



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EFFECTO DEL ESTRÉS PRENATAL Y DE LA ALIMENTACIÓN PROGRAMADA
SOBRE EL FUNCIONAMIENTO DE LOS EJES TIROIDEO Y ADRENAL Y
SOBRE LA EXPRESIÓN DE TRH Y CRH HIPOTALÁMICOS EN RATAS MACHO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M.C. CINTHIA BERENICE GARCÍA LUNA

TUTOR PRINCIPAL

DRA. PATRICIA BERTHA JUDITH DE GORTARI GALLARDO

[Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente"](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. ROSA MARÍA URIBE VILLEGAS

[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

DR. ARMANDO ROBERTO PALACIO TOVAR

[Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición](#)

Ciudad de México. Enero, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Agradecimientos

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Neurofisiología Molecular de la Dirección de Neurociencias del Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz” bajo la dirección de la Dra. Patricia de Gortari.

Agradezco a CONACyT, ya que durante los estudios del posgrado gocé de la beca número 35892. De la misma manera, agradezco al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) por el apoyo financiero otorgado para la asistencia al Congreso de Neurociencias del la Society for Neuroscience en San Diego en el año 2013, así como para realizar una estancia pre-doctoral en la Universidad del Sur de California (USC) en el año 2014.

Índice	Pág.
Resumen	1
Abstract	2
I. Introducción	3
1.1 Regulación de la homeostasis energética	3
1.1.1 El hipotálamo en la regulación de la homeostasis energética	4
1.1.2 Señales periféricas que regulan la homeostasis energética	7
1.1.2.1 Insulina	7
1.1.2.2 Leptina	8
1.1.3 Regulación circadiana de la homeostasis energética	10
1.1.3.1 Hábitos alimentarios	13
1.1.4 El eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (HHT) y la regulación de la homeostasis energética	15
1.1.5 El eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) y la regulación de la homeostasis energética	19
1.1.5.1 Estrés prenatal	23
II. Justificación	25
III. Hipótesis	25
IV. Objetivos	26
4.1 Objetivo general	26
4.2 Objetivos particulares	26
V. Metodología	27
5.1 Animales	27
5.1.1 Grupos experimentales	28
5.1.2 Administración intraperitoneal (ip.) de leptina a animales C, AFL, AFO después de 48 horas de ayuno	29
5.2 Determinación del contenido sérico de hormonas	30
5.3 Análisis de histoquímica por hibridación in situ (HIS)	31
5.3.1 Análisis de las imágenes	32
5.4 PCR en tiempo real (RT-PCR)	32
5.5 Análisis estadísticos	33
VI. Resultados	34
6.1 Efecto de iniciar la disponibilidad de alimentos en fase de luz (AFL) o restringirla a la de oscuridad (AFO) en la etapa prepuberal sobre parámetros endócrinos y moleculares de animales adultos	34
6.1.1 Peso corporal, de las glándulas adrenales y subcompartimentos del tejido adiposo y consumo de alimento	34
6.1.2 Concentración sérica de hormonas	36
6.1.3 Expresión del RNAm de proTRH y proCRH en el NPV por HIS	37
6.1.4 Efecto del ayuno de 48 h y la administración de leptina sobre el peso corporal y el consumo de alimento 6 h después de la realimentación	40
6.1.5 Efecto del ayuno de 48 h y la administración de leptina sobre la expresión del RNAm de péptidos hipotalámicos	42
6.1.5.1 Núcleo arcuato (ARC)	42

6.1.5.2	Núcleo paraventricular (NPV)	45
6.2	Efecto del estrés prenatal y de iniciar la disponibilidad de alimentos en fase de luz (AFL) o restringirla a la de oscuridad (AFO) en la etapa prepuberal sobre parámetros endócrinos y moleculares de animales adultos	49
6.2.1	Peso corporal, consumo de alimento y peso de las glándulas adrenales y subcompartimentos del tejido adiposo	49
6.2.2	Concentración sérica de hormonas	51
6.2.3	Expresión del RNAm de proTRH y proCRH en el NPV por HIS	52
VII.	Discusión	55
7.1	Desfase del consumo de alimentos	56
7.1.1	Efecto de programas de alimentación diferentes sobre parámetros corporales, endócrinos y moleculares de animales adultos	56
7.1.2	Efecto de programas de alimentación diferentes sobre la señalización de leptina en el ARC y en el NPV	60
7.2	Estrés prenatal y desfase del consumo de alimentos	62
7.2.1	Efecto del estrés prenatal y de programas de alimentación diferentes sobre parámetros corporales, endócrinos y moleculares de animales	62
VIII.	Conclusiones	66
IX.	Perspectivas	67
X.	Referencias	67
XI.	Anexos	81
12.1	Artículo publicado en la revista Journal of Endocrinology: "Prepuberal light phase feeding induces neuroendocrine alterations in adult rats".	81

Resumen

Los hábitos alimentarios y el estrés han surgido como factores que propician el desarrollo de obesidad. El desfase del consumo de alimento (tRF) del periodo de descanso al periodo de actividad en roedores modifica la liberación circádica de hormonas que regulan el metabolismo, mientras que el estrés prenatal (EP) provoca cambios en la actividad del eje adrenal (HHA) que repercuten en la homeostasis energética promoviendo ganancia de peso. Nuestro objetivo fue definir el efecto del EP y tRF durante la edad prepuberal, sobre la actividad de los ejes tiroideo (HHT) y HHA en animales adultos. Sometiendo a ratas Wistar jóvenes por dos semanas a tRF en la fase de luz (AFL) o de oscuridad (AFO), a EP (EP-C) y en combinación con tRF (EP-AFL, EP-AFO), analizamos la actividad de los ejes HHT y HHA en edad adulta. Evaluamos la sensibilidad a leptina de los núcleos arcuato (ARC) y paraventricular (NPV) hipotalámicos en AFL y AFO. Todos los parámetros fueron comparados con los de un grupo control (C: alimentación *ad lib*, sin estrés). AFL mostró mayor peso corporal, consumo de alimento, acumulación de tejido adiposo visceral, concentración de corticosterona, leptina e insulina sérica, y menor contenido de T₄; mayor expresión del RNAm de CRH y menor de TRH en neuronas hipofisiotrópicas del NPV, mayor expresión del RNAm de NPY y SOCS3 en ARC. El estrés prenatal (EP-C) causó desarrollo de sobrepeso e hiperfagia sin modificar la actividad de los ejes HHT y HHA. Los grupos EP-AFL y EP-AFO aumentaron el consumo y peso corporal e hiperactividad del eje HHA (aumento de corticosterona sérica y del RNAm de CRH del NPV). Concluimos que la hiperfagia y sobrepeso de AFL pudieron deberse a la hiperactividad del eje HHA y a la inhibición del HHT, debidas a los efectos de neuronas del ARC sobre el NPV. La combinación de EP más el desfase del consumo de alimentos exacerbó la actividad del eje HHA, alterando la homeostasis energética y promoviendo hiperfagia y sobrepeso en EP-AFL y EP-AFO.

Abstract

Feeding patterns and stress are important factors in obesity evolution. Time-restricted feeding (tRF) schedules during resting phase disrupt the circadian release of metabolism-regulating hormones; whereas prenatal stress (PS) changes adrenal axis (HPA) activity, alters energy homeostasis and promotes body weight gain. The aim of the study was to determine PS and prepuberal tRF effects on thyroid (HPT) and HPA axes activity. We subjected prepuberal rats to tRF in light (LPF) or in dark phase (DPF), to prenatal stress (PS-C) or in combination with tRF (PS-LPF, PS-DPF) and analyzed HPT and HPA axes response when they reach adulthood; also, LPF and DPF arcuate (ARC) and paraventricular (PVN) hypothalamic nuclei neurons' sensitivity to leptin. All parameters were compared to that of a control group (C: *ad lib* feeding, no stress). LPF group showed high body weight and food intake, along with increased visceral fat pads, corticosterone, leptin and insulin serum levels, whereas circulating T₄ decreased. HPA axis hyperactivity was demonstrated by their high PVN CRH mRNA expression; the blunted HPT axis activity by the decreased hypophysiotropic PVN TRH mRNA expression, suggesting inadequate adaptation to positive energy balance accounted for their ARC leptin resistance, evinced by an increased NPY and SOCS3 mRNA expression. PS-C increased food intake and body weight, without altering HPT and HPA axes function. PS-LPF and PS-DPF also developed hyperphagia and overweight, along with HPA axis hyperactivity (high corticosterone serum levels and PVN CRH mRNA expression). We concluded that the hyperphagia of prepuberal LPF animals could account for the HPA axis hyperactivity and for the HPT blocked function due to the altered ARC leptin signaling and impaired NPY regulation on PVN TRH neurons. In addition, the combination of PS with tRF in light or dark phase exacerbated HPA axis activity, altering energy homeostasis and promoting hyperphagia and overweight in PS-LPF and PS-DPF.

I. Introducción

1.1 Regulación de la homeostasis energética

El peso corporal de un organismo está regulado por un mecanismo que mantiene las reservas energéticas constantes al equilibrar el consumo de energía con el gasto de la misma a través de periodos largos de tiempo, que es llamado homeostasis energética (1). Este mecanismo subyace en un sistema de neuronas del hipotálamo mediobasal y de otras áreas del cerebro que regulan la ingesta de alimentos en respuesta a señales endócrinas cuya concentración es proporcional a la cantidad de grasa corporal (2).

La ingestión alimentaria está influenciada por estímulos tanto internos como externos. Entre los externos se incluyen los visuales, auditivos y olfatorios relacionados con las propiedades de los alimentos; además, la sincronización del ciclo circadiano, la temperatura, los horarios de la alimentación y la disponibilidad de alimentos, entre otros. Los estímulos internos son aquellos regulados por el metabolismo, como las señales centrales y periféricas con información sobre el estado de las reservas energéticas, que al integrarse con otras provenientes de regiones cerebrales como el hipotálamo mediobasal generan una respuesta conductual de los individuos encaminada a consumir mayor o menor cantidad de alimentos y que impacta en el gasto energético, lo que mantiene la homeostasis (3).

Por otra parte, el consumo de alimentos también se puede regular por señales no relacionadas a la saciedad, sino con las propiedades hedónicas de los alimentos, a lo que se le conoce como ingestión alimentaria hedónica independiente a las señales de saciedad. La modulación de esta ingestión reside en el sistema de recompensa que involucra a la vía dopaminérgica y modifica la motivación por el consumo de alimento de animales y humanos (4).

Cuando el consumo de alimentos es mayor que el gasto de energía, el organismo presenta un balance energético positivo, que conlleva a aumento de peso debido a un mayor volumen de tejido adiposo y puede facilitar el desarrollo de obesidad.

1.1.1 El hipotálamo en la regulación de la homeostasis energética

El hipotálamo es el área del cerebro donde se integran señales centrales y periféricas, el cual recibe información sobre el tamaño de los adipocitos regulando las conductas motivacionales y la respuesta ante estímulos amenazantes entre otras, para las cuales la disponibilidad de energía es clave (5); además actúa como regulador de sistemas críticos para la supervivencia, como la temperatura y la reproducción (6). El hipotálamo consiste de varios núcleos neuronales, incluyendo el arcuato (ARC), el paraventricular (NPV), el hipotálamo lateral (HL), el ventromedial (NVM) y el dorsomedial (NDM) (Fig. 1) (3,5,7,8).

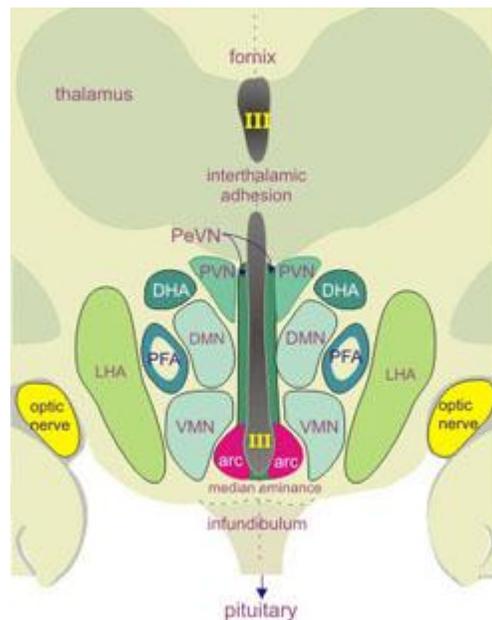


Fig. 1. Núcleos hipotalámicos del cerebro de rata involucrados en el control de la conducta alimentaria. Sección coronal mostrando los núcleos del hipotálamo: ARC, núcleo arcuato; PVN, núcleo paraventricular; PFA, área perifornical; LHA, hipotálamo lateral; VMN, núcleo ventromedial; DMN, núcleo dorsomedial; AM, PeVN; núcleo periventricular; DHA: área hipotalámica dorsal; III, tercer ventrículo (9).

