lee**

La cantidad de tejido adiposo, su distribución en el cuerpo y las consecuencias en la salud asociadas a ésta, pueden variar considerablemente entre individuos obesos. Para el ser humano, el índice de masa corporal (IMC) es un indicador simple de la relación entre el peso y la talla corporal, que es utilizado frecuentemente para identificar el sobrepeso y la obesidad. Este índice se calcula dividiendo el peso corporal en kilos por el cuadrado de su talla en metros ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ). De esta manera, los individuos que presentan un IMC menor o igual a 18 son considerados con bajo peso, de 18.5 a 24.9 en rango normal, de 25 a 29.9 con sobrepeso y por último son considerados obesos los individuos con un IMC mayor o igual a 30 (OMS, 2013).

En el caso de modelos animales y en particular roedores, para obtener una aproximación indirecta de la composición corporal se utiliza el índice de Lee. Este resulta un análogo del IMC para humanos, y se calcula multiplicando  $1 \times 10^4$  por el resultado de dividir la raíz cúbica del peso corporal del roedor en gramos, entre la longitud naso-anal en milímetros. Los roedores con un índice de Lee igual o menor a 285 son considerados en rango saludable de peso y para valores mayores o iguales a 310 se consideran obesos (Simson y Gold, 1982; Carmona-Alcocer *et al.*, 2012).

## **Alteraciones del SC relacionadas con obesidad**

El efecto de la obesidad se ha estudiado en diferentes modelos animales experimentales. Cuando la obesidad es inducida mediante la administración de una diete alta en grasas, los animales obesos presentan varias alteraciones del SC, entre ellas se encuentran: alargamiento del periodo del ritmo de actividad locomotora en libre curso, la atenuación del patrón diario de alimentación (aumentando el consumo diario de alimento) y una reducción en la amplitud de expresión de genes reloj en tejido adiposo e hígado (Kohsaka *et al.*, 2007). Lo anterior demuestra que la condición de obesidad impacta directamente al SC.

### **3.2 Modelos animales de obesidad y expresión de AAA**

En roedores durante la condición de obesidad, la expresión de AAA cambia de acuerdo a la manera en la que la obesidad fue inducida, lo que genera resultados contradictorios para un mismo protocolo de sincronización al alimento.

#### **Obesidad inducida genéticamente**

La leptina es necesaria para la regulación de la adiposidad corporal a través de su acción hipotalámica y su efecto aumentando la saciedad (Margetic *et al.*, 2002). En la rata Zucker obesa, deficiente del receptor funcional a leptina y que presenta una marcada hiperfagia, se observa un incremento tanto en la amplitud como la duración de la AAA, en comparación a las ratas silvestres delgadas (Mistlberger y Merchant, 1999).

#### **Obesidad inducida mediante dieta hipercalórica**

En la rata obesa por la administración de dieta hipercalórica, la amplitud y duración de la AAA se reduce en comparación a sus controles. Esta reducción no se debe a una disminución general en la actividad locomotora y además el promedio de peso corporal por grupo mostró una correlación negativa con la AAA, esta correlación fue más fuerte para la AAA en comparación con la actividad locomotora general (Persons *et al.*, 1993). No existen a la fecha reportes sobre los patrones de activación neural de núcleos hipotalámicos relevantes para la expresión de AAA en estos u otros modelos animales de obesidad.

### **3.3 El ratón de los volcanes *Neotomodon alstoni***

#### **Características generales de *Neotomodon alstoni***

El ratón de los volcanes *N. alstoni*, pertenece al orden Rodentia, familia Cricetidae y fue descrito por Merriam en 1898. Este roedor endémico del eje Neo volcánico Transversal de México, se distribuye entre los 2,500 y 4,500 msnm.

Esta especie es de hábitos nocturnos, en cautiverio inicia su actividad locomotriz cerca del apagado de la luz y la termina cerca del encendido de la misma, presentando la acrofase del ritmo de actividad locomotriz alrededor de las 23 horas (Aguilar, 2015). En cuanto a su tamaño, presenta una longitud corporal (sin contar la cola) de entre 10 a 13 cm, la longitud de la cola es de 8 a 11 cm. El peso corporal para ratones silvestres se encuentra entre los 30 a 40g y en condiciones de cautiverio, alrededor del 50% de individuos desarrollan obesidad alcanzando un peso corporal mayor a los 65g.

### ***N. alstoni* como modelo de obesidad**

*N. alstoni*, es un novedoso modelo animal experimental de obesidad en el que se han estudiado algunas de las alteraciones metabólicas que presentan los individuos obesos. Cerca del 50% de los ratones desarrollan obesidad de manera espontánea en condiciones estándar de vivario, a pesar de que toda la población es alimentada *ad libitum* (ADL) con una dieta estándar de mantenimiento para roedores de laboratorio (Rodent Lab Chow 5001, Purina).

La tendencia para desarrollar obesidad en *N. alstoni* es muy importante desde la perspectiva biológica, adaptativa y de regulación de la ingesta por el SNC, y representa una oportunidad para estudiar la expresión de la AAA en la condición de obesidad y su relación con los patrones de activación de los núcleos hipotalámicos implicados en esta función.

### **Efectos de la obesidad en *N. alstoni***

La obesidad tiene impacto en forma de trastornos metabólicos y humorales que a su vez afectan al SC sobre *N. alstoni* (Carmona-Alcocer *et al.*, 2012). En investigaciones previas se mostró que, durante un protocolo de RA, la expresión de AAA en ratones obesos de *N. alstoni* es menor respecto a lo registrado en ratones delgados (Luna-Illades *et al.*, 2014). Sin embargo, en el grupo de ratones obesos existe un aumento en la actividad locomotriz durante el acceso al alimento.

Ambos componentes conductuales (AAA y la actividad presentada por obesos durante el acceso de alimento) persisten en fase durante dos días en condiciones constantes (ayuno y oscuridad total), lo que hace suponer que ambos son regulados por un oscilador endógeno y auto-sostenido. Tales diferencias conductuales en el animal obeso en comparación con el delgado, pueden analizarse desde la perspectiva del patrón de activación neuronal hipotalámica durante la exposición de estos animales a condiciones de acceso restringido al alimento.

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

Debido a que la obesidad modifica la intensidad de la AAA dependiendo de la manera en que fue inducida, es de esperarse que haya cambios en la respuesta neuronal en esta condición. A la fecha no se han descrito los patrones de activación hipotalámica en animales obesos durante RA y existe controversia acerca de los núcleos hipotalámicos relacionados y/o necesarios para la expresión de la AAA (Gooley *et al.*, 2010; Landry *et al.*, 2006; Mieda *et al.*, 2006).

Existen muchas preguntas acerca de la naturaleza del OSA y los núcleos hipotalámicos relacionados y/o necesarios para la expresión de la AAA. En particular la expresión de la AAA es distinta de acuerdo con el modelo animal usado como referencia cuando se requiere estudiar la expresión del OSA durante la condición de obesidad. Este estudio nos permitirá conocer si la condición de obesidad, altera el proceso de integración de la información llevado a cabo por el hipotálamo sobre el estado energético global en el organismo para la manifestación del OSA. Lo anterior podría permitir distinguir las posibles alteraciones en los patrones de activación neuronal hipotalámica debidas al estado nutricional (durante alimentación *ad libitum*) y cuales se relacionan con la diferencias en la respuesta conductual de los ratones obesos ante un horario restringido de acceso al alimento.

Además, el modelo biológico empleado nos permitirá conocer algunas consecuencias fisiológicas de la sincronización de la actividad locomotriz al alimento, que pueden repercutir en aspectos de la biología y ecología de estos organismos.

## **5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿La condición de obesidad modificará los patrones de activación neuronal hipotalámica de ratones *N. alstoni* durante la expresión de AAA?

## **6. HIPÓTESIS**

La disminución en la expresión de AAA observada en obesos de *N. alstoni*, se correlaciona con una alteración en el patrón de activación hipotalámica. En particular se espera para el grupo de obesos una disminución tanto en la inhibición del NSQ como en la activación del ARC y DMH.