En el ARC hay diversas poblaciones neuronales, una de ellas sintetiza péptidos que promueven la ingestión alimentaria (orexigénicos), los cuales son neuropéptido Y (NPY) y la proteína relacionada al agouti (AgRP) (10,11), y la otra que sintetiza péptidos que inhiben la ingestión de alimento (anorexigénicos), como la pro-opiomelanocortina (POMC), su péptido derivado, la hormona estimulante de los α -melanocitos (α -MSH) y el transcrito regulado por cocaína y anfetaminas (CART); la expresión de dichos péptidos está regulada por leptina, entre otros factores, la cual aumenta la expresión de los anorexigénicos e inhibe la de los orexigénicos (12,13). Ambas poblaciones de neuronas proyectan sus axones hacia neuronas de segundo orden del NPV, NDM, NVM e HL (Fig. 2) (3,7,14). De modo que el control inicial de la conducta alimentaria reside en el ARC.

El NPV integra señales de diversos núcleos hipotalámicos, de la corteza sensorial y de regiones límbicas (15,16); sus proyecciones eferentes se dirigen hacia varias regiones cerebrales y a la eminencia media (neuronas hipofisiotrópicas) induciendo cambios en la motivación de los animales por la búsqueda de alimento, en el gasto de energía y en la regulación de la homeostasis energética (17). Ante estímulos específicos, las neuronas hipofisiotrópicas liberan péptidos a la circulación porta-hipofisiaria y estimulan la síntesis y liberación de hormonas de la adenohipófisis hacia la circulación periférica. Dos importantes tipos de neuronas del NPV que regulan el metabolismo energético son aquellas que sintetizan a la hormona liberadora de tirotrópina (TRH), y que controla la actividad autónoma del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (HHT); también las que sintetizan a la hormona liberadora de corticotropina (CRH), que regula el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) (8,14). Además, a nivel central la inyección de TRH y CRH en animales disminuye su ingestión alimentaria (18,19), por lo que se les ha atribuido una función anorexigénica (Fig. 2).

El hipotálamo lateral (HL) contiene neuronas que sintetizan neuropéptidos moduladores orexigénicos tales como la hormona concentradora de melanina (MCH) (20), orexinas A y B (21,22) y galanina y los anorexigénicos como CART

(23), CRH (24) y neurotensina. Las neuronas del HL tienen proyecciones a lo largo del sistema nervioso central, entre las que se encuentran regiones como el núcleo accumbens, el estriado, el área ventral tegmental (AVT) y el hipocampo, entre otros. También reciben aferencias del ARC y del NPV (25-27), por lo que se ha sugerido que regulan la conducta alimentaria no sólo a través de la modulación homeostática sino también a través de su influencia sobre la recompensa.

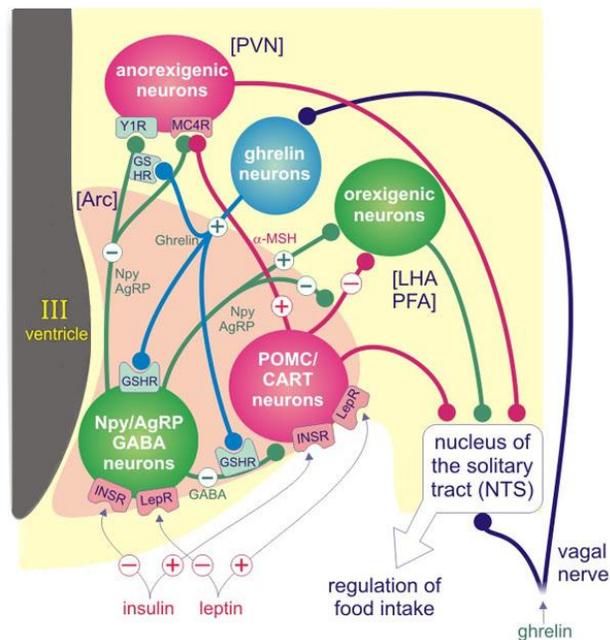


Fig. 2. Proyecciones de las neuronas del ARC hacia diversos núcleos hipotalámicos.

Proyecciones excitatorias e inhibitorias de las neuronas del ARC sobre diversas regiones centrales involucradas en la regulación de la conducta alimentaria. Y1R, receptor de NPY tipo 1; MC4R, receptor de melanocortina tipo 4; GSHR, receptor de secretagogos de la hormona de crecimiento; α -MSH, hormona estimulante de los alfa melanocitos; NPY, neuropéptido Y; AgRP, proteína relacionada al agouti; POMC, pro-opiomelanocortina; CART, transcrito regulado por cocaína y anfetaminas; GABA, ácido gamma-aminobutírico; Lepr, receptor de leptina, INSR, receptor de insulina (9).

Es importante notar que la mayoría de las proyecciones de las neuronas del ARC que sintetizan NPY/AgRP que van hacia en NPV y al HL no están maduras después del nacimiento (28,29); además, la leptina ejerce sus efectos anorexigénicos en animales después de la cuarta semana de edad (30) y su

función regulatoria sobre la expresión de TRH del NPV requiere de las proyecciones neuronales del ARC (31), por lo que las alteraciones de mecanismos regulatorios de los ejes neuroendócrinos en la etapa prepuberal serán críticas para el control de la alimentación y su coordinación con la homeostasis energética, lo que puede prevalecer hasta la adultez.

1.1.2 Señales periféricas que regulan la homeostasis energética

Las señales periféricas son reguladores hormonales del hambre y de saciedad que incluyen a péptidos como la colecistoquinina (CCK), la insulina y la leptina que tienen acción anorexigénica; y la grelina con acción orexigénica. La CCK y la grelina tienen receptores tanto en el núcleo del tracto solitario (NTS), como en el ARC, induciendo la liberación de neuropéptidos que regulan la conducta alimentaria (3,32-35). Las hormonas insulina y leptina son secretadas del páncreas y del tejido adiposo, respectivamente, y su concentración plasmática es proporcional al tamaño y volumen de los adipocitos (36,37), regulando negativamente el consumo de alimentos.

1.1.2.1 Insulina

La insulina es una hormona peptídica sintetizada y liberada de las células β pancreáticas, cuya secreción es estimulada principalmente por aumento en la concentración plasmática de glucosa (38). Al unirse a su receptor (IR), promueve la traslocación de transportadores de glucosa dependientes de insulina (GLUT4) del citoplasma a la membrana, regulando de esa manera la entrada del monosacárido a las células que puede ser utilizado como fuente de energía o almacenado como reserva energética.

Además de su participación en el metabolismo de los hidratos de carbono, la insulina participa en el metabolismo de proteínas y grasas. Por ejemplo, promueve el transporte de aminoácidos del torrente sanguíneo hacia el músculo, aumenta la tasa de incorporación de aminoácidos en proteínas y reduce su degradación. En lo

que concierne a las grasas, estimula la lipogénesis a partir de hidratos de carbono y disminuye la lipólisis al inhibir la liberación de ácidos grasos (39).

En cuanto a la regulación de la homeostasis energética, cuando la insulina es liberada inhibe el consumo de alimento y reduce el peso corporal. En el hipotálamo, interactúa con factores catabólicos como la leptina, con la finalidad de inhibir la expresión de NPY y AgRP y promover la de síntesis y liberación de α -MSH de las neuronas del ARC, lo que inhibe el consumo de alimentos (40).

En animales con obesidad se ha documentado el desarrollo de resistencia a la insulina, la cual se refiere a que a pesar de presentar concentraciones séricas incrementadas, los tejidos son incapaces de utilizar la insulina como mediador para la entrada de glucosa en las células, resultando en hiperglucemia. Dicha alteración en la señalización de la insulina no permite la acción anorexigénica de α -MSH, perpetuando el aumento en el consumo de alimentos y la obesidad.

1.1.2.2 Leptina

La leptina es una hormona peptídica sintetizada por el tejido adiposo en relación a la cantidad del mismo (41), la cual provee de información al cerebro sobre el volumen de las reservas energéticas del organismo además de estar implicada en diversas funciones como la reproducción, el crecimiento, la inmunidad, la regulación de ejes neuroendócrinos como el gonadal, adrenal y tiroideo y la sensibilidad a la insulina (42-46). El papel de la leptina en la homeostasis energética está dado por la inhibición del consumo de alimento y el incremento en la termogénesis, lo que resulta en pérdida de peso (47-49).

Cuando las reservas energéticas aumentan, la concentración en plasma de leptina también lo hace, la cual llega al cerebro e interactúa con su receptor (ObRb) en diversas regiones centrales. Neuronas blanco de la leptina se encuentran distribuidas ampliamente en el cerebro, regiones hipotalámicas como el ARC, el NPV, el NVM, el NDM y el HL, y regiones extrahipotalámicas como la AVT

expresan al receptor de leptina y están involucradas en la regulación de la homeostasis energética (48,50).

La señalización de leptina está mediada por su interacción con ObRb alterando la conformación del homodímero formado por el receptor y permitiendo la transfosforilación y activación de la cinasa Janus 2 (Jak2), asociada a ObRb. Al activarse, Jak2 fosforila otro residuo tirosina (tyr1138) del complejo ObRb/Jak2, el cual recluta al transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) por medio de su dominio SH2; STAT3 dimeriza y se trasloca al núcleo actuando como factor transcripcional y modulando la expresión de diversos genes. Al mismo tiempo, STAT3 regula la transcripción del supresor de la señal de citocinas 3 (SOCS3), quien inhibe la señalización de leptina por medio de un proceso de retroalimentación negativa, al unirse a una Jak2 e impidiendo su actividad (Fig. 3) (51-53). En neuronas del ARC la leptina promueve la transcripción de POMC y CART e inhibe la de NPY y AgRP mientras que en el NPV promueve la síntesis de TRH y CRH, ambos anorexigénicos (54-56), disminuyendo de esta manera la ingesta alimentaria (11,13,57-62).

En humanos y animales con obesidad se desarrolla hiperleptinemia la cual está asociada a resistencia a la leptina. Roedores con obesidad inducida por el consumo de una dieta alta en grasa presentan resistencia a la leptina en las neuronas del ARC (63,64). Esta resistencia se acompaña de una señalización alterada de la hormona; esto se ha observado en animales con sobreexpresión de SOCS3 en neuronas de POMC, que además son obesos (65), y en ratones alimentados con dieta alta en grasa (64); por lo que el aumento crónico de SOCS3 es considerado un indicador de resistencia a la leptina (66).

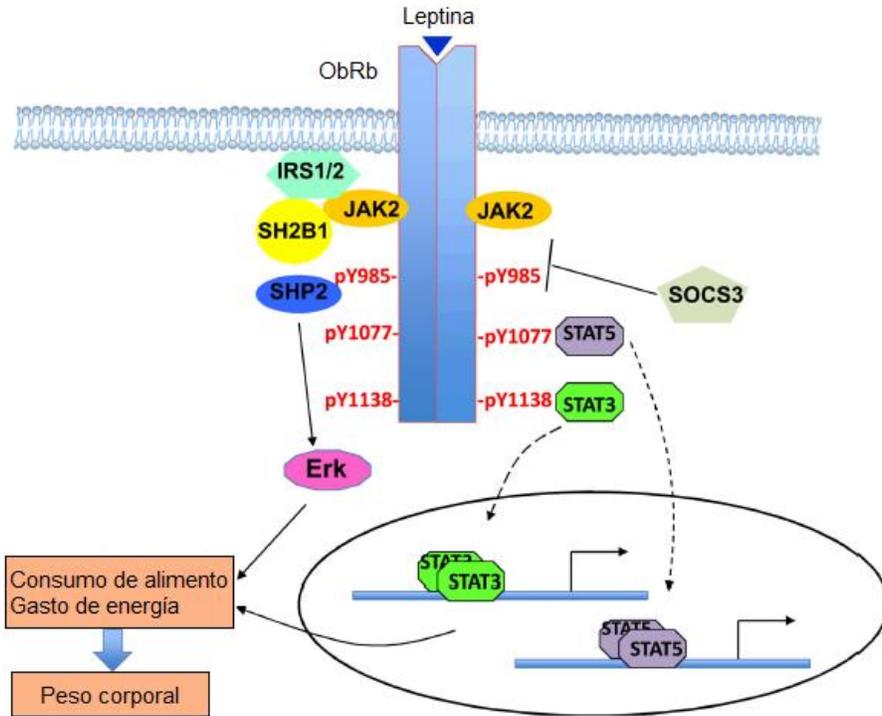


Fig. 3. Señalización de la leptina. La leptina se une a su receptor ObRb y activa Jak2. Jak2 fosforila a ObRb en tyr985, tyr1077 y tyr1138. Dichas tirosinas fosforiladas unen a moléculas (SHP2) río abajo y activan vías como la de Jak2/STAT3. La señalización de ObRb se regula negativamente por SOCS3 y positivamente por SH2. Modificado de (67).

1.1.3 Regulación circádica de la homeostasis energética

Todos los organismos han evolucionado y restringido su actividad al periodo de luz o de oscuridad, siendo diurnos o nocturnos, respectivamente. El funcionamiento apropiado de los diferentes sistemas fisiológicos se regula por el reloj circadiano, lo que asegura que dichas funciones se den de manera oscilatoria (alternando periodos de actividad y descanso) y que se anticipen o se mantengan en sincronía con eventos predecibles del ambiente, como el ciclo diario de luz/oscuridad o el consumo de alimentos (68).

En los mamíferos, el ciclo circadiano tiene impacto sobre la mayoría de los sistemas fisiológicos y sobre la conducta, como son el ciclo de sueño y vigilia, la actividad cardiovascular, los sistemas endócrinos, la temperatura corporal, el

funcionamiento del tracto gastrointestinal y la conducta de búsqueda de alimento, entre otros (69). Se encuentra regulado por circuitos moleculares de retroalimentación transcripcional/traducciona l entre genes reloj y sus proteínas que interactúan en un marco de tiempo de 24 h, circuitos que no sólo se encuentran presentes a nivel central, sino también periférico.

El núcleo supraquiasmático (SCN) del hipotálamo es la región central donde se encuentra el marcapasos maestro, el cual tiene proyecciones hacia otros núcleos hipotalámicos como el ARC y el NPV, quienes a su vez han mostrado propiedades oscilatorias (70,71). Dichas proyecciones son relevantes para que la liberación de hormonas y el metabolismo puedan mantener un control rítmico (72). Por otra parte, en tejidos periféricos como el hígado, el tejido adiposo, el páncreas y el tracto gastrointestinal se ha identificado la maquinaria reloj acoplada al reloj maestro por medio de vías neuronales y endócrinas (73-76).

La luz es el estímulo más intenso que sincroniza al marcapasos maestro del SCN, aunque estímulos externos como la ingesta de alimentos pueden modificar la ritmicidad de los relojes periféricos y de regiones centrales diferentes al SCN. Los estímulos fóticos transmiten la información a través de fibras de naturaleza glutamatérgica del tracto retinohipotalámico que inervan a neuronas del SCN, que a su vez regulan la inervación simpática de la glándula pineal y la producción de melatonina (77-79). Dicha hormona tiene impacto sobre el reloj molecular de diversas regiones centrales y periféricas implicadas en la regulación de la homeostasis energética; por ejemplo, al controlar las variaciones diarias en el contenido de dopamina en el estriado (80,81), al incrementar la síntesis de NPY en el ARC (82), al inhibir la secreción de insulina del páncreas (83), al promover la proliferación de los adipocitos en el tejido adiposo blanco (TAB) (84) y mantener la ritmicidad en la concentración sérica de hormonas como los glucocorticoides (GC), la leptina y la insulina (85).

El reloj maestro del SCN, al controlar el ritmo del ciclo de sueño/vigilia, determina la sincronización de la conducta alimentaria al ciclo de luz/oscuridad, la cual a su vez puede regular los ritmos circadianos de tejidos periféricos. Al restringir la disponibilidad de alimentos a una ventana de tiempo específica se presenta un cambio en la síntesis y secreción de neuropéptidos, neurotransmisores y hormonas, así como aumento en la actividad locomotriz, los cuales se acoplan al tiempo de inicio de la alimentación (86,87). A este cambio conductual se le ha definido como actividad de anticipación a los alimentos (FAA, food anticipatory activity) y puede presentarse incluso cuando la disponibilidad de los alimentos se da en la fase de luz, la cual es el periodo de descanso en los roedores. Dicha conducta anticipatoria parece estar mediada por un oscilador sincronizado por alimento (FEO, food entrainable oscillator), reloj biológico independiente del SCN y del cual no se ha definido su sitio anatómico, aunque ciertas regiones como el NDM, el cerebelo y tejidos periféricos se han propuesto como tales (88-93).

La secreción de hormonas que controlan la homeóstasis energética está regulada de manera circádica; el organismo es capaz de anticipar los cambios de su ambiente, como el ciclo de luz/oscuridad y la alimentación y adaptarse de acuerdo a éstos. En este sentido, la secreción de leptina en roedores nocturnos con alimentación *ad libitum* presenta su pico máximo diario 5 h después del inicio de la fase oscuridad, el cual es provocado por el consumo de alimento, con otro pico antes de iniciar la fase de descanso (94,95); la liberación circádica de la concentración de insulina es máxima al final de la fase de oscuridad y precede al aumento de glucosa en sangre (95-97); la secreción de GC se potencia una hora antes del inicio de la fase de actividad y 1-2 h previas a la presentación de los alimentos por medio de la regulación directa del SCN sobre las neuronas CRHérgicas del NPV e indirecta sobre la innervación autonómica de la glándula adrenal (98-102).

El proceso de regulación es bilateral, el SCN dirige la ritmicidad de las oscilaciones en la liberación de hormonas que regulan la homeostasis energética y

éstas modulan la función del SCN; esto se apoya por la expresión del RNAm de sus receptores en el SCN (103-105). Por lo que cambios en la ingestión de alimentos, tanto en el tiempo de alimentación como en la cantidad de energía consumida, puede tener impacto sobre la regulación de la expresión de dichas hormonas y el peso corporal de los animales.

1.1.3.1 Hábitos alimentarios

Los hábitos alimentarios influyen en el desarrollo de enfermedades como la obesidad y los trastornos de la conducta alimentaria ya que la frecuencia y duración de los periodos de ayuno entre comidas, el ayuno prolongado y la intensidad de la restricción de nutrimentos, especialmente en etapas críticas del desarrollo, tienen un impacto en la regulación de las vías metabólicas y la homeostasis energética. Esto se ha observado por ejemplo en animales recién destetados sometidos a ayuno de 48 horas, donde no se da la adaptación esperada del eje tiroideo frente al reto del balance energético negativo (106). Por el contrario, cuando se presenta una restricción alimentaria crónica e intermitente, como lo que sucede en dietas de reducción de peso en humanos, se reta la capacidad adaptativa de varios ejes neuroendocrinos, entre ellos del eje tiroideo, evitando su aceleración y el gasto de las reservas energéticas, lo que incrementa la probabilidad de desarrollar obesidad (107).

Los patrones de alimentación del adulto dependen de la regulación ya programada genéticamente en combinación con los hábitos aprendidos en etapas tempranas de la vida. La regulación programada puede ser modificada por condiciones ambientales como el estrés de la madre o del propio individuo y la nutrición intrauterina, que de no ser óptima puede repercutir en desarrollo de obesidad, sobrepeso y síndrome metabólico en la etapa adulta (108,109).

Diversos factores de la dieta, como el contenido energético y específicamente la cantidad de grasa se han asociado con el peso corporal (110), pero también se ha sugerido que otros factores dietéticos como la cantidad de fibra, la composición de

macronutrientes, la frecuencia con que se realizan las comidas (el número total de comidas por día) y la omisión de un tiempo de comida, influyen en la regulación del su mantenimiento (111-113). El cambio de los esquemas de alimentación de la fase de actividad a la de descanso, como lo que se observa en trabajadores nocturnos y personas que consumen alimentos durante la noche, implica un riesgo de desarrollar alteraciones metabólicas y sobrepeso (114-117). Por el contrario, limitar la ingesta de alimentos en un intervalo de 10-12 h durante la fase de actividad, sin importar la calidad o cantidad de alimentos, reduce el peso corporal de los individuos (118).

Así, la ganancia de peso está inversamente asociada con la frecuencia de comidas y directamente asociada con el retraso de la ingestión de energía en el día (ayunos intermitentes y prolongados de más de 10 horas) (119,120). Esto se ha mostrado en estudios en humanos, donde la omisión del desayuno tiene un impacto sobre el IMC, tanto en niños como en adultos (121-124).

La frecuencia de comidas y los horarios de alimentación están estrechamente ligados al ciclo de luz/oscuridad y en la sociedad actual los hábitos alimentarios han cambiado debido a la disponibilidad continua de luz eléctrica, al uso de aparatos electrónicos y al despertar muy temprano para asistir a la escuela, entre otros factores (125). Estos cambios alteran los patrones de sueño y de alimentación y tienen impacto sobre la liberación de hormonas como la leptina (126), la insulina (127) y los glucocorticoides (128), ya que pueden regularse por la duración del sueño.

Se ha relacionado a la falta de sueño con el aumento en el peso corporal y tejido adiposo de niños (129-133), así como con cambios en la concentración sérica de leptina (134,135), que a pesar de ser controversiales lo involucran en el riesgo de desarrollar sobrepeso u obesidad. Los patrones de sueño pueden ser modificados por los hábitos alimentarios, como sucede en niños que duermen más tarde y que consumen más alimentos en este tiempo (136), así como mayor consumo de

grasas e hidratos de carbono (137). Por lo que al estudiar las alteraciones en los patrones de sueño, así como los cambios asociados en los hábitos alimentarios, sería posible identificar las vías centrales y periféricas alteradas y que dan lugar al desarrollo de enfermedades metabólicas.

Los roedores sometidos a paradigmas donde se restringe la duración del periodo de consumo de alimento (chow) sin cambiar la cantidad, presentan alteraciones en la homeostasis energética cuando el consumo de alimento está restringido a la fase de reposo en comparación a la restricción en la fase de actividad (138,139); incluso si la dieta es alta en grasa pero acceden a ella sólo en la fase de reposo, presentan mayor peso corporal que si la consumen en la fase de actividad. El impacto no sólo es en el peso, sino también en el metabolismo de lípidos y glucosa, el cual mejora en los animales alimentados en la fase de actividad (140,141).

Los reportes en modelos animales involucran solo a los adultos y no se han hecho estudios acerca del desfase de la alimentación en animales jóvenes, por lo que el estudio de los efectos de la restricción del periodo de alimentación en animales jóvenes es relevante, sobre todo por la susceptibilidad a la modificación de la regulación de su conducta alimentaria, tal como se describió arriba. Los resultados facilitarían la generación de estrategias clínicas que prevengan las alteraciones en los hábitos alimentarios que puedan vulnerar la salud de las personas cuando éstas llegan a la etapa adulta.

1.1.4 El eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (HHT) y la regulación de la homeostasis energética

La hormona liberadora de tirotrópina (TRH) es un tripéptido (piroglutamil-histidil-prolinamida) cuya función más ampliamente descrita es la regulación del funcionamiento del eje HHT. Las neuronas TRHérgicas implicadas en esta regulación se denominan hipofisiotrópicas (142) y se localizan exclusivamente en las subdivisiones medial y periventricular parvocelular del NPV (143,144). Los

axones de estas neuronas proyectan hacia la zona externa de la eminencia media, donde TRH es secretado hacia la circulación portal (145); de esta manera, el péptido llega a sus células blanco en la adenohipófisis (146) y, uniéndose a sus receptores específicos (TRH-R1) (147), activa la síntesis y secreción de tirotropina (TSH) de los tirotropos y de prolactina de los lactotropos (148-152).

La TSH liberada de la adenohipófisis, a su vez regula la síntesis y liberación de las hormonas tiroideas (HT): triyodotironina (T_3) y tiroxina (T_4) de la glándula tiroides. Las HT regulan por retroalimentación negativa la síntesis y liberación de TSH en la adenohipófisis y de TRH en el NPV (Fig. 4) (143,153,154). Así, en condiciones de hipotiroidismo existe un aumento en la expresión de TRH y TSH, y en el hipertiroidismo en cambio se presenta una disminución de la síntesis y liberación de ambas hormonas. Las HT son moduladores importantes de la homeostasis energética a través de sus efectos en la termogénesis, regulando directamente la expresión de las proteínas desacopladoras (UCP) en las mitocondrias del tejido adiposo pardo, y estimulando la lipólisis (14,155).

La regulación del eje HHT por retroalimentación negativa de las HT se altera en condiciones donde se modifica el balance energético; si éste es positivo (mayor ingestión que gasto energético) como en humanos y animales con obesidad (ya sean niños, adolescentes o adultos), se presentan concentraciones ligeramente elevadas de TSH (156-158), mientras que la concentración sérica de T_4 se encuentra normal, y hay controversia acerca de los cambios en la concentración sérica de T_3 , ya que se puede encontrar ligeramente elevada o normal (158). Cuando el balance energético es negativo (mayor gasto que consumo energético), como sucede en el ayuno, en la desnutrición y la baja disponibilidad nutricional, se reduce la actividad del eje HHT desarrollándose hipotiroidismo terciario; éste se caracteriza por la disminución en la expresión del RNAm de proTRH en NPV y en su liberación, a pesar de que la concentración sérica de las hormonas tiroideas está disminuida (159-163). Esto evita la restitución del funcionamiento del eje HHT y constituye una adaptación del organismo a la baja disponibilidad de alimentos

favoreciéndose su supervivencia por reducirse su tasa metabólica y su gasto de energía (162,163).