## **7. OBJETIVOS**

### **7.1 Objetivo General**

- Establecer si la disminución en la expresión de la AAA de ratones obesos se relaciona con una alteración en los patrones de activación neuronal hipotalámica (medida como la expresión de *c-Fos*) en centros encargados de la regulación circadiana y de la ingesta de alimento.

## 7.2 Objetivos particulares

Establecer las diferencias entre los ratones machos delgados y obesos en:

- Los patrones de actividad locomotriz durante un protocolo de restricción temporal del acceso al alimento.
- El consumo de alimento y la variación en el peso corporal durante las condiciones de alimentación *ad libitum* y de RA.
- La expresión de *c-Fos* en los núcleos hipotalámicos supraquiasmático, arqueado y dorsomedial durante las diferentes condiciones de alimentación.

## 8. MÉTODO Y MATERIALES

### 8.1 Obtención de animales y mantenimiento

Se formaron dos grupos de ratones macho adultos, un grupo delgados con un peso corporal promedio de  $45 \pm 1.8$ g (Índice de Lee  $\leq 285$ ) y grupo obesos con un peso corporal promedio de  $70 \pm 4.4$ g (Índice de Lee  $\geq 310$ ).

Ambos fueron sometidos a una condición basal de alimentación *ad libitum* (ADL) y un fotoperiodo controlado de 12 horas de luz por 12 de oscuridad (12:12 LO) en condiciones controladas de bioterio. El horario de iluminación se reporta como Tiempo de Zeitgeber (ZT) considerando a ZT0 como el encendido y ZT12 como el apagado de la luz. El consumo de alimento se registró cada tres horas en un ciclo de 24 horas durante ADL y posteriormente, durante la condición de restricción de alimento, de manera diaria. El protocolo de experimentación fue aprobado por el comité de Bioética del Instituto de Neurobiología y el manejo de los animales fue de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y la guía para cuidado y uso de animales de laboratorio del NIH.

## **8.2 Sistema de registro de actividad locomotora**

La información del registro automatizado de los cruces a través de un haz de luz infrarroja en interruptores adaptados en las jaulas de cada uno de los animales fue almacenada en una computadora mediante un programa de captura (ACTIBIO). La suma de los cruces al haz infrarrojo para cada 10 minutos, fue interpretada como actividad locomotora general.

## **8.3 Restricción de alimento**

Después de al menos 3 semanas en ADL, se sacrificó un grupo control (n=3) en ZT5, para cada grupo experimental (delgados y obesos). Otros grupos se introdujeron gradualmente a la restricción alimentaria, mediante la disminución diaria de 4 horas al acceso de alimento durante cinco días (IRA), hasta alcanzar un lapso de sólo 5 horas diarias de acceso al alimento a partir de ZT5 (RA).

La etapa de sincronización al alimento (RA), corresponde a la restricción del acceso al alimento a sólo 5 horas diarias durante la fase habitual de reposo de los animales (ZT5 –ZT10). Después de dos semanas en RA, los ratones de cada grupo fueron sacrificados en los horarios de ZT5 (n=4) y ZT6 (n=3) mediante la administración intraperitoneal de pentobarbital sódico (90mg/kg) y subsecuente perfusión vía aorta ascendente con solución salina (100ml, pH 7, 10°C) seguida de paraformaldehído (PFA) al 4% 0.1M (120ml, pH 9.5, 10°C). Se recuperaron los cerebros y fueron post-fijados durante 24h siendo inmersos en PFA. Después fueron crio-protegidos en una solución de sacarosa al 30% durante 48h a 4°C.

#### **8.4 Inmunohistoquímica: histología, detección de FOS**

Después de ser crio-protegido, el cerebro de los ratones fue cortado en secciones coronales de 30 micras de espesor con la ayuda de un micrótopo de congelación (Leica), las secciones fueron colectadas en serie (1 en 5) y fueron mantenidas en una solución anticongelante a una temperatura de -20°C hasta su posterior tratamiento por inmunohistoquímica (IHQ).

La detección IHQ de la proteína FOS se realizó usando un anticuerpo policlonal (1:8000, Santa Cruz Biotechnology EUA), inducido en conejo contra la región amino terminal de la proteína FOS humana. El método de inmunohistoquímica fue realizado en flotación, con una incubación de 48h en el anticuerpo primario a 4 °C. El revelado de la proteína FOS se realizó usando la técnica de la peroxidasa asociada con avidina-biotina (Hoffman). Una vez revelado con diaminobenzidina y peróxido de hidrogeno, se montó el tejido en portaobjetos gelatinados y se dejó secar durante 48h. Las laminillas se sometieron a un proceso de deshidratación y aclaramiento mediante el uso de un tren ascendente de soluciones de alcohol durante 1 minuto y una inmersión en xileno durante 5 minutos para finalmente ser cubiertas con resina sintética (DPX) y un cubreobjetos. Las preparaciones se dejaron secar durante 48 horas antes de ser observadas al microscopio óptico (ZEISS AX10) para su fotografiado y posterior análisis.

#### **8.5 Análisis de datos**

Para el análisis de la actividad libre en jaula y AAA, se generaron actogramas mediante el software ACTIVIEW (Mini mitter Co., Inc, USA) y Chronos-Fit (Zuther y Lemmer, 2009). Para evaluar la presencia de FOS, se utilizó un microscopio óptico (Zeiss AX10) con el que se tomaron 3 fotomicrografías representativas de cada uno de los núcleos hipotalámicos de interés basados en un atlas estereotáxico de ratón (Keith *et al.*, 2008).

Se realizó un conteo unilateral de cada núcleo con la ayuda del programa ImageJ. Para cada núcleo hipotalámico se definió un área de interés (NSQ  $1,600\mu\text{m}^2$ , DMH  $1,750\mu\text{m}^2$ , ARC  $1,650\mu\text{m}^2$ ). El conteo fue manual tomando en cuenta las células con una marca franca y dentro del área de interés. Se obtuvo la suma de células totales positivas a FOS (FOS+) para cada animal y fueron promediados por grupo experimental, el cual se presenta como promedio  $\pm$  error estándar.

El análisis estadístico se realizó con el paquete GraphPad Prism 7. Las comparaciones entre animales delgados y obesos se realizaron con una prueba ANOVA de dos vías para medidas independientes considerando los factores “peso corporal” y “régimen de alimentación”; y se realizó una prueba de Bonferroni o t de Student para comparar parejas de grupos. Los análisis para la actividad locomotriz se realizaron con los datos de los últimos 5 días de cada condición.

## 9. RESULTADOS

### 9.1 Actogramas

En la Figura 1 se muestran actogramas representativos del grupo de ratones delgados (a) y obesos (b). Los primeros 6 días corresponden a la actividad en condiciones basales, los siguientes 5 días corresponden a la introducción a la RA y los últimos 14 días a la RA, condición en la que se representa con un rectángulo rojo el horario de acceso al alimento (ZT5-ZT10). Se puede observar una disminución en la expresión de AAA para el grupo de ratones obesos.