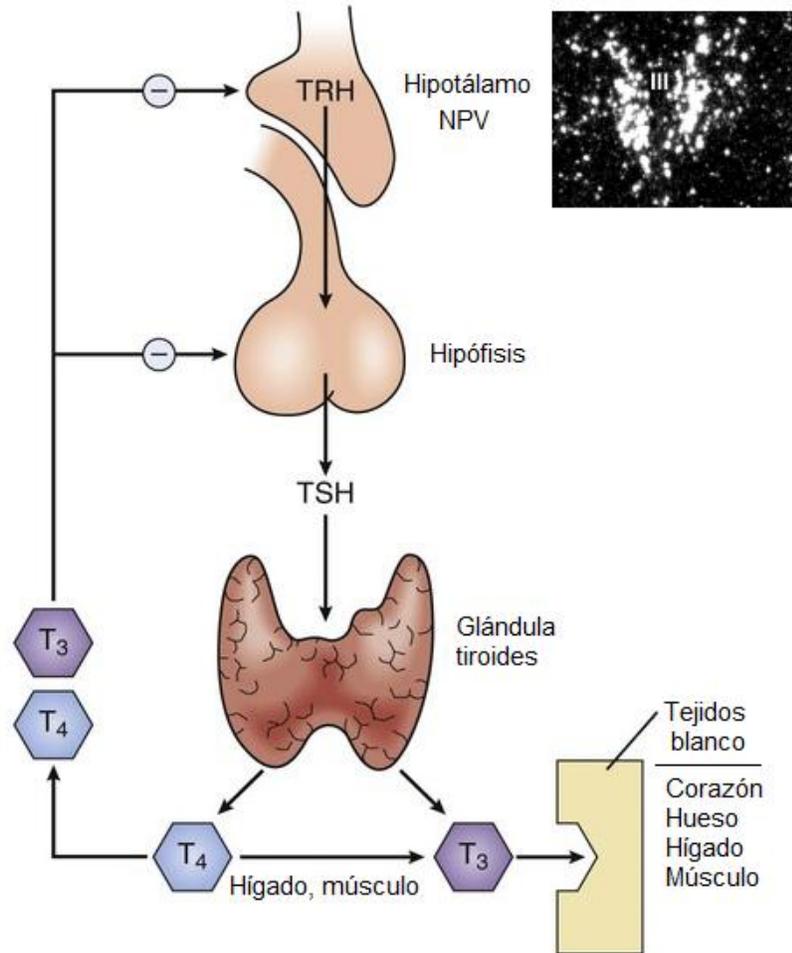


Fig. 4. Eje hipotálamo-hipófisis-tiroides. Activación del eje tiroideo: incremento de TRH del núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV), activación de tirotrópos en la hipófisis por acción de TRH y liberación de tirotrófica (TSH) hacia la circulación portahipofisiaria llegando a la glándula tiroides y promoviendo la liberación de hormonas tiroideas (T₃, triyodotironina y T₄, tiroxina). Regulación por retroalimentación negativa de hormonas tiroideas al inhibir TRH y TSH (164).

El eje HHT también se encuentra regulado de manera diferencial por la edad, ya que animales pre-púberes (roedores de 28 días de vida) sometidos a ayuno agudo, no presentan la adaptación descrita en balance energético negativo: la concentración sérica de TSH y el contenido de TRH en la eminencia media no

disminuyen (106). La expresión de TRH se encuentra modulada además de HT, por la leptina y los glucocorticoides, por neuropéptidos y neurotransmisores provenientes del tallo cerebral y de núcleos hipotalámicos como el ARC, el NDM y el NVM, entre otros.

Las neuronas de TRH expresan al receptor de leptina ObRb (165), por lo que de manera directa la leptina aumenta la expresión de TRH activando la cascada de señalización de STAT3 (166-168). Además, la acción de la leptina sobre las neuronas de POMC/CART y NPY/AgRP del ARC provoca mayor o menor liberación de éstos en el NPV respectivamente, modificando indirectamente la expresión de TRH. Cuando aumentan las reservas energéticas, la concentración sérica de la leptina también se incrementa promoviendo en el ARC la síntesis y liberación de α -MSH y CART e inhibiendo la de NPY y AgRP: los péptidos anorexigénicos promueven la síntesis de TRH del NPV por medio de la vía de señalización del AMPc; por el contrario, cuando el organismo se encuentra en balance energético negativo, la concentración de leptina disminuye promoviendo la expresión de NPY y AgRP del ARC, los cuales inhiben la expresión de TRH del NPV (62,168,169).

Por otra parte, los glucocorticoides inhiben la expresión de TRH al actuar directamente sobre las neuronas del NPV que expresan al receptor de glucocorticoides (GR) y reprimiendo su transcripción por medio de la unión al elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE) presente en el promotor del gen de TRH (170,171). De hecho los animales adrenalectomizados tienen mayor expresión de TRH, mientras que la suplementación con dexametasona la restablece a niveles basales (170). Los GC también inhiben la síntesis de TSH en la adenohipófisis y la conversión de T_4 a T_3 (que es la hormona con actividad biológica) (172), sugiriendo que la activación del eje adrenal por estrés modifica la función del eje tiroideo.

El sobrepeso y la hiperfagia y/o el consumo de una dieta alta en grasa son condiciones que alteran la actividad del eje HHT: la concentración sérica de TSH, T₄ y T₃, así como la expresión de TRH en el NPV aumentan, lo que puede estar asociado al incremento de leptina (173-178).

1.1.5 El eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) y la regulación de la homeostasis energética

Cuando un organismo se enfrenta a situaciones que requieran acciones de supervivencia se despliega un repertorio complejo de respuestas fisiológicas y conductuales. Si dichas respuestas son excesivas o prolongadas pueden afectar diferentes funciones fisiológicas como el metabolismo, la reproducción y las respuestas inmunes (179,180). El organismo tiene la capacidad para mantener la estabilidad del medio interno, a lo cual se le conoce con el término de alostasis; está mediado por esteroides adrenales, catecolaminas, citocinas y proteínas codificadas por genes de expresión temprana (181), quienes forman parte del eje HHA y del Sistema Simpático Adrenal (SSA).

Los estresores pueden clasificarse en físicos (calor, frío, ruido, dolor), fisiológicos (enfermedades virales, privación de alimento y sueño) y psicológicos (conflictos interpersonales, procesos emocionales) (182) y de acuerdo con su cronicidad pueden ser agudos y crónicos. Un estresor agudo es aquél que ocurre en una sola ocasión pero que tiene fuerte impacto sobre el individuo mientras que uno crónico es al que se expone un individuo de manera constante (183).

El sistema de respuesta al estrés tiene un componente central y otro periférico regulado por señales centrales. Se activa en primera instancia el periférico por regulación del sistema nervioso autónomo, el cual incluye la activación del SSA y la liberación de catecolaminas (noradrenalina y adrenalina) de la médula adrenal. Posteriormente se activa la respuesta del eje HHA, promoviendo en última instancia la liberación de glucocorticoides de la corteza adrenal (184).

En respuesta a un estresor, el eje HHA se activa aumentando la actividad de las neuronas del NPV. Las neuronas de CRH hipofisiotrópicas del NPV se localizan en la región parvocelular del mismo (185). CRH al ser liberado a la circulación porta-hipofisiaria llega a la adenohipófisis y estimula la síntesis y liberación de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH). Ésta es liberada a la circulación periférica por donde es transportada a sus órganos blanco, las glándulas adrenales, y estimula la síntesis y liberación de glucocorticoides (cortisol en el humano, corticosterona en los roedores) de la corteza adrenal; los GC viajan por el torrente sanguíneo al unirse con la globulina de unión a corticosteroides (Fig. 5). La disponibilidad de los GC en los tejidos blanco (virtualmente todas las células de un organismo) depende de la actividad de la enzima 11- β deshidrogenasa de dihidroxiesteroides (11 β HSD), quien convierte las formas inactivas de GC en activas en función del estado redox. GC activos actúan en tejidos blanco al unirse a su receptor (GR) (186) y además cuando actúan sobre neuronas del NPV y en corticotropos de la adenohipófisis, regulan de manera negativa al eje HHA, inhibiendo la síntesis y liberación de ACTH en la adenohipófisis y de CRH en el NPV (187). Esto constituye la base de la regulación del eje HHA por retroalimentación negativa.

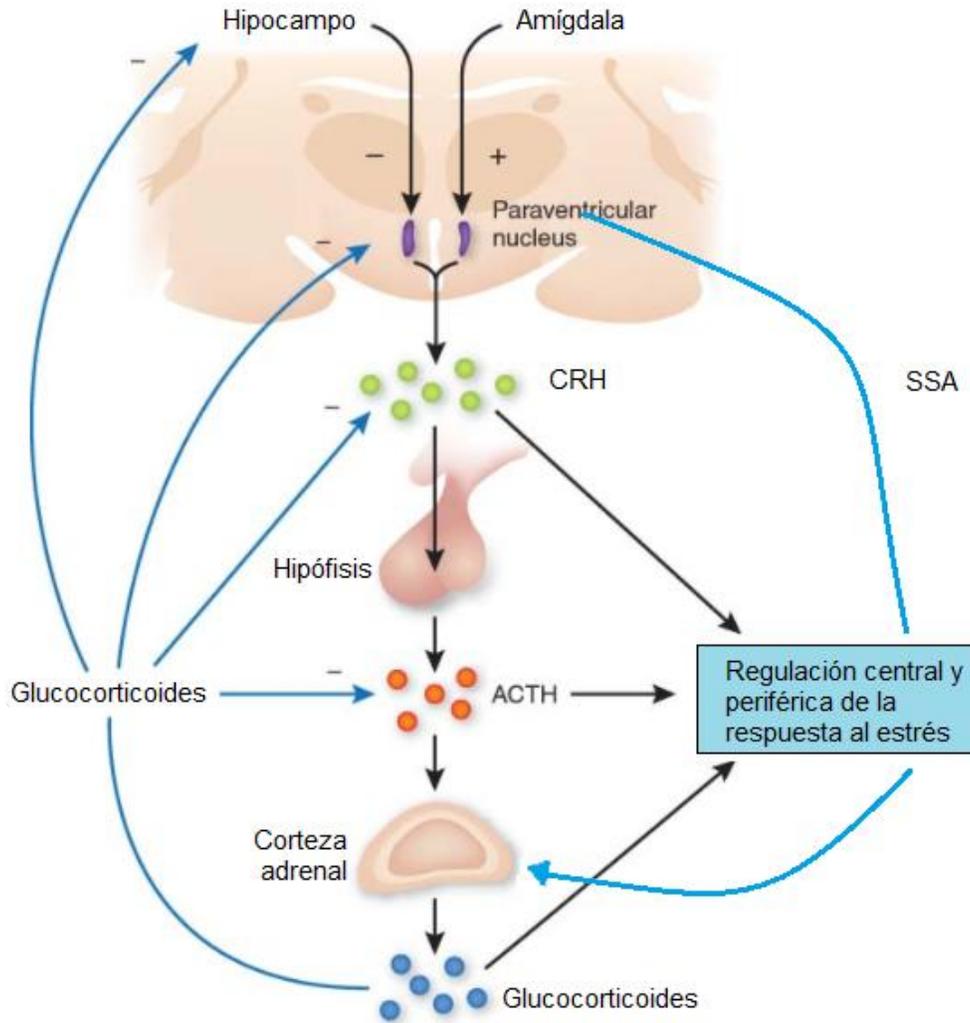


Fig. 5. Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. Activación del eje adrenal: incremento de CRH del núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV), activación de corticotropos en la hipófisis por acción de CRH y liberación de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) hacia la circulación portahipofisiaria llegando a la corteza adrenal y promoviendo la liberación de glucocorticoides (corticosterona en roedores). Regulación por retroalimentación negativa de los glucocorticoides al inhibir CRH y ACTH (9).

Los GC tienen múltiples efectos metabólicos, entre los que destacan la regulación de la gluconeogénesis, la sensibilidad de la insulina, la captación de glucosa, la diferenciación de preadipocitos, la lipólisis, aumento del tono cardiovascular, inhibición de la conducta reproductiva y aumento de la concentración de glucosa en el cerebro (180,183,188), aunado a la regulación de los GC sobre la actividad del eje HHT. Por lo anterior, el estrés puede modificar la regulación de la

homeostasis energética y alterarla, pero a su vez, los cambios en la homeostasis energética regulan la actividad del eje HHA.

El consumo de alimentos por sujetos sanos está asociado al aumento de la concentración de cortisol en plasma (189) y el aumento de cortisol inducido por CRH está asociado con aumento en el consumo de alimento (190). Al mismo tiempo, la composición de la dieta puede afectar la respuesta del eje HHA, mientras que el estrés modifica el consumo de los macronutrientes. Por ejemplo, el reemplazo de GC en animales adrenalectomizados promueve el consumo de sacarosa (191), y ratas con estrés por restricción de movimiento que consumen manteca de cerdo, sacarosa o ambos, presentan una respuesta disminuida del eje HHA al reducir la concentración en plasma de ACTH y corticosterona así como aumento en el consumo de alimentos (192,193). En contraste, ratones adultos que consumen dieta alta en grasa por 6 semanas presentan un aumento en la concentración en plasma de corticosterona en respuesta a un estrés agudo (194), y el consumo de la dieta alta en grasa por 8 semanas en combinación con estrés crónico por 21 días aumenta la concentración de corticosterona basal e inducida por estrés (195). Esto evidencia las múltiples respuestas del eje HHA frente al estrés y al consumo de alimentos, por lo que no hay un consenso acerca de la respuesta del eje HHA frente a cambios metabólicos y diversos estresores.

Además de actuar directamente en el cerebro y regular el eje HHA, los GC actúan en el tejido adiposo y el hígado. El tejido adiposo visceral presenta una mayor densidad de GR y mayor actividad de la lipasa de lipoproteínas (LPL) en comparación con el subcutáneo (196), y dado que la LPL participa en la diferenciación de los preadipocitos, es probable que los GC promuevan la acumulación de tejido adiposo visceral (197). Así la composición corporal también puede ser modificada por GC.

1.1.5.1 Estrés prenatal

El estrés crónico induce hiperactivación del eje HHA y la liberación de CRH no sigue los patrones de secreción normal (198). La constante secreción de GC en esas condiciones regula a la baja la densidad de los receptores GR en el hipotálamo e hipocampo, y como consecuencia el funcionamiento del eje HHA se desregula (199). El exceso de GC circulantes en la madre influencia el desarrollo del hígado, los pulmones y el SNC y los ejes neuroendócrinos del feto, entre otros, ya que atraviesan la placenta (200).

El desarrollo del eje HHA es específico para cada especie (201), en especies como ratas y ratones comienza a nivel prenatal y termina durante el periodo postnatal temprano (5 primeros días postnatales) (202,203). En la rata y el ratón, el NPV del hipotálamo se desarrolla entre el día 13 y 15 de la gestación (204). En la rata, la expresión de RNAm de los receptores GR puede detectarse desde el día 13 de gestación en el hipocampo y en el hipotálamo y se incrementa rápidamente después de nacer. En cambio, la expresión del RNAm para el receptor de mineralocorticoides (MR) aparece en el hipocampo en el día 16 de gestación. Después de que terminan de desarrollarse estas zonas cerebrales, comienzan a liberarse los GC de forma pulsátil y en pequeñas cantidades (205,206). Esto apoya que el estrés durante la última semana de gestación puede alterar el desarrollo de redes neuronales y afectar la regulación del eje HHA manteniéndolo hiperexcitado frente a otro reto o estresor en la etapa adulta (207).

Una madre gestante que constantemente está sometida a estrés, presenta cambios fisiológicos, hormonales y psicológicos que pueden afectar al feto, haciéndolo más vulnerable a otros estresores en la etapa infantil o adulta, como por ejemplo el ayuno (que induce elevación de GC en suero) de manera intermitente y prolongada (208). Además, el estrés prenatal es un factor de riesgo para el desarrollo de trastornos psiquiátricos (depresión, ansiedad), induce una respuesta exagerada a un estímulo estresante en el adulto, reduce la

neurogénesis en el hipocampo y se relaciona con el desarrollo de la hipertensión, hiperglucemia y con características del síndrome metabólico (209).

Los modelos para estudiar el estrés en animales, se basan en someterlos a estímulos adversos o amenazantes de diferente naturaleza, intensidad, cronicidad y en diferentes etapas de la vida (210). El estrés crónico ligero (ECL) es un modelo animal que se basa en la exposición continua de los animales a una variedad de estresores ligeros como la privación de agua y alimento, disminución ligera de la temperatura ambiental, inclinación de la caja, entre otros. El tiempo comúnmente empleado para someter a los animales a estos diferentes estresores es de entre 4 y 8 horas diarias (211). El hecho de emplear diversos estresores en el ECL evita que los animales se habitúen a un mismo estresor empleado de manera crónica, y es factible detectar cambios neuroendócrinos o conductuales (212). De hecho, las ratas y ratones sometidos a ECL durante los días 15 al 21 de gestación, presentan en la etapa juvenil aumento significativo de corticosterona en plasma, lo cual conduce a la hiperactividad del eje HHA (213).

El estrés en las personas causa un cambio en los patrones de alimentación, aproximadamente el 40% aumenta la ingestión calórica, el 40% la disminuye y el 20% restante no la modifica (214-216). Esto está relacionado con el peso corporal de los individuos, ya que si está en el límite superior o hay sobrepeso, generalmente presentan mayor aumento de peso corporal en situaciones de estrés, mientras que los que tienen peso corporal normal o debajo de éste, no presentan modificación (217-219).

Las diferencias en el aumento o disminución de la ingestión alimentaria están asociadas al tipo de estímulo estresante que se aplica; si éste es moderado (restricción de movimiento, ruido) disminuye la ingestión en ratas (220-223), mientras que si es ligero (pinchamiento de cola), aumenta el consumo de alimentos de alta palatabilidad (224,225); otros tipos de estrés ligero (manipulación) no afectan el consumo del alimento (220).

II. Justificación

En México, la prevalencia de sobrepeso y obesidad ha aumentado dramáticamente tanto en niños como en adultos. En los niños ha alcanzado una prevalencia de 33.2% (226) aumentando el riesgo a desarrollar alteraciones metabólicas que pueden mantenerse hasta la edad adulta.

Debido a que la vida moderna ha detonado un cambio drástico en los factores ambientales, como son los patrones de sueño, los hábitos alimentarios y el estrés al que están sometidos los individuos en etapas críticas del desarrollo como la gestación o la prepubertad, el estudio de alteraciones sobre estos factores es relevante para identificar los mecanismos biológicos que se alteran y cómo éstos pueden facilitar la aparición de alteraciones metabólicas que impidan el desarrollo adecuado de los individuos.

El estudio de las repercusiones que tiene la alteración de los factores ambientales sobre el desarrollo de enfermedades metabólicas podría ayudar a generar intervenciones efectivas como programas encaminados a promover hábitos alimentarios que prevengan la aparición del sobrepeso, así como el desarrollo de terapias farmacológicas que contrarresten las alteraciones en las vías centrales y/o periféricas que presentan los individuos afectados.

III. Hipótesis

La alteración de los hábitos alimentarios en la etapa prepuberal modificará la actividad de los ejes neuroendócrinos en los animales adultos, repercutiendo en su conducta alimentaria y peso corporal. Así, modificando el inicio del consumo de alimentos de la fase de oscuridad a la fase de luz, observaremos un incremento en la liberación de hormonas del eje adrenal y una disminución de aquéllas del eje tiroideo lo que abatirá la tasa del metabolismo y facilitará el incremento de peso y desarrollo de hiperfagia.

Por otra parte, el estrés prenatal en combinación con el desfase del consumo de alimentos en la etapa prepuberal, potenciará los efectos esperados del desfase del consumo de alimentos sobre el eje adrenal, el tiroideo, el peso corporal y el consumo de alimento, sumando factores de riesgo para desarrollar enfermedades metabólicas que se mantendrán hasta la edad adulta.

IV. Objetivos

4.1 Objetivo general

Determinar el efecto de iniciar el consumo de alimento en la fase de luz (reposo) o en la oscuridad (actividad) en la etapa prepuberal y en combinación con el estrés prenatal, sobre el funcionamiento de ejes neuroendócrinos, la expresión de péptidos hipotalámicos que regulan la conducta alimentaria, el peso corporal y el consumo de alimento cuando estos animales llegan a la edad adulta.

4.2 Objetivos particulares

- Evaluar el efecto de de iniciar el consumo de alimento en la fase de luz (reposo) o en la oscuridad (actividad) en la etapa prepuberal y en combinación con el estrés prenatal sobre el funcionamiento del eje tiroideo y adrenal de ratas adultas.
- Analizar el efecto de iniciar el consumo de alimento en la fase de luz (reposo) o en la oscuridad (actividad) en la etapa prepuberal y en combinación con el estrés prenatal sobre el peso corporal y el consumo de alimento de ratas adultas.
- Analizar el efecto de de iniciar el consumo de alimento en la fase de luz (reposo) o en la oscuridad (actividad) en la etapa prepuberal y en combinación con el estrés prenatal sobre la expresión del RNAm de TRH y CRH en NPV.
- Determinar el efecto de iniciar el consumo de alimento en la fase de luz (reposo) o en la oscuridad (actividad) en la etapa prepuberal sobre la

señalización de la leptina en el ARC y NPV de animales adultos, tras ayuno de 48 h a la administración ip. de leptina.

V. Metodología

5.1 Animales

Los procedimientos en animales fueron aprobados por el Comité de Ética sobre experimentos en animales del Instituto Nacional de Psiquiatría RFM y concordaron con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 para el uso y cuidado de animales de laboratorio. Se utilizaron ratas Wistar preñadas (n=12) del bioterio del INPRFM y fueron mantenidas de manera individual en cajas de acrílico bajo condiciones controladas de luz/oscuridad (luz de 07:00 a 19:00 h) y temperatura ($24 \pm 1^\circ\text{C}$), con acceso *ad libitum* a alimento estándar de laboratorio (Lab rodent diet #5001, PMI feeds) y agua corriente. El día del parto se identificó como el día 0 y no se perturbaron a las crías hasta el día del destete (día postnatal (PN) 21). Al PN21, las crías macho (5-6 por camada) se separaron, enjaularon individualmente y dividieron en 6 grupos experimentales (n=22/grupo).

El peso corporal y el consumo de alimento se cuantificaron semanalmente hasta la edad adulta (semana 10), cuando los animales se sacrificaron por decapitación. Se obtuvieron los cerebros, se congelaron con hielo seco y mantuvieron a -70°C hasta que se llevó a cabo el análisis de la expresión del RNAm en el NPV de proTRH y proCRH por hibridación *in situ* (HIS); se disecaron y pesaron los subcompartimentos del tejido adiposo (tejido adiposo blanco (TAB): mesentérico, subcutáneo, epididimal, perirenal retroperitoneal; tejido adiposo pardo: subescapular) y de las glándulas adrenales; se colectó la sangre troncal para la determinación de la concentración sérica de hormonas (T_3 , T_4 , insulina, leptina y corticosterona).

5.1.1 Grupos experimentales

Dado que la maduración de las redes neuronales involucradas en la regulación de la homeostasis energética termina en la etapa postnatal, el programa de alimentación restringido en el tiempo, en la fase de luz u oscuridad, se llevó a cabo en la etapa prepuberal (semanas 4 y 5 de vida) y después de la semana 5 los animales se mantuvieron con alimentación y agua *ad libitum* hasta la semana 10.

Las madres se sometieron al modelo de estrés crónico ligero (ECL) entre el día 14 al 21 de gestación; cada día se aplicó un estresor distinto por 8 h (inclinación de la caja, caja sin aserrín, aserrín mojado, caja mojada sin aserrín, restricción de alimento, luz constante, restricción de movimiento (30 min)) con la finalidad de evitar la habituación al estímulo negativo. Se estresaron los animales hasta la tercera semana de gestación debido a que los circuitos neuronales que regulan el eje adrenal (hipotálamo, corteza frontal e hipocampo) se desarrollan durante este periodo.

- **Control (C):** animales con alimentación *ad libitum* durante toda la vida.
- **Alimentación en la fase de luz (AFL):** animales con inicio de consumo de alimento en la fase de luz (sueño) 17:00 h y disponibilidad restringida hasta las 9:00 h en la etapa prepuberal (semanas 4 y 5 de vida); a partir de la semana 6 se mantuvieron con alimentación *ad libitum* hasta la edad adulta (semana 10).
- **Alimentación en la fase de oscuridad (AFO):** animales con disponibilidad de alimento restringida a la fase de oscuridad en la etapa prepuberal (semanas 4 y 5 de vida) de 23:00 a 7:00 h; a partir de la semana 6 se mantuvieron con alimentación *ad libitum* hasta la edad adulta (semana 10).
- **Estrés prenatal-Control (EP-C):** animales sometidos a estrés prenatal y disponibilidad de alimento 24 h *ad libitum* durante toda la vida.
- **Estrés prenatal-Alimentación en la fase de luz (EP-AFL):** animales sometidos a estrés prenatal y con inicio de consumo de alimento en la fase de luz (sueño) 17:00 h y disponibilidad restringida hasta las 09:00 h en la etapa

prepuberal (semanas 4 y 5 de vida); a partir de la semana 6 se mantuvieron con alimentación *ad libitum* hasta la edad adulta (semana 10).

- **Estrés prenatal-Alimentación en la fase de oscuridad (EP-AFO):** animales sometidos a estrés prenatal y con disponibilidad de alimento restringida a la fase de oscuridad en la etapa prepuberal (semanas 4 y 5 de vida) de 23:00 a 07:00 h; a partir de la semana 6 se mantuvieron con alimentación *ad libitum* hasta la edad adulta (semana 10) (Fig. 6).