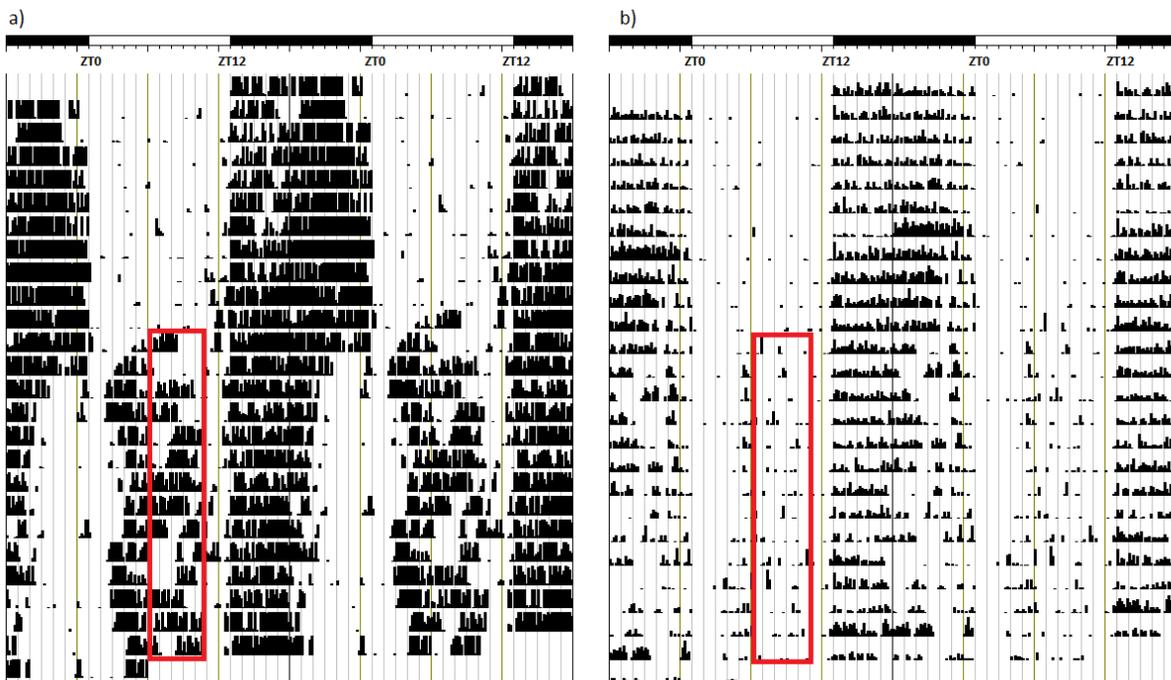


Figura 1. Actogramas representativos del grupo de ratones delgados (a) y obesos (b). El fotoperiodo está representado por las barra horizontal superior blanca (luz) y negra (oscuridad), las columnas de izquierda a derecha representan las horas a lo largo del registro y los renglones los días consecutivos del registro. El rectángulo rojo representa la disponibilidad de alimento (ZT5-ZT10) durante la RA. Se observa una disminución en la AAA para el grupo de ratones obesos.

### 9.3 Peso corporal

La Figura 2 muestra el peso corporal promedio para ambos grupos tanto en la condición ADL (barras claras) como en RA (barras oscuras). En la condición ADL el peso corporal es mayor para el grupo de obesos, pero éste disminuye (22% en comparación con su control) en la condición de RA y ya no muestra diferencias respecto al peso registrado para el grupo de ratones delgados. Al inicio del protocolo de RA los ratones delgados disminuyeron su peso corporal, pero al cabo de dos semanas en esta condición ya no había diferencias respecto al peso corporal registrado en la condición ADL.

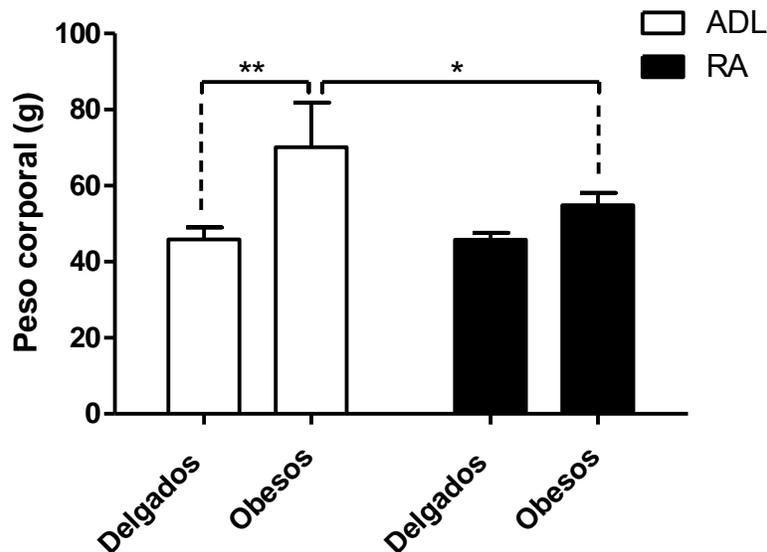


Figura 2. Gráfica de barras para el peso corporal promedio. Se observa un mayor peso corporal para los ratones obesos en la condición ADL respecto al registrado para los ratones delgados. Después de 14 días en la condición de RA el peso corporal ya no presenta diferencias entre grupos, cabe resaltar que el peso no varía para el grupo de ratones delgados durante las diferentes condiciones de alimentación ( $n=7$ ,  $p^*<0.05$ ,  $**p<0.01$ ).

#### 9.4 Consumo de alimento

La Figura 3 muestra el promedio para el consumo diario de alimento durante la condición ADL (barras claras) y RA (barras oscuras) para ambos grupos. En la condición ADL los ratones obesos presentan un mayor consumo en comparación con el grupo de ratones delgados (aumento del 74%), pero durante la condición de RA esta tendencia se invierte y los ratones obesos disminuyen su consumo drásticamente (53% de lo consumido en ADL). Es notable que los ratones delgados no presentan diferencias en el consumo después de los primeros 5 días de RA comparado con el consumo en la condición ADL. Para los ratones obesos, incluso después de 14 días en la condición de RA, el consumo de alimento se mantiene reducido respecto al registrado en la condición control.

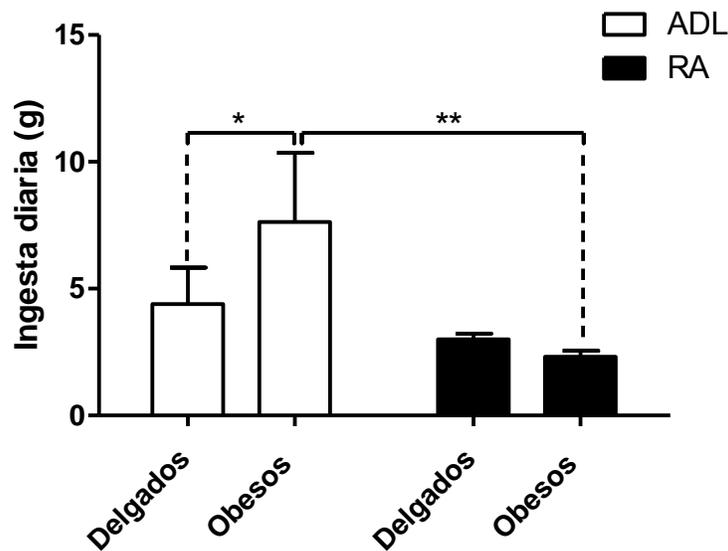


Figura 3. Gráfica de barras para consumo promedio de alimento. Se observa un mayor consumo para los ratones obesos en la condición ADL respecto al registrado para los ratones delgados. Después de 14 días en la condición de RA el consumo de alimento ya no presenta diferencias entre grupos, cabe resaltar que para el grupo de ratones delgados después de 4 días en RA el consumo de alimento ya no presenta diferencias respecto al registrado en ADL ( $n=7$ ,  $**p<0.01$ ).

## 9.5 Actividad locomotora

En la gráfica de la Figura 4 se muestra la actividad promedio por cada 10 minutos para ambos grupos durante ZT2 a ZT5 en condiciones ADL (barras claras) y RA (barras oscuras). En la condición de RA se puede observar un aumento en la actividad del grupo de ratones delgados, respecto a la condición ADL, el cual no es observado en el grupo de ratones obesos; esta actividad corresponde a la expresión de la AAA.

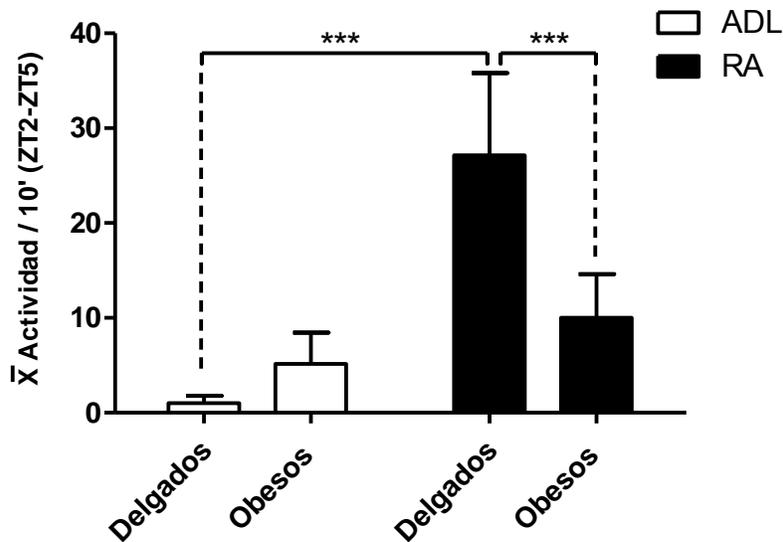


Figura 4. Gráfica de barras para el promedio de actividad locomotora cada 10 minutos de ZT2 a ZT5. Se observa un aumento en la actividad para el grupo de ratones delgados en la condición de RA respecto al registrado en la condición ADL. Para el grupo de ratones obesos no se observan cambios entre las diferentes condiciones, pero sí una disminución en la actividad durante la condición de RA respecto a lo registrado para el grupo de ratones delgados, esta actividad representa la expresión de AAA. ( $n=7$ ,  $***p<0.001$ ).