5.1.2 Administración intraperitoneal (ip.) de leptina a animales C, AFL, AFO después de 48 h de ayuno

Con la finalidad de evaluar la respuesta de neuronas hipotalámicas al ayuno o a la administración de leptina, un lote de animales sometidos a los horarios descritos arriba (C, AFL, AFO; n= 4-6/grupo) se sometieron a un ayuno durante 48 h y se administraron intraperitonealmente (ip.) con vehículo (veh: 0.9% de solución salina) o leptina murina recombinante (0.1 µg/g de peso corporal; Calbiochem [Merck Millipore], Darmstadt, Alemania) 2 veces al día, acorde a lo reportado anteriormente (227). Después de la administración de vehículo o leptina, los animales fueron realimentados y su consumo se registró durante 6 h. Se pesaron a los animales antes y después del ayuno para evaluar la variación; para obtener el % de cambio, se tomó como 100% el peso inicial. Al finalizar el periodo de realimentación, los animales se sacrificaron por decapitación, los subcompartimentos del tejido adiposo y las glándulas adrenales se trataron como se mencionó anteriormente, los cerebros se extrajeron y se mantuvieron a -70°C hasta el análisis de la expresión de transcritos de ARC y NPV por PCR en tiempo real (RT-PCR) (Fig. 6).

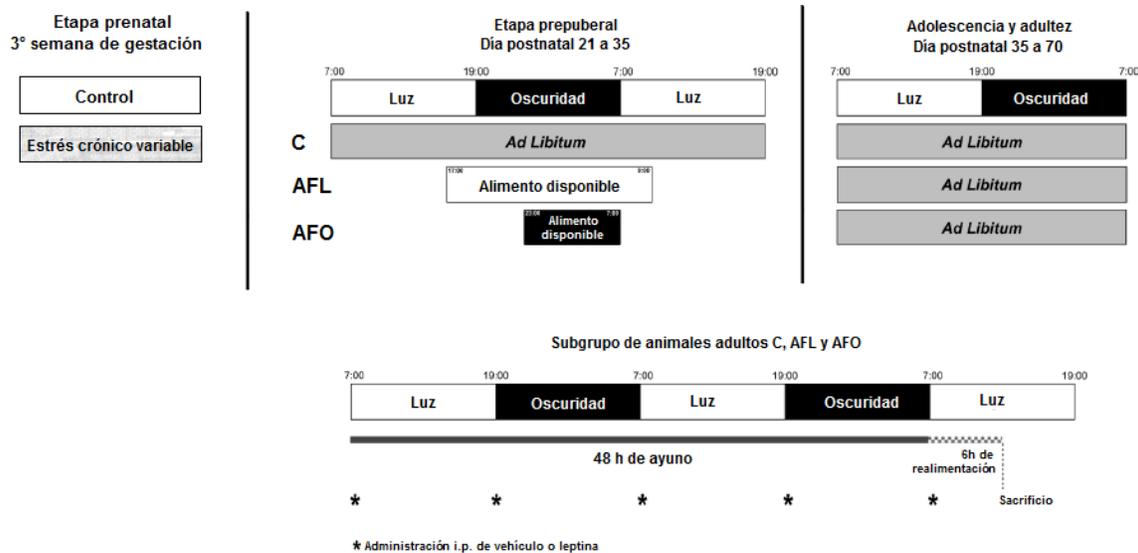


Fig. 6. Diseño experimental. Animales control C sin estrés prenatal; grupos EP expuestos a ECL durante la 3ª semana de gestación. Grupos C y EP-C tuvieron acceso *ad libitum* a agua y alimento, los animales que inician su alimentación en la fase de luz (AFL y EP-AFL) tuvieron acceso al alimento de 17:00 a 09:00 h y consumo libre de agua, y los grupos AFO y EP-AFO tuvieron disponibilidad de alimento sólo en la fase de oscuridad (23:00 a 07:00 h) y acceso libre a agua; el cambio en los patrones de disponibilidad de alimentos se realizó siempre entre los días 21 a 35 postnatales. A partir del día 35 y hasta el final del experimento todos tuvieron acceso *ad libitum* a agua y alimento sacrificándose en la semana 10. Un subgrupo de animales adultos C, AFL y AFO fueron ayunados el día 70 por 48 h y administrados ip. cada 12 h con veh o leptina murina recombinante (0.1 µg/g peso corporal), una vez que se cumplieron, se realimentó a los animales durante 6 h e inmediatamente después se sacrificaron.

5.2 Determinación del contenido sérico de hormonas

Se determinó la concentración de T₃, T₄, insulina, leptina y corticosterona en suero (T₃: 50 µl; T₄: 25 µl; insulina: 10 µl; leptina: 25 µl; corticosterona: 100 µl) por ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) siguiendo las instrucciones del fabricante (T₃, T₄ e insulina: ALPCO, Salem, NH, EUA; corticosterona y leptina: Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, EUA), sensibilidad: T₃, 0.2 ng/ml, T₄, 0.5 µg/dl, insulina, 0.124 ng/ml, corticosterona, 27 pg/ml y leptina, 67.2 pg/ml; variabilidad inter-ensayo: T₃, 10.3%, T₄, 4.5%, insulina, 9.95%, corticosterona, 13.1% y leptina, 11%; variabilidad intra-ensayo: T₃, 9.6%, T₄, 4.3%, insulina, 5.79%, corticosterona, 8.4% y leptina, 8.1%.

5.3 *Análisis de histoquímica por hibridación in situ (HIS)*

Los cerebros extraídos se seccionaron en un criostato (Microm HM 525; Carl Zeiss IMT Corporation, Maple Grove, MN, EUA) a -20°C y se obtuvieron cortes coronales de $14\ \mu\text{m}$ de grosor, los cuales incluyeron la longitud total del NPV (aNPV: -0.84 a -1.44 mm desde bregma, mNPV: -1.44 a -1.92 mm desde bregma, y cNPV: -1.92 a -2.28 desde bregma) (228). Para cada subcompartimento del NPV se colectaron tres secciones por laminilla (Superfrost/Plus, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA). Los cortes se fijaron con paraformaldehído al 4% a 4°C por 20 min en buffer PBS, digeridos con pronasa (24U/ml; Calbiochem [Merck Millipore], Darmstadt, Alemania) a 20°C por 2 min, y dejándose secar al aire antes de la hibridación. Se utilizó una mezcla de sondas de oligonucleótidos complementarios a las siguientes secuencias del RNAm de proTRH (número de acceso GenBank: NM_013046.2): 85 a 129, 407 a 471, 568 a 612, y del RNAm de proCRH (número de acceso GenBank: NM_031019.1): 114 a 158, 284 a 328, 536 a 580, las cuales fueron marcadas en 3' con [^{35}S] dATP (1250 Ci/mmol; PerkinElmer, Waltham, MA, EUA) utilizando la enzima deoxinucleotidil terminal transferasa (TdT) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). Las sondas de oligonucleótidos se sintetizaron en el Instituto de Biotecnología de la UNAM (Unidad de síntesis, IBT, Cuernavaca, Morelos, México) y se examinaron con el programa BLAST para evaluar la especificidad de las sondas. El protocolo de hibridación fue el siguiente: las sondas marcadas radioactivamente se diluyeron en una solución que de 50% formamida, SSC 4X (SSC 1X: 150 mM NaCl, 15 mM citrato de sodio), solución Denhardt (0.02% Ficoll, 0.02% polivinilpirrolidona, 0.02% BSA), 10% dextrán sulfato, 1% sarcosil, 20 mM buffer fosfatos pH 7.0), 250 $\mu\text{g/ml}$ tRNA de levadura y 500 $\mu\text{g/ml}$ de DNA de esperma de salmón, a una concentración final de 1.5-2 pmol. Los tejidos fijados se incubaron con la solución de hibridación y cubrieron con Parafilm (Bemis, Oshkosh, WI, EUA). Una vez que el tiempo de incubación se completó, las secciones se lavaron 4 veces en 0.6 M NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) a 60°C durante 45 min cada vez, y una vez en el mismo buffer a temperatura ambiente. Después de los lavados, las secciones se sumergieron en emulsión autoradiográfica Kodak NTB (Eastman Kodak Company,

Rochester, NY, EUA). Los autoradiogramas se revelaron (Kodak D-19, Eastman Kodak Company, Rochester, NY, EUA) después de 3 semanas de exposición a 4°C y fijaron (Ilford Hypam, Polysciences Inc., Warrington PA, EUA), se deshidrataron en etanol al 70% y 100% y se cubrieron con Entellan (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

5.3.1 Análisis de las imágenes

Los autoradiogramas se visualizaron con un microscopio Leica DM500 (Leica Microsystems Inc., Buffalo Grove, IL, EUA) bajo iluminación en campo oscuro y las imágenes se obtuvieron con una cámara Leica ICC50 W y el objetivo 10X. Se analizaron cuantificando la densidad óptica integrada (IOD) de la señal del NPV usando el software Image-Pro Plus 7.0 (Media Cybernetics, Inc., Rockville, MD, EUA). Para cada imagen se cuantificó el IOD del ruido de fondo y ese valor se sustrajo al IOD de la señal específica del NPV. Se analizaron tres cortes por subcompartimento del NPV por cada animal para proTRH y sólo el mNPV para proCRH (n= 4-5/grupo).

5.4 PCR en tiempo real (RT-PCR)

Los cerebros se disecaron manualmente para analizar la expresión de los RNAm del ARC (NPY, la isoforma larga del receptor de leptina (ObRb), el supresor de la señalización de citocinas 3 (SOCS3)) y del NPV (proTRH, proCRH, ObRb, SOCS3) por RT-PCR. El NPV (-0.84 a -2.28 mm desde bregma) y el ARC (-2.28 a -3.48 mm desde bregma) (228) se disecaron del tejido congelado con un sacabocados de 1 mm de diámetro y tratados, como se ha descrito para la extracción de RNAm por el método de tiocianato de guanidina (229). Brevemente, 1.5 mg de RNA se retro-transcribieron con la sonda para el oligo-dT (100 pmol/ml; Instituto de Biotecnología de la UNAM, Cuernavaca, Morelos, México) y con la transcriptasa reversa M-MLV (200 U/μl; Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) para obtener cDNA. El contenido de RNAm de NPY, SOCS3 y ObRb del ARC, así como los de proTRH, proCRH, ObRb y SOCS3 del NPV se analizaron utilizando

reactivos y equipo de Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA), incluyendo el TaqMan Universal PCR Master Mix, el sistema 7500 real-time PCR, las sondas para oligonucleótidos (Npy, Rn014 10145_m1; Socs3, Rn00585674_s1; Lepr, Rn01433205_m1; Trh, Rn00564880_m1; Crh, Rn01462137_m1; Actb, Rn00667869_m1). Se utilizó el método de cuantificación relativa $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para calcular el cambio en la expresión de los RNAm blanco, utilizando a la β -actina como gen constitutivo para normalizar los datos.

5.5 *Análisis estadístico*

Los datos se reportaron como el promedio \pm error estándar de la media (EEM). Los cambios en el peso corporal y en el consumo de alimento entre grupos a lo largo de las 10 semanas experimentales se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías de medidas repetidas. Los datos del peso de las glándulas adrenales y los subcompartimentos del tejido adiposo, los niveles de hormonas séricas y la expresión de proTRH y proCRH en las subdivisiones del NPV se analizaron con ANOVA de una vía. El ANOVA de dos vías se llevó a cabo para comparar la pérdida de peso, los cambios en el consumo de alimento después de la realimentación, el peso de las glándulas adrenales y de los subcompartimentos del tejido adiposo, y de la expresión de péptidos en el ARC y NPV por RT-PCR, entre animales tratados ip. con vehículo o leptina después de 48 h de ayuno. Cuando $P < 0.05$, se realizó la prueba post-hoc de Tukey.

VI. Resultados

6.1 Efecto de iniciar la disponibilidad de alimentos en fase de luz (AFL) o restringirla a la de oscuridad (AFO) en la etapa prepuberal sobre parámetros endócrinos y moleculares de animales adultos.

6.1.1 Peso corporal, de las glándulas adrenales y subcompartimentos del tejido adiposo y consumo de alimento

El peso corporal de los animales AFL aumentó 11% desde la semana 5 en comparación con el del grupo AFO y 9 y 12% desde la semana 6 al compararlo con los grupos C (100%) y AFO; dicho incremento se mantuvo hasta la semana 10 alcanzando el 17% (Fig. 7). El ANOVA de dos vías de medidas repetidas mostró un efecto del programa de alimentación ($F_{(2,736)}= 37.46$, $P<0.0001$), de la edad ($F_{(7,736)}= 801.54$, $P<0.0001$) y la interacción entre variables fue significativa ($F_{(14,736)}= 1.71$, $P<0.05$). De manera similar el consumo de alimento del grupo AFL incrementó en promedio 12% a lo largo del experimento al compararlo con el de animales C (100%) y AFO (Fig. 8). El ANOVA de dos vías de medidas repetidas mostró un efecto significativo del programa de alimentación ($F_{(2,672)}= 33.69$, $P<0.0001$) y de la edad ($F_{(6,672)}= 165.11$, $P<0.0001$). El peso de las glándulas adrenales, del tejido adiposo pardo, y de los subcompartimentos subcutáneo y epididimal del tejido adiposo blanco no mostró diferencias entre grupos (Tabla 1). En contraste, el peso de los subcompartimentos mesentéricos y perirenal retroperitoneal del grupo AFL se incrementó 154% y 173%, respectivamente al compararlos con C (100%) (Tabla 1; mesentérico: $F_{(2,15)}= 10.019$, $P<0.01$; perirenal retroperitoneal: $F_{(2,15)}= 5.566$, $P<0.05$).

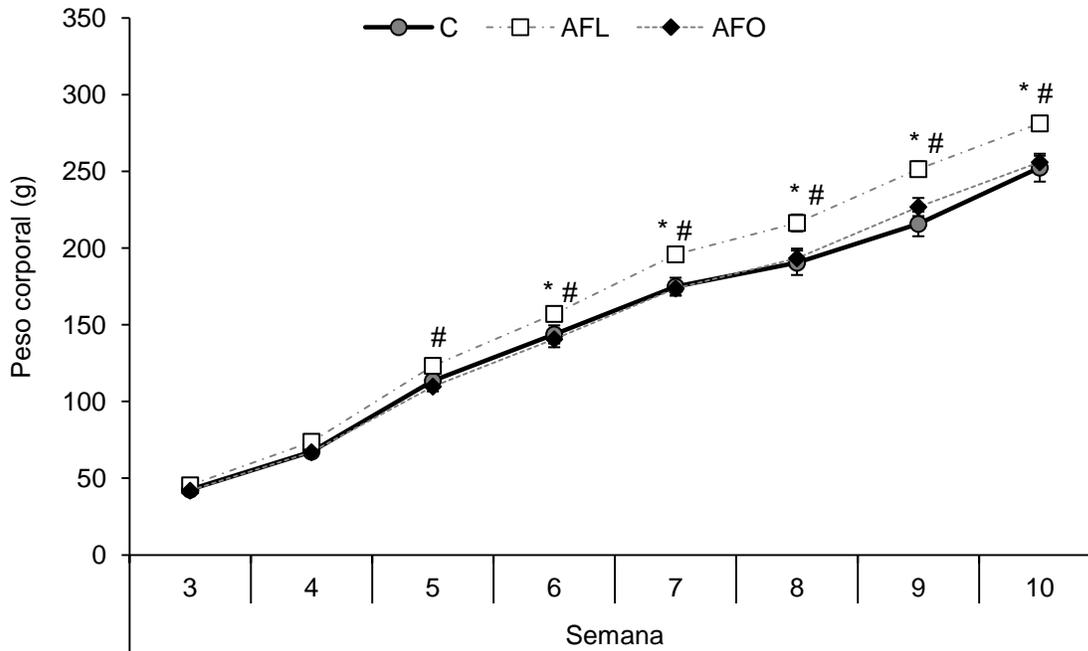


Fig. 7. Registro semanal del peso corporal de animales C, AFL y AFO. Datos expresados como la media \pm error estándar de la media (EEM) en gramos (n=22/grupo), *P<0.05 vs C; #P<0.05 vs AFO.

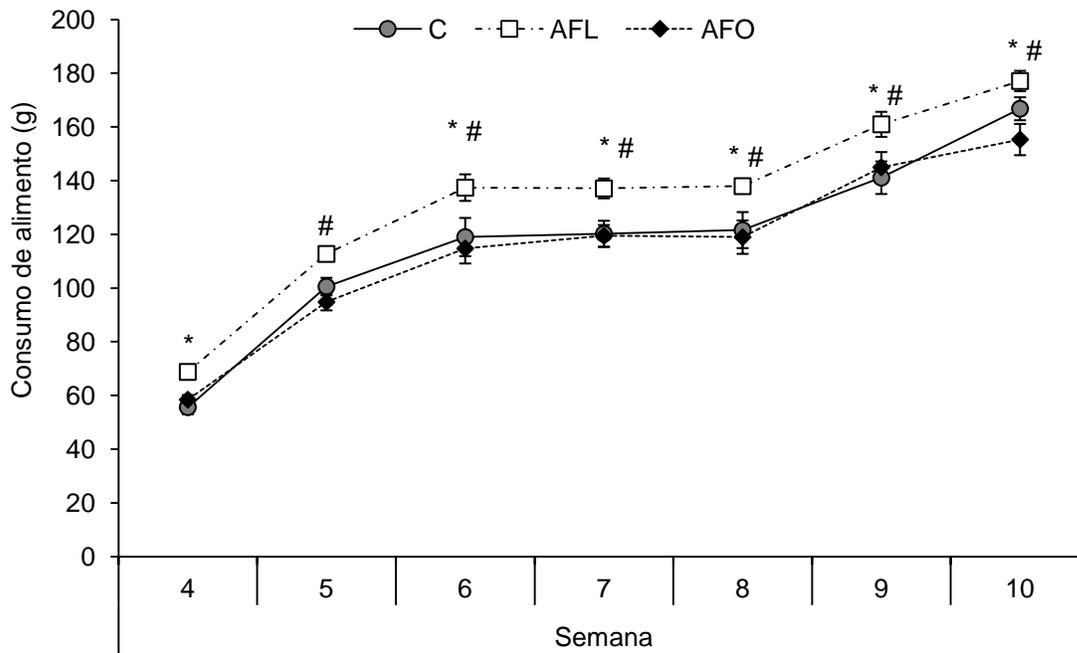


Fig. 8. Registro semanal del consumo de alimento de animales C, AFL y AFO. Datos expresados como la media \pm error estándar de la media (EEM) en gramos (n=22/grupo), *P<0.05 vs C; #P<0.05 vs AFO.

Tabla 1. Peso de las glándulas adrenales y de los subcompartimentos del tejido adiposo.

	C	AFL	AFO
Glándulas adrenales (g)	0.04 ± 0.003	0.04 ± 0.002	0.04 ± 0.002
TAP (g)	0.27 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.26 ± 0.02
TAB subcutáneo (g)	1.8 ± 0.2	2.1 ± 0.2	1.9 ± 0.2
TAB epididimal (g)	3.3 ± 0.3	3.7 ± 0.4	3.6 ± 0.8
TAB mesentérico (g)	2 ± 0.1	3.2 ± 0.2 *	2.5 ± 0.3
TAB perirenal retroperitoneal (g)	2.4 ± 0.3	4 ± 0.5 *	2.8 ± 0.3

Peso de las glándulas adrenales y de los subcompartimentos del tejido adiposo de animales adultos C, AFL y AFO. TAP, tejido adiposo pardo; TAB, tejido adiposo blanco. Datos expresados como la media ± EEM en gramos (glándulas adrenales, TAP y TAB subcutáneo: n=22/grupo; TAB epididimal, mesentérico y perirenal retroperitoneal: n=6/grupo), *P<0.05 vs C.

6.1.2 Concentración sérica de hormonas

A pesar de que la concentración sérica de T₄ se redujo 21% en animales AFL al compararlos con C (100%; F_(2,30)= 3.727, P<0.05), el contenido de T₃ no cambió entre grupos (Tabla 2). Las concentraciones séricas de insulina, corticosterona y leptina en animales AFL incrementaron 1.4, 2.7 y 1.4 veces más, respectivamente, vs. C y la concentración de corticosterona 3.3 veces más que en los animales AFO (Tabla 2; insulina: F_(2,24)= 5.273, P<0.05; corticosterona: F_(2,16)= 8.092, P<0.01; leptina: F_(2,45)= 3.660, P<0.05).

Tabla 2. Contenido sérico de hormonas de animales adultos con desfase de la alimentación en la etapa prepuberal.

	C	AFL	AFO
T ₄ (µg/dl)	11.9 ± 0.8	9.3 ± 0.8 ^{*+}	11.5 ± 0.5
T ₃ (ng/dl)	100.6 ± 5.5	107.7 ± 4.1	93.1 ± 3.9
Insulina (ng/ml)	0.6 ± 0.05	0.9 ± 0.08 [*]	0.7 ± 0.04
Corticosterona (ng/ml)	248.3 ± 71.4	667.4 ± 110 ^{**}	205 ± 81.8
Leptina (pg/ml)	1273.7 ± 124.3	1893.3 ± 211 ^{**}	1306.3 ± 150.6

La determinación de hormonas fue realizada en el suero de animales C, AFL y AFO de 10 semanas de edad (n=6/grupo). Datos expresados como la media ± EEM, *P<0.05 vs C; +P<0.05 vs AFO.

6.1.3 Expresión del RNAm de *proTRH* y *proCRH* en el NPV por HIS

La expresión del RNAm de *proTRH* en el aNPV que contiene neuronas no hipofisiotrópicas no se modificó entre grupos experimentales (Fig. 9A-C, J). Las neuronas TRHérgicas hipofisiotrópicas del NPV medial y caudal que dirigen la actividad del eje tiroideo disminuyeron la expresión del RNAm de *proTRH* en animales AFL al 70% en el mNPV (Fig. 9D-F, J; $F_{(2,19)}= 4.43$, $P<0.05$), mientras que en el cNPV disminuyó al 56% en comparación con el grupo C (100%) (Fig. 9A-J; $F_{(2,18)}= 4.969$, $P<0.05$). La expresión del RNAm de *proCRH* aumentó a 144% en el NPV de animales AFL en comparación con animales C (100%) y AFO (Fig. 10A-D; $F_{(2,10)}= 6.608$, $P<0.05$).

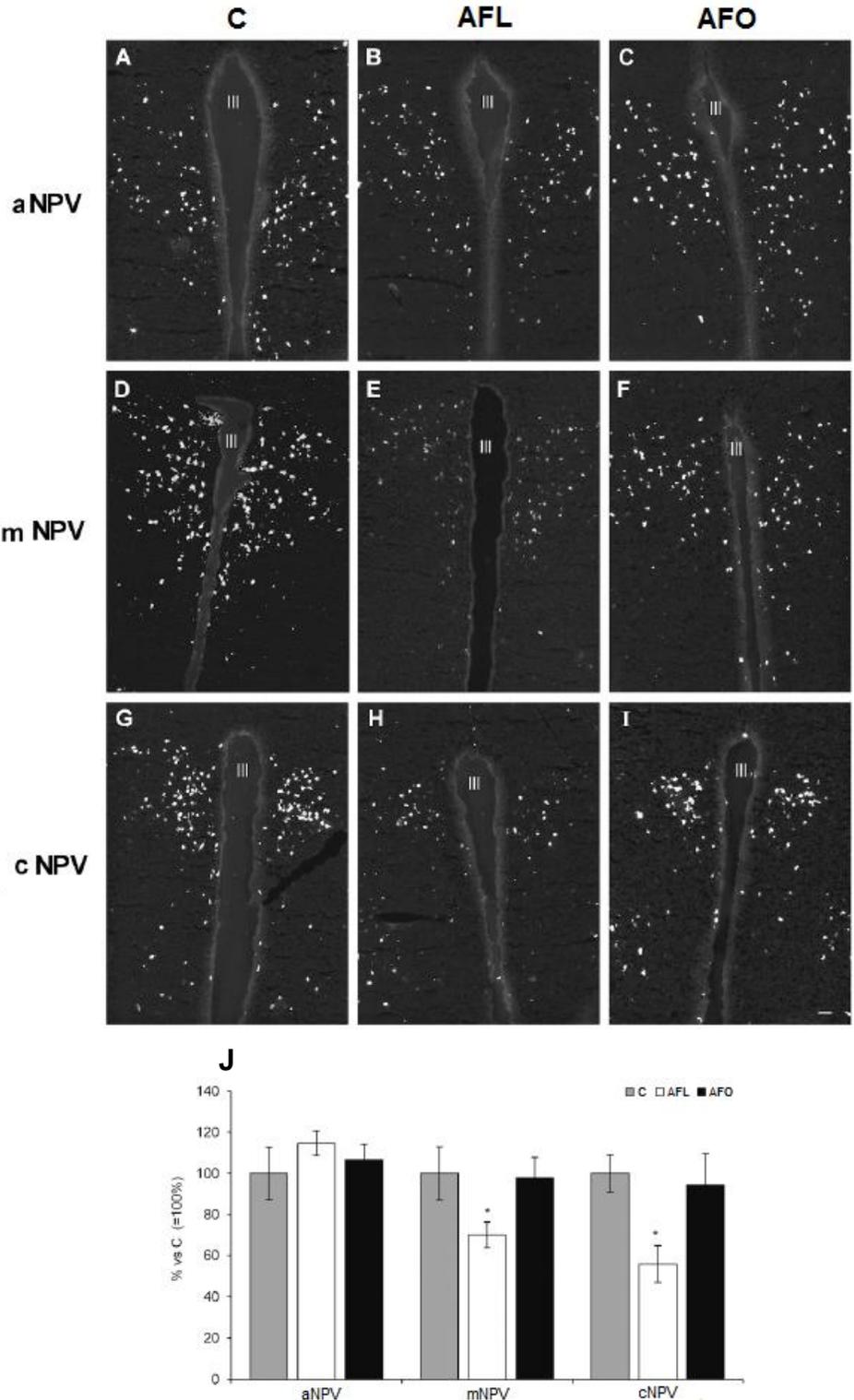


Fig. 9. Expresión de proTRH en subcompartimentos del NPV. (A-I) Fotomicrografías con iluminación en campo oscuro y magnificación 10X de muestras representativas de la expresión por HIS del RNAm de proTRH marcado radioactivamente en el aNPV de animales C (A), AFL (B) y AFO (C), en el mNPV de C (D), AFL (E) y AFO (F), y en el cNPV de C (G), AFL (H) y AFO (I). III:

tercer ventrículo. Barra de escala 50 μ m. (J) Expresión de proTRH en los subcompartimentos del NPV de animales C, AFL y AFO. Datos expresados como la media \pm EEM del porcentaje de valores de C (100%; n=4/grupo), *P<0.05 vs C.