## 9.6 Presencia de FOS en el hipotálamo

En las Figuras 5, 6 y 7 se muestran fotomicrográficas representativas de la presencia de FOS en cada uno de los diferentes núcleos hipotalámicos de interés y una gráfica con el promedio de FOS+ para cada grupo y condición de alimentación durante ZT5.

### Núcleo Supraquiasmático

En el NSQ, los ratones obesos muestran una tendencia hacia la disminución en la presencia de la proteína FOS sin importar la condición de alimentación (Figura 5). En el grupo de ratones delgados durante la RA la activación de este núcleo disminuye un 60% respecto a lo registrado durante la condición control, esto es consistente con la expresión de AAA para el grupo de ratones delgados, ya que anteriormente se ha reportado que es necesaria una disminución en la activación del NSQ para permitir la expresión de esta conducta (Acosta-Galván *et al.*, 2011). Mientras que en el grupo de ratones obesos, la presencia de FOS no se modifica por durante la RA.

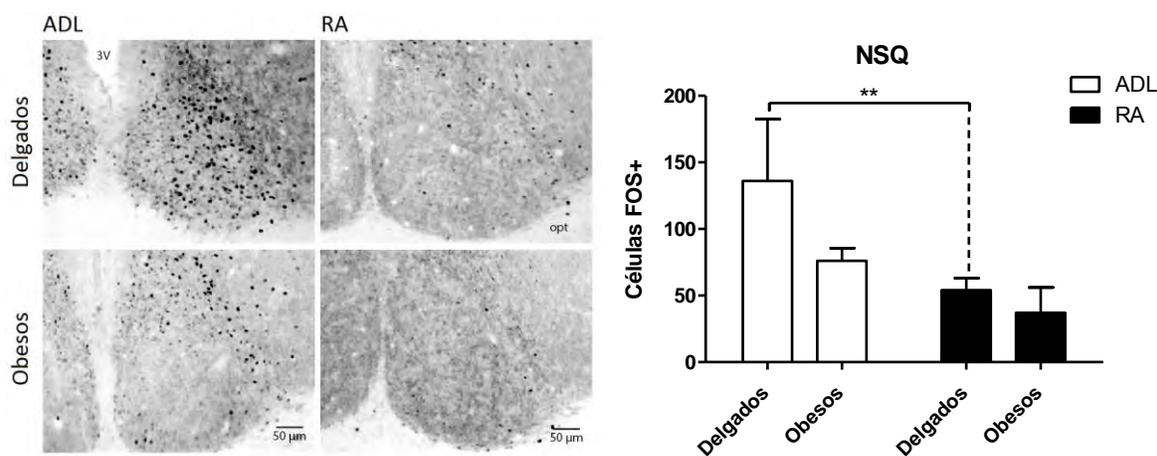


Figura 5. A la izquierda se muestran fotomicrográficas representativas para el patrón de activación en el NSQ para el grupo delgados (superior) y obesos (inferior) durante las diferentes condiciones de alimentación. La gráfica de barras a la derecha muestra que la activación en este núcleo tiende a ser menor para los ratones obesos durante la condición

control y además durante la RA se observa una disminución en la activación únicamente en el grupo de ratones delgados ( $n=4$ ,  $**p<0.01$ ).

### Núcleo dorsomedial hipotalámico

El patrón de activación para el núcleo dorsomedial hipotalámico en el grupo de ratones obesos no muestra diferencias debidas a la condición de alimentación (Figura 6), de una manera similar a lo registrado para el NSQ. Por otro lado, en el grupo de ratones delgados se registra un aumento en la activación del DMH en la condición de RA. El aumento en la actividad de este núcleo se podría relacionar con la disminución de la activación registrada para el NSQ durante la RA en el grupo de ratones delgados.

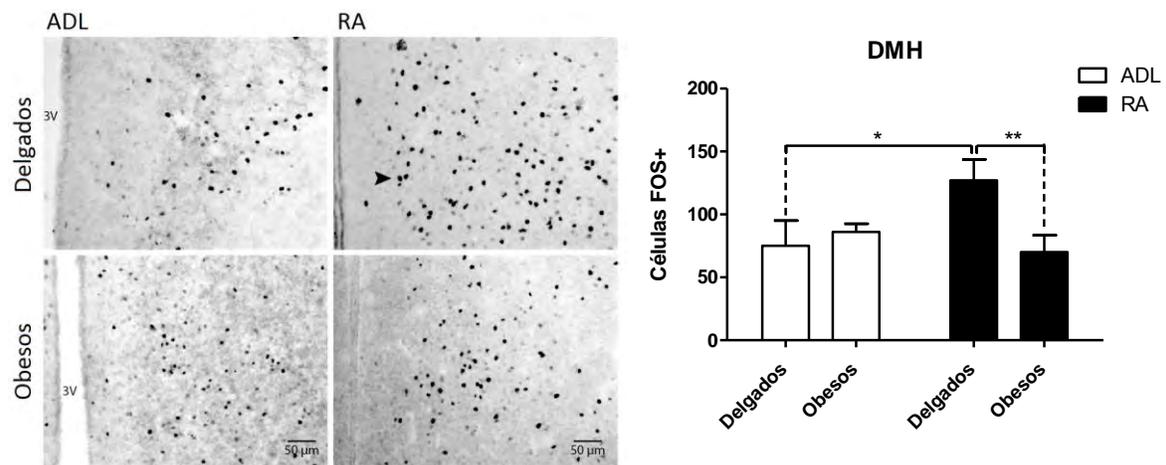


Figura 6. A la izquierda se muestran fotomicrográficas representativas para el patrón de activación en el DMH para el grupo de ratones delgados (superior) y obesos (inferior) durante las diferentes condiciones de alimentación. En la gráfica de barras a la derecha se puede observar un aumento para la activación de este núcleo en la condición de RA para el grupo de ratones delgados, la cual no se presenta en el grupo de ratones obesos ( $n=4$ ,  $*p<0.05$ ,  $**p<0.01$ ).

## Núcleo arqueado hipotalámico

La respuesta ante la condición de RA en el núcleo arqueado hipotalámico es clara para el grupo de ratones delgados, en el que se observa un aumento en la activación (Figura 7), éste aumento no es observado en el grupo de ratones obesos, aunque se observa una tendencia hacia una mayor activación en la condición de alimentación *ad libitum* para este grupo, lo cual se podría relacionar con los reportes previos de un aumento en el consumo diurno de alimento durante la condición de obesidad (Kohsaka *et al.*, 2007).