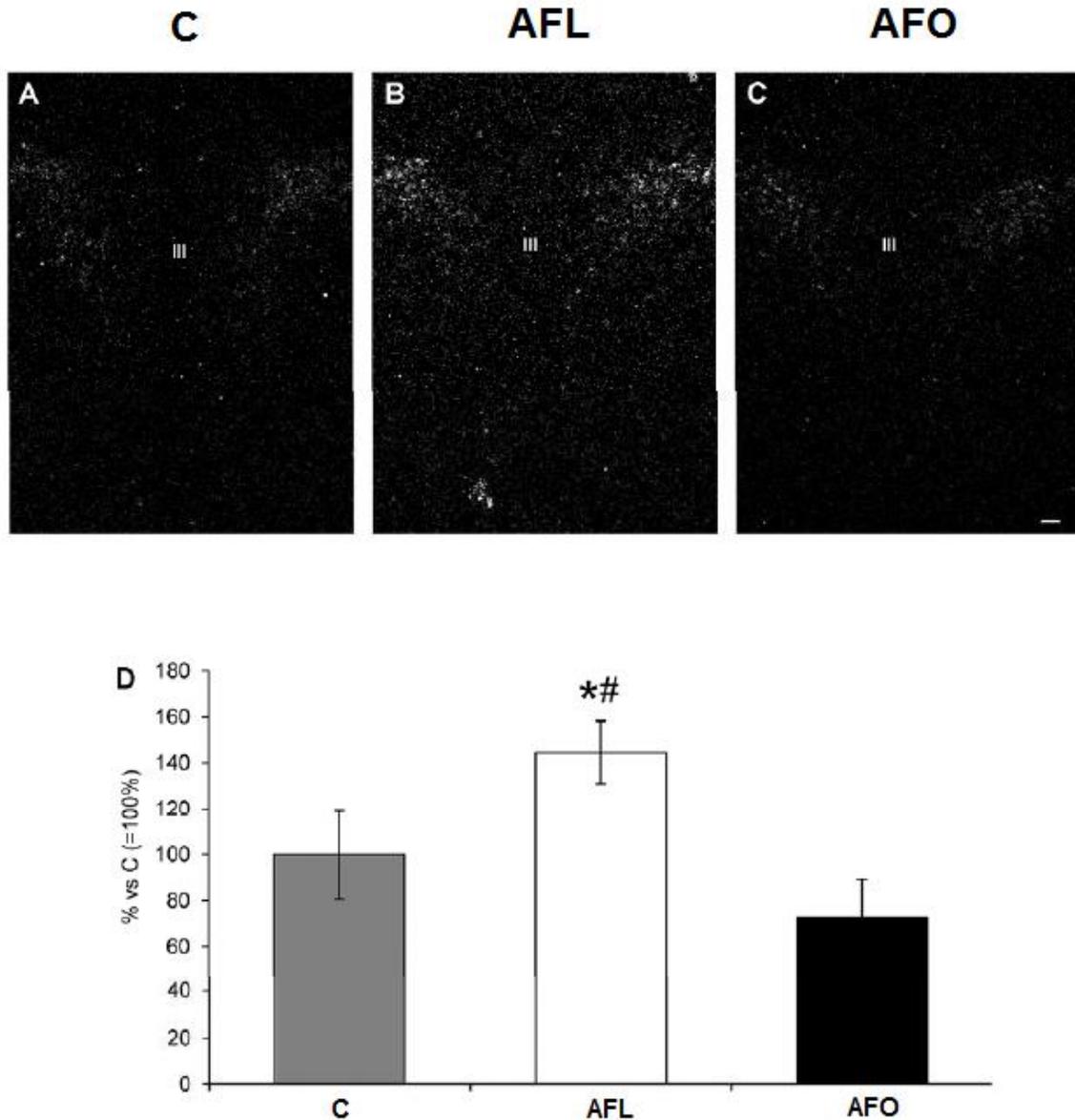


Fig. 10. Expresión de proCRH en el NPV. (A-C) Fotomicrografías con iluminación en campo oscuro y magnificación 10X de muestras representativas de la expresión por HIS del RNAm de proCRH marcado radioactivamente en el NPV de animales C (A), AFL (B) y AFO (C). III: tercer ventrículo. Barra de escala 50 μ m. (D) Expresión de proCRH en el NPV de animales C, AFL y AFO. Datos expresados como la media \pm EEM del porcentaje de valores de C (100%; n=4-5/grupo). *P<0.05 vs C; #P<0.05 vs AFO.

6.1.4 Efecto del ayuno de 48 h y la administración de leptina sobre el peso corporal y el consumo de alimento 6 h después de la realimentación.

Debido a que los animales AFL mostraron incremento en el peso corporal, del TAB visceral y en la concentración sérica de leptina, el eje HHT debió activarse con la finalidad de promover aumento en la tasa metabólica; en cambio, la expresión de proTRH del NPV hipofisiotrópico disminuyó. Por ello, animales de los tres grupos se sometieron a 48 h de ayuno administrando ip. vehículo o leptina y se cuantificó la expresión de neuropéptidos hipotalámicos involucrados en la regulación de la alimentación, así como la de moléculas de la cascada de señalización de la leptina.

Los animales con ayuno y tratados con veh o leptina disminuyeron su peso corporal de manera similar (Fig. 11); el porcentaje de pérdida de peso corporal (% Δ) fue de la siguiente manera: 6.5, 9.6 y 7.3% en C-veh, AFL-veh y AFO-veh y 8.5, 8.8 y 8.4% en C-lep, AFL-lep y AFO-lep respectivamente, comparados con su peso corporal antes del ayuno (100%), pero no hubieron diferencias entre grupos o tratamientos. Después de 48 h de ayuno y tratamiento ya fuera con veh o leptina, los animales se realimentaron por 6 h registrándose su consumo de alimento. Como se esperaba, el tratamiento con leptina disminuyó el consumo de alimento en animales C-lep a 78% y en AFO-lep a 84% al compararlos con sus respectivos grupos con veh (100%; Fig. 12), sin embargo, la AFL evitó el efecto de la leptina ya que ese grupo consumió 84% más alimento que C-lep (Fig. 12). El ANOVA de dos vías mostró diferencias entre grupos ($F_{(2,28)}= 34.498$, $P<0.001$) y en la interacción entre grupos y tratamiento ($F_{(2,28)}= 14.088$, $P<0.001$).

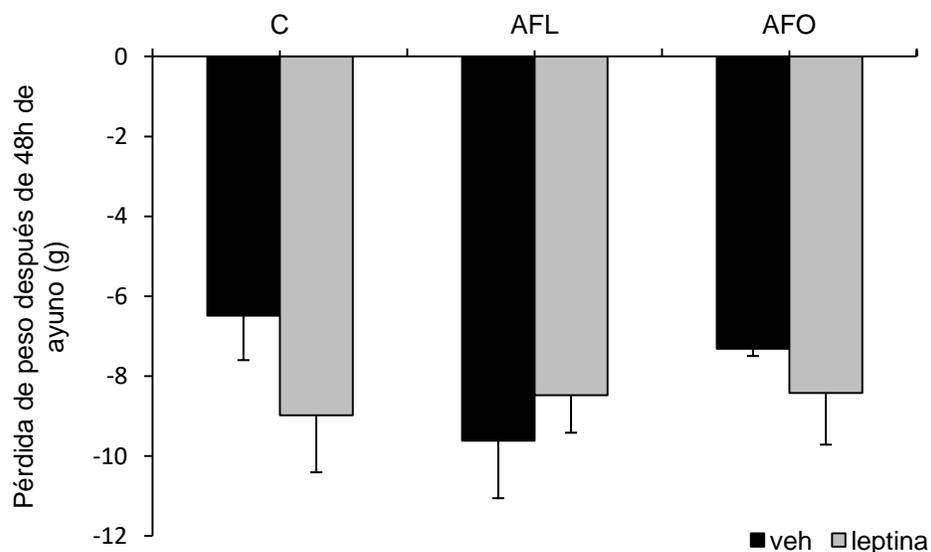


Fig. 11. Pérdida de peso corporal de animales adultos C, AFL y AFO ayunados y administrados ip. con veh o leptina. Pérdida de peso corporal después de 48 h de ayuno de animales C, AFL y AFO de 10 semanas de edad administrados con veh o leptina murina recombinante (0.1 μ g/g peso corporal). Valores expresados como la media \pm EEM de gramos de peso perdidos (n=5-6/grupo).

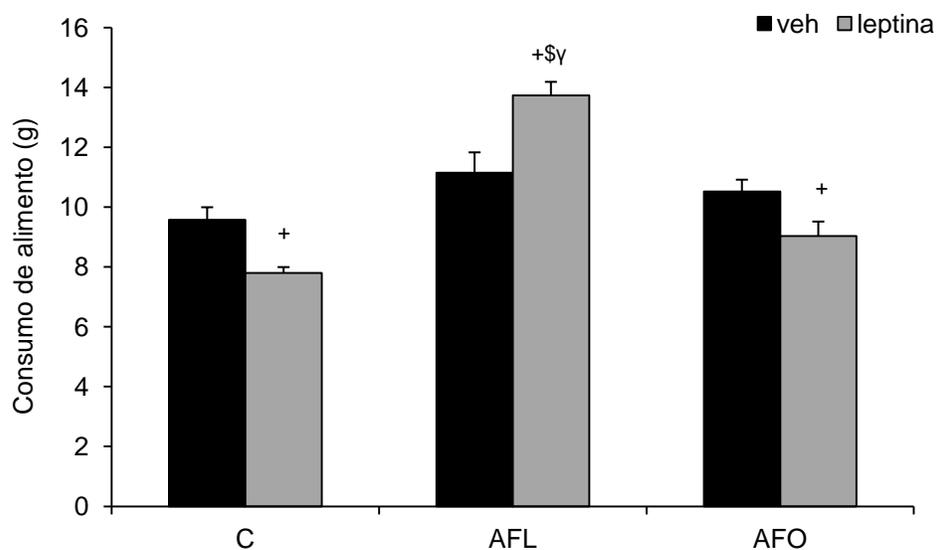


Fig. 12. Consumo de alimento de animales adultos C, AFL y AFO ayunados y administrados ip. con veh o leptina Consumo de alimento después de 48 h de ayuno de animales C, AFL y AFO de 10 semanas de edad administrados con veh o leptina murina recombinante (0.1 μ g/g peso corporal), realimentados durante 6 h posteriores al ayuno. Valores expresados como la media \pm EEM de gramos de alimento consumido (n=5-6/grupo), +P<0.05 vs. su respectivo grupo veh; \$P<0.05 vs. C-leptina, ^yP<0.05 vs. AFO-leptina.

En lo que concierne al peso de las glándulas adrenales y los subcompartimentos del tejido adiposo, el peso del TAB mesentérico y perirenal retroperitoneal en los animales AFL fue mayor que el del grupo C como ya se había mencionado anteriormente (Tabla 3). El peso de las glándulas adrenales y del resto de los subcompartimentos del tejido adiposo no cambió entre grupos o en función del tratamiento (Tabla 3). El ANOVA de dos vías mostró diferencias únicamente entre grupos en el TAB mesentérico ($F_{(2,28)}=4.726$; $P<0.05$) y el perirenal retroperitoneal ($F_{(2,28)}=4.075$; $P<0.05$).

Tabla 3. Efecto de 48 h de ayuno y tratamiento con leptina sobre el peso de las glándulas adrenales y los subcompartimentos del tejido adiposo.

	C-veh	AFL-veh	AFO-veh	C-lep	AFL-lep	AFO-lep
Glándulas adrenales (g)	0.07 ± 0.004	0.06 ± 0.005	0.06 ± 0.005	0.06 ± 0.005	0.06 ± 0.007	0.06 ± 0.003
Tejido adiposo pardo (g)	0.26 ± 