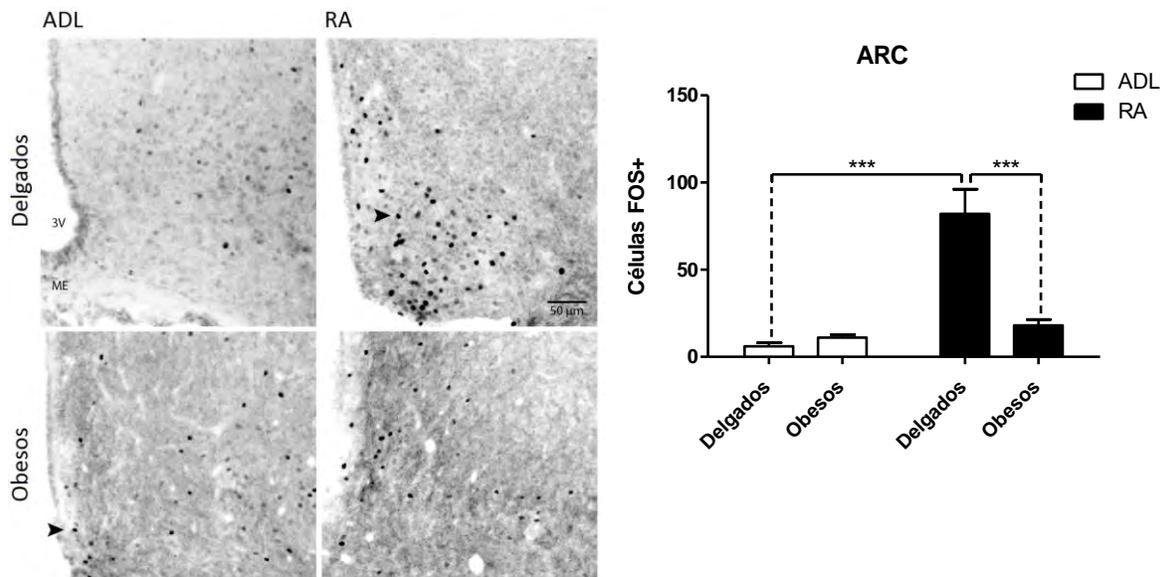


Figura 7. A la izquierda se muestran fotomicrografías representativas para el patrón de activación en el ARC para el grupo delgados (superior) y obesos (inferior) durante las diferentes condiciones de alimentación. En la gráfica de barras a la derecha se puede observar un aumento para la activación de este núcleo en la condición RA para el grupo de ratones delgados ( $n=4$ ,  $***p<0.001$ ), en el caso de los ratones obesos no hay diferencias por la condición de alimentación.

### 9.7 Presencia de FOS en estructuras extra-hipotalámicas

No obstante que este trabajo se habría delimitado inicialmente al análisis por IHQ de núcleos hipotalámicos, es conveniente resaltar que en áreas relacionadas con el sistema límbico también se muestran diferencias entre grupos en la condición de RA. En el grupo de ratones obesos se observa una disminución generalizada en la presencia de la proteína FOS durante la RA. Lo anterior se muestra en las microfotografías de las Figuras 8 y 9, en la que regiones como el giro dentado del hipocampo o la corteza cingulada, muestran un claro aumento en la activación neuronal durante la condición de RA exclusivamente en el grupo de ratones delgados.

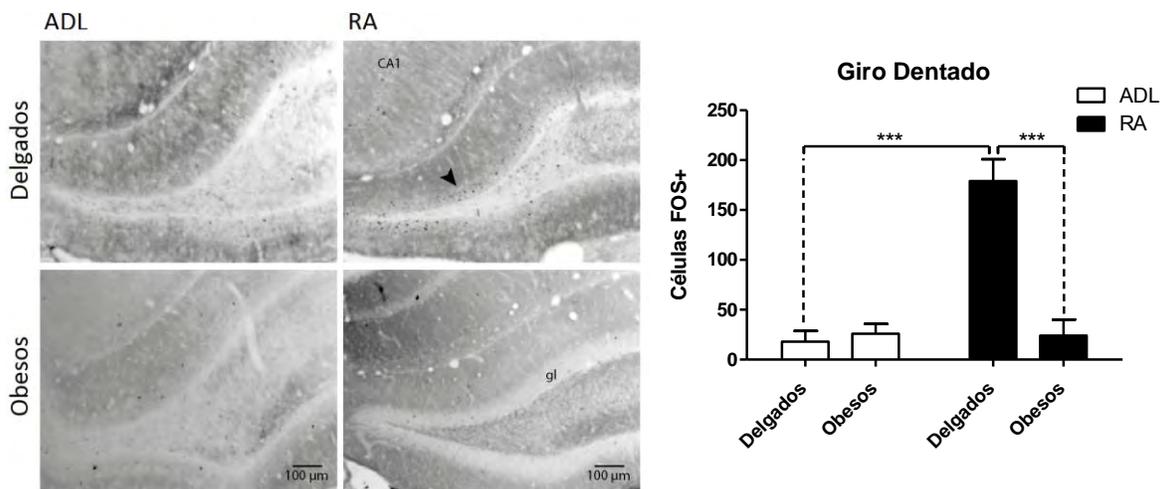


Figura 8. A la izquierda fotomicrografías del giro dentado del hipocampo representativas del grupo de ratones delgados (fila superior) y obesos (fila inferior) durante las diferentes condiciones de alimentación. En la gráfica de barras de la derecha se observa un incremento en la activación neuronal exclusivamente en el grupo de ratones delgados durante la RA, ( $n=4$ ,  $***p<0.001$ )

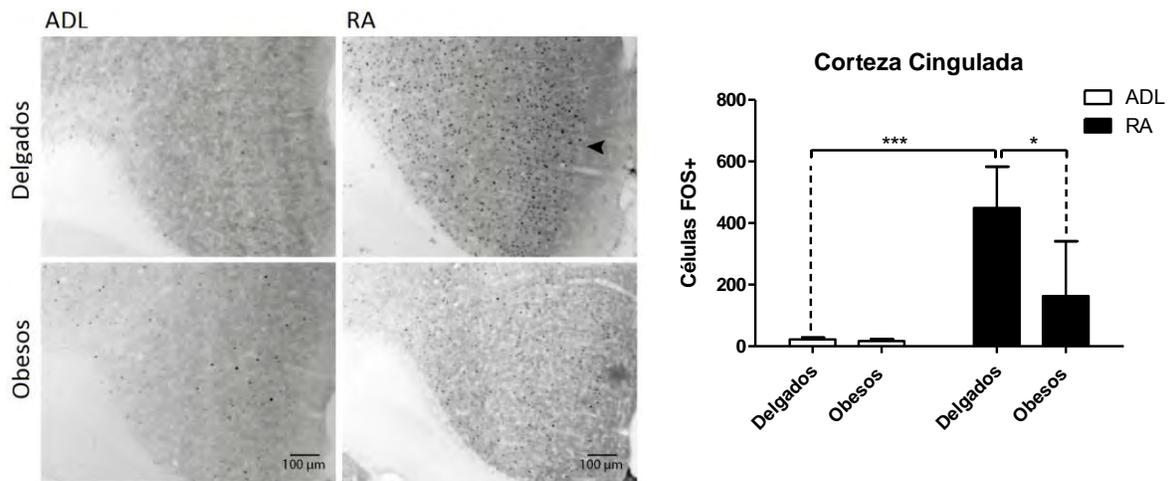


Figura 9. A la izquierda fotomicrografías de la región 2 de la corteza cingulada que representan al grupo de ratones delgados (fila superior) y obesos (fila inferior). Se observa un incremento en la activación neuronal exclusivamente en el grupo de ratones delgados durante la RA.

## 10. DISCUSIÓN

En este estudio se exploró la hipótesis en la que una disminución en la expresión de AAA en ratones obesos puede asociarse a una alteración en los patrones de activación de núcleos hipotalámicos que forman parte del OSA, esta hipótesis se confirmó y además también se observaron diferencias en el patrón de activación de estructuras cerebrales que no son consideradas necesarias para la sincronización y expresión de la AAA como el hipocampo y la corteza cingulada (Mistlberger y Mumby, 1992), elementos que forman parte del sistema límbico, y que por los datos obtenidos pueden estar relacionados con la modulación en la expresión de AAA.

En particular dos regiones hipotalámicas mostraron un patrón diferencial de activación entre grupos durante la expresión de AAA, el DMH y el ARC. Ambos núcleos están relacionados con la regulación de la ingesta de alimento y para el caso del DMH también con la regulación del estado de alerta o vigilia (Adamantidis y Lecea, 2008). La reducción registrada en obesos para la activación del DMH provocaría a su vez una disminución en la activación de las neuronas orexinérgicas del LHA, activación necesaria para promover la vigilia y el estado de alerta (Chemelli *et al.*, 1999; Mieda *et al.*, 2004) que permite iniciar la expresión de la AAA (Akiyama *et al.*, 2004) .

Lo anterior fue muy claro al observar la conducta de ambos grupos durante la RA, los ratones obesos no se mostraban alerta ni activos en las 3 horas previas a la llegada del alimento, a diferencia de los ratones delgados los cuales mostraban un estado de alerta y excitación generalizado. La conducta indicaría que los ratones obesos no estaban preparados para la llegada del alimento en la condición de RA y en consecuencia el consumo de alimento para este grupo disminuyó drásticamente, como se puede observar en la Figura 3, mientras que en el grupo de ratones delgados el consumo de alimento solo disminuyó al inicio de la condición de RA (primeros 4 días), ya que después del quinto día y hasta terminar el protocolo de RA, el consumo de alimento ya no mostró diferencias respecto al consumo en la condición ADL.

El segundo núcleo hipotalámico que mostró diferencias en el patrón de activación fue el ARC (Figura 7), el cual recibe información directa de señales humorales como la grelina y leptina (Gao y Horvath, 2007). Anteriormente se ha reportado que en ratones machos C57BL/6 en los que es inducida obesidad por dieta hipercalórica, la concentración plasmática de estas señales metabólicas se encuentra alterada y en particular el aumento en las concentraciones de leptina provoca una alteración del ritmo circadiano de sensibilidad y una disminución en la respuesta de las aferencias vagales ante la estimulación mecánica del estómago por la ingesta de alimento (de Lartigue *et al.*, 2011; Kentish *et al.*, 2015). Los ratones obesos *N. alstoni* también presentan niveles aumentados de leptina en sangre (Carmona-Alcocer *et al.*, 2012), por lo que una posible alteración en la sensibilidad gástrica ante estímulos mecánicos podría relacionarse en la condición ADL con la hiperfagia registrada y durante la RA con la disminución en la expresión de AAA, similar al efecto que tiene la vagotomía subdiafragmática o la deaferentación visceral por administración de capsaicina (Comperatore y Stephan, 1990; Davidson y Stephan, 1998;), disminuyendo la amplitud y aumentando el número de ciclos necesarios en la condición de RA para lograr la expresión de la AAA.

En cuanto a la señalización por grelina, se ha reportado que durante la condición de obesidad (dieta hipercalórica) tanto la concentración plasmática de la hormona como la respuesta orexigénica ante la administración sistémica de grelina exógena están disminuidas, además de alteraciones en la modulación de la secreción ante el ayuno y la re-alimentación (Perreault *et al.*, 2004; Briggs *et al.*, 2010; Lamont *et al.*, 2014). A su vez los ratones deficientes del receptor funcional para grelina que son sometidos a condiciones de RA, muestran una disminución en la expresión de AAA (Davis *et al.*, 2011). De acuerdo a los datos obtenidos en este estudio, la disminución durante la RA en la activación de la zona ventromedial del ARC (Figura 7) de ratones obesos, puede deberse a una deficiencia en la señalización de grelina en SNC, lo que podría explicar la reducción en el consumo de alimento y en la expresión de AAA, pero no la hiperfagia presentada durante la condición ADL.

La disminución observada durante la RA, en la activación del sistema efector anabólico de ratones obesos puede deberse a alteraciones en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica a factores humorales, modificaciones en la dinámica de receptores neuronales y el daño a los órganos circunventriculares hipotalámicos por la inflamación crónica presente en la condición de obesidad (Gomez *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2014; Reis *et al.*, 2015; Thaler *et al.*, 2012). Determinar de manera puntual cual es el factor preponderante no está en el alcance de este trabajo, pero cabe resaltar que además de todas las alteraciones propuestas en la señalización central de factores humorales, también existe la posibilidad de un mecanismo a la fecha no descrito, el cual permita modular la expresión de la AAA de acuerdo a la relación de fase que guarde la disponibilidad de alimento con el fotoperiodo y a la cantidad de reservas energéticas disponibles en el organismo.

De esta manera se podría lograr una adaptación estacional para modular la conducta de forrajeo (AAA) con una alta precisión temporal durante las diferentes temporadas en la que los recursos son escasos o abundantes. Además la interacción del OSA y el NSQ se ha demostrado gracias a estudios en los que la ablación del NSQ no afecta la capacidad de sincronización de la actividad locomotora a la disponibilidad de alimento, pero si se modifican la amplitud y los límites de sincronización de la AAA (Stephan *et al.*, 1979; Patton *et al.*, 2013).

Por otro lado, la tendencia hacia una reducción en la activación del NSQ observado en el grupo de ratones obesos (Figura 5) puede relacionarse con el aumento en el consumo de alimento registrado en este grupo durante la condición ADL (73% más respecto delgados), ya que en reportes previos se ha demostrado que la disrupción del sistema circadiano y el consumo de alimento en fases circadianas inapropiadas (resultados preliminares indican que los obesos de *N. alstoni* tienen un mayor consumo diurno de alimento) provocan resistencia a la insulina, dislipemias, aumento de peso corporal y obesidad (Turek *et al.*, 2005; Scheer *et al.*, 2009; Shimba *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2013).

En ratones obesos *N. alstoni* la reducción en la actividad locomotora general en condición de alimentación ADL se ha reportado exclusivamente en hembras (Carmona-Alcocer *et al.*, 2012). Para descartar un efecto de la reducción de la actividad general en la expresión de la AAA, se normalizaron los niveles de actividad por grupo (delgados y obesos), y el porcentaje de la actividad total que corresponde a las 3 horas previas de la llegada del alimento durante la condición de RA (AAA), es tan solo del 2% en el grupo de ratones obesos en comparación con el 12% que presentaron los ratones delgados. Por lo anterior, la reducción en la expresión de AAA en los ratones obesos no se debe a la reducción general en la actividad locomotora.

Durante la RA, el consumo de alimento en los obesos disminuye drásticamente, y a su vez también disminuye el peso corporal en un 38% en tan solo dos semanas. La pérdida de peso en los ratones obesos se debe principalmente al catabolismo de los ácidos grasos almacenados en el tejido adiposo y la síntesis de cuerpos cétonicos para ser utilizados como sustratos energéticos durante el ayuno provocado durante la RA (Yu, 2015).

Recientemente, se ha propuesto a la liberación de beta hidroxibutirato como una parte de las señales metabólicas necesarias desde el hígado hasta el sistema nervioso central que permite la expresión de AAA (Chavan *et al.*, 2016). Pero no solo basta con un aumento en las concentraciones plasmáticas de este metabolito, como podría suceder después de un ayuno prolongado, hace falta que el pico máximo en la concentración de beta hidroxibutirato preceda a la disponibilidad periódica de alimento, por lo tanto, es necesario que la expresión de genes reloj en el hígado este sincronizada al horario de alimentación, ya que el hígado es el principal generador de este metabolito. Posiblemente en ratones obesos el incremento en las concentraciones de triglicéridos en plasma y la disrupción circadiana en el metabolismo de carbohidratos y lípidos no permiten que la señalización del beta hidroxibutirato se lleve a cabo en fase y amplitud adecuada durante la RA, provocando una disminución en la expresión de AAA.

Cabe resaltar que a la fecha no se ha reportado la presencia de receptores específicos para beta hidroxibutirato en el SNC, lo que podría indicar que la vía de señalización del beta hidroxibutirato está limitada a las aferencias y eferencias del sistema nervioso simpático (Young y Landsberg, 1977; Kimura *et al.*, 2011).

Por otro lado, desde una perspectiva ecológica y de adaptación, la reducción de la expresión de AAA en el grupo de ratones obesos podría disminuir el riesgo de ser depredado al expresar la conducta de forrajeo en una fase temporal inadecuada para esta especie de hábito nocturno. Suponiendo que un organismo estuvo expuesto a una etapa de abundancia de recursos en la que logró aumentar las reservas energéticas (en forma de tejido adiposo) y por lo tanto el peso corporal, la inhibición en la conducta de forrajeo resultaría ventajosa si la disponibilidad de recursos cambia repentinamente y se ven drásticamente disminuidos (equivalente a la RA).

Al disminuir la conducta de forrajeo, disminuye el gasto energético lo que permitiría aumentar el tiempo de supervivencia del organismo utilizando las reservas energéticas previamente almacenadas, y disminuir de manera paulatina el peso corporal, aumentando la agilidad y cripsis del organismo. Lo anterior no solo disminuiría la probabilidad de ser depredado durante el forrajeo, también aumentaría la probabilidad de un cambio en la disponibilidad de recursos, que al restablecerse permitirían reanudar la conducta de forrajeo exclusivamente en la fase circadiana adecuada. Tal vez esta especie emplea dos estrategias para contender con los cambios estacionales en la disponibilidad de alimento, la de machos delgados manteniendo bajas reservas energéticas y alta capacidad locomotora (asegurando el consumo diario de alimento) y la de obesos aumentando las reservas energéticas y disminuyendo el gasto energético aumentando los tiempos de ayuno, hasta que la disponibilidad de alimento se restablezca.

## 11. CONCLUSIONES

- La obesidad en ratones *N. alstoni* machos modifica los patrones de activación hipotalámica durante la RA.
- En la condición ADL la disminución en la activación neuronal en el NSQ y la disrupción circadiana podrían contribuir al incremento en el consumo de alimento y la excesiva acumulación de grasa en los ratones obesos
- La reducción en la expresión de AAA se relaciona con la reducción en el consumo de alimento y la pérdida de peso en ratones obesos durante la RA.

## 12. REFERENCIAS

- Acosta-Galvan, Chun-Xia Yi, Jan van der Vliet, Jack H. Jhamandas, Pertti Panula, Manuel Angeles-Castellanos, María del Carmen Basualdo, Carolina Escobar, Ruud M. Buijs (2011). "Interaction between hypothalamic dorsomedial nucleus and the suprachiasmatic nucleus determines intensity of food anticipatory behavior" *Proc Natl Acad Sci USA*. 108(14), pp. 5813–5818.
- Adamantidis, A. y de Lecea, L. (2008). "Sleep and metabolism: shared circuits, new connections" *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 19(10), pp. 362-370.
- Aguilar-López M., Rojas-Martínez A. E., Cornejo-Latorre C., Sánchez-Hernández C., Vite-Silva V. D., Ramos-Frías J. (2015). Registros notables de mamíferos terrestres del estado de Hidalgo, México. *Acta zoológica mexicana*, 31(3), pp. 403-411.
- Akiyama M., Yuasa T., Hayasaka N., Horikawa K., Sakurai T. y Shibata S. (2004). "Reduced food anticipatory activity in genetically orexin (hypocretin) neuron-ablated mice". *European Journal of Neuroscience*, 20(11), pp.3054-3062.
- Angeles-Castellanos M. Aguilar-Roblero y Escobar C. (2003) "c-Fos expression in hypothalamic nuclei of food-entrained rats" *AJP-Regul Integr Comp Physiol* 286: pp. 158–165.
- Barsh G. S., y Schwartz M. W. (2002). "Genetic approaches to studying energy balance: perception and integration". *Nature Reviews Genetics*, 3(8), pp. 589-600.
- Bass J. y Takahashi J. S. (2010). "Circadian integration of metabolism and energetics" *Science*. 330(6009), pp.1349–1354.
- Berthoud H. R. (2002). "Multiple neural systems controlling food intake and body weight" *Neurosci Biobehav Rev*; 26(4): pp. 393-428.
- Blum, I. D., Lamont, E. W., Rodrigues, T., y Abizaid, A. (2012). "Isolating neural correlates of the pacemaker for food anticipation" *PLoS One*, 7(4).
- Briggs D. I., Enriori P. J., Lemus M. B., Cowley M. A., y Andrews Z. B. (2010). "Diet-induced obesity causes ghrelin resistance in arcuate NPY/AgRP neurons" *Endocrinology*, 151(10), pp.4745-4755.
- Carmona-Alcocer V. (2012). Variaciones en la capacidad de sincronización no paramétrica producidas por la obesidad, en el ritmo de actividad locomotriz en el ratón de los volcanes *Neotomodon alstoni*. Tesis, Doctorado en Ciencias Biomédicas. UNAM. 112pp.

- Carmona-Alcocer V., Fuentes-Granados C., Carmona-Castro A., Aguilar-González I., Cárdenas-Vázquez R. y Miranda-Anaya, M. (2012). "Obesity alters circadian behavior and metabolism in sex dependent manner in the volcano mouse *Neotomodon alstoni*" *Physiology & behavior*. 105(3), pp.727–733.
- Chavan R., Feillet C., Costa S. S. F., Delorme J. E., Okabe T., Ripperger J. A., y Albrecht U. (2016). "Liver-derived ketone bodies are necessary for food anticipation" *Nature communications*, 7.
- Chemelli R. M., Willie J. T., Sinton C. M., Elmquist J. K., Scammell T., Lee C., y Fitch T. E. (1999). "Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation" *Cell*, 98(4), pp. 437-451.
- Comperatore C. A., y Stephan F. K. (1990). "Effects of vagotomy on entrainment of activity rhythms to food access" *Physiology & behavior*, 47(4), pp.671-678.
- Davidson A. J. y Stephan F. K. (1998). "Circadian food anticipation persists in capsaicin deafferented rats" *Journal of biological rhythms*, 13(5), pp.422-429.
- Davis J. F., Choi D. L., Clegg D. J., y Benoit S. C. (2011). "Signaling through the ghrelin receptor modulates hippocampal function and meal anticipation in mice" *Physiology & behavior*, 103(1), pp.39-43.
- De Lartigue G., de la Serre C. B., Espero E., Lee J., y Raybould H. E. (2011). "Diet-induced obesity leads to the development of leptin resistance in vagal afferent neurons" *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 301(1), pp.187-195.
- Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012, <http://ensanut.insp.mx/>
- Froy O. (2010). "Metabolism and circadian rhythms--implications for obesity" *Endocrine Reviews*. 31(1), pp.1–24.
- Gao, Q. y Horvath, T. L. (2007). "Neurobiology of feeding and energy expenditure" *Annu. Rev. Neurosci.*, 30, pp. 367-398.
- Gallardo CM, Hsu CT., Gunapala KM., Parfyonov M., Chang CH. (2014) "Behavioral and Neural Correlates of Acute and Scheduled Hunger in C57BL/6 Mice". *PLoS ONE*. 9(5).
- Gome, G., Han S., Englander E. W., y Greeley G. H. (2012). "Influence of a long-term high-fat diet on ghrelin secretion and ghrelin-induced food intake in rats" *Regulatory peptides*, 173(1), pp.60-63.

- Gooley, J. J., Schomer, A., y Saper, C. B. (2006). "The dorsomedial hypothalamic nucleus is critical for the expression of food-entrainable circadian rhythms" *Nature neuroscience*, 9(3), pp. 398-407.
- Gutiérrez JP., Rivera-Dommarco J., Shamah-Levy T., Villalpando-Hernández S., Franco A., Cuevas-Nasu L., Romero-Martínez M., Hernández-Ávila M. (2012) Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012, Resultados Nacionales. Instituto Nacional de Salud Pública. Cuernavaca, México 45pp.
- Hall J. C. (1995). "Tripping along the trail to the molecular mechanisms of biological clocks" *Trends in Neurosciences*. 18(5), pp. 230–240.
- Hastings M. H., Reddy A. B. y Maywood E. S. (2003). "A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease" *Nature reviews. Neuroscience*, 4(8), pp. 649–661.
- Hoffman G.E., Smith M.S., Verbalis J.G. (1993) "c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems" *Frontiers in neuroendocrinology*. 14(3), pp. 173-213.
- Keith B. J., Franklin G. P., y Paxinos G. (2008). *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. California: Academic.
- Kentish S. J. y Page A. J. (2015). "The role of gastrointestinal vagal afferent fibres in obesity" *The Journal of physiology*, 593(4), pp.775-786.
- Kim J. G., Suyama, S. Koch, M. Jin, S. Argente-Arizon, P. Argente, J. y Gao Y. (2014). "Leptin signaling in astrocytes regulates hypothalamic neuronal circuits and feeding". *Nature neuroscience*, 17(7), pp. 908-910.
- Kimura I., Inoue D., Maeda T., Hara T., Ichimura A., Miyauchi S. y Tsujimoto G. (2011). "Short-chain fatty acids and ketones directly regulate sympathetic nervous system via G protein-coupled receptor 41 (GPR41)" *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(19), pp.8030-8035.
- Kohsaka A., Laposky A. D., Ramsey K. M., Estrada C., Joshu C., Kobayashi Y. y Bass J. (2007). "High-fat diet disrupts behavioral and molecular circadian rhythms in mice" *Cell metabolism*. 6(5), pp. 414-421.
- Kovács, K. J. (1998). "Invited review c-Fos as a transcription factor: a stressful (re) view from a functional map". *Neurochemistry international*, 33(4), pp. 287-297.
- Lamont E. W., Bruton J., Blum I. D. y Abizaid A. (2014). "Ghrelin receptor-knockout mice display alterations in circadian rhythms of activity and feeding under constant lighting conditions" *European Journal of Neuroscience*, 39(2), pp.207-217.

- Landry G.J., Simon M.M., Webb I.C. y Mistlberger R.E., (2006). “Persistence of a behavioral food-anticipatory circadian rhythm following dorsomedial hypothalamic ablation in rats” *Am. J.Physiol.* 290, R1527–R1534.
- Luna-Illades C., Carmona-Castro A. & Miranda-Anaya M. (2014). “Differences in locomotor activity before and during the access to food in a restricted feeding protocol between obese and lean female mice *Neotomodon alstoni*” *Biological Rhythm Research*, 45(6).
- Margetic S., Gazzola C., Pegg G.G. et al. Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002; 26: pp.1407–1433.
- Mieda M., Williams S. C., Sinton C. M., Richardson J. A., Sakurai T. y Yanagisawa, M. (2004). “Orexin neurons function in an efferent pathway of a food-entrainable circadian oscillator in eliciting food-anticipatory activity and wakefulness” *The Journal of neuroscience*, 24(46), pp.10493-10501.
- Mieda M., Williams S. C., Richardson J. A., Tanaka K. y Yanagisawa M. (2006). “The dorsomedial hypothalamic nucleus as a putative food-entrainable circadian pacemaker” *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103(32), pp. 12150-12155.
- Mistlberger R. E. y Mumby D. G. (1992). “The limbic system and food-anticipatory circadian rhythms in the rat: ablation and dopamine blocking studies” *Behavioural brain research*, 47(2), pp.159-168.
- Mistlberger R. y Marchant E. (1999). “Enhanced food-anticipatory circadian rhythms in the genetically obese Zucker rat” *Physiology & behavior*. 66(2), pp.329–335.
- Mistlberger R. E. (2011). “Neurobiology of food anticipatory circadian rhythms” *Physiology & behavior*. 104(4), pp. 535-545.
- Moore D. (2001). “Honey bee circadian clocks: behavioral control from individual workers to whole-colony rhythms” *Journal of Insect Physiology*. 47(2), pp. 843-857.
- Morgan J.I., Curran T. (1989). “Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes” *Trends Neurosci.* 12(11), pp. 459-62.
- Patton D.F., Mistlberger R.E. (2013) “Circadian adaptations to meal timing: neuroendocrine mechanisms” *Front Neurosci.* 14(7), pp. 185-192.
- Patton D. F., Parfyonov M., Gormelen S., Opiol H., Pavlovski I., Marchant E. G. y Mistlberger R. E. (2013). “Photic and pineal modulation of food anticipatory circadian activity rhythms in rodents” *PloS one*, 8(12).

- Perreault M., Istrate N., Wang L., Nichols A. J., Tozzo E., y Stricker-Krongrad A. (2004). "Resistance to the orexigenic effect of ghrelin in dietary-induced obesity in mice: reversal upon weight loss" *International journal of obesity*, 28(7), pp.879-885.
- Persons J. E., Stephan F. K. y Bays M. E. (1993). "Diet-induced obesity attenuates anticipation of food access in rats" *Physiology & behavior*. 54(1), pp. 55–64.
- Prosser L. C. (1991). *Neural and integrative animal physiology En: Comparative Animal Physiology 4<sup>ta</sup> Edición*. Wiley-Liss, Inc. Nueva York.
- Reis W. L., Yi C. X., Gao Y., Tschöp M. H. y Stern J. E. (2015). "Brain innate immunity regulates hypothalamic arcuate neuronal activity and feeding behavior". *Endocrinology*, 156(4), pp. 1303-1315.
- Refinetti R. (2005). *Circadian Physiology*. CRC Press. 800pp.
- Richter C. (1922). "A behavioristic study of the activity of the rat" *Comp. Psychol. Monogr.* 1:1–55.
- Saper C.B. y Fuller P.M. (2007) *Inducible Clocks: Living in an Unpredictable World* En: *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology "Clocks and Rhythms"*. 72(1), pp.543-550.
- Sassone-Corsi P. (1998). "Molecular clocks: mastering time by gene regulation". *Nature*, 392, pp. 871-874.
- Scheer F. A., Hilton M. F., Mantzoros C. S. y Shea S. A. (2009). "Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment" *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(11), pp.4453-4458.
- Shi S. Q., Ansari T. S., McGuinness O. P., Wasserman D. H. y Johnson C. H. (2013). "Circadian disruption leads to insulin resistance and obesity" *Current Biology*, 23(5), pp.372-381.
- Shimba S., Ogawa T., Hitosugi S., Ichihashi Y., Nakadaira Y., Kobayashi M., Tezuka M., Kosuge Y., Ishige K., Ito Y. (2011). "Deficient of a clock gene, brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1), induces dyslipidemia and ectopic fat formation" *PloS one*, 6(9).
- Simson E. L., y Gold R. M. (1982). "The Lee obesity index vindicated?". *Physiology & behavior*, 29(2), pp. 371-376.
- Shibata S., Tahara Y. y Hirao A. (2010). "The adjustment and manipulation of biological rhythms by light, nutrition, and abused drugs" *Advanced Drug Delivery Reviews*. 62(9-10), pp.918–927.

- Schober D. A., Gackenhaimer S. L., y Gehlert D. R. (1996). "Pharmacological characterization of neuropeptide Y-(2–36) binding to neuropeptide YY 1 and Y 2 receptors". *European journal of pharmacology*, 318(2), pp. 307-313.
- Stellar E. (1954). "The physiology of motivation". *Psychological review*, 61(1), 5.
- Stephan F. K., Schawn J.M., y Sisk C.L. (1979). "Entrainment of Circadian Rhythms by Feeding Schedules in Rats whit Supraquiasmatic Lesions" *Behav Neural Biol.* 25, pp. 545-554.
- Stephan F. K. (2002). "The other circadian system: food as a Zeitgeber" *Journal of Biological Rhythms.* 17(4), pp. 284–292.
- Stephan F. K., y Zucker I. (1972). "Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 69(6), pp. 1583-1586.
- Thaler J. P., Yi C. X., Schur E. A., Guyenet S. J., Hwang B. H., Dietrich M. O., y Nguyen H. T. (2012). "Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans". *The Journal of clinical investigation*, 122(1), pp. 153-162.
- Turek F. W., Joshu C., Kohsaka A., Lin E., Ivanova G., McDearmon E. y Eckel R. H. (2005). "Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice" *Science*, 308(5724), 1043-1045.
- Willard L. Koukkari, R. B. (2006). *Introducing Biological Rhythms: A Primer on the Temporal Organization of Life, with Implications for Health, Society, Reproduction, and the Natural Environment Sciences--New York.* College of Biological Sciences University of Minnesota St. Paul, MN, USA: Springer. 658pp.
- Yu, Z., Wang, R., Fok, W. C., Coles, A., Salmon, A. B., & Pérez, V. I. (2015). Rapamycin and dietary restriction induce metabolically distinctive changes in mouse liver. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 70(4), pp. 410-420.
- Young J. B. y Landsberg L. (1977). "Suppression of sympathetic nervous system during fasting" *Science*, 196(4297), pp.1473-1475.
- Zuther P. y Lemmer B. (2009). Chronos-Fit 1.0, <http://www.ma.uni-heidelberg.de/inst/phar/lehre/chrono.html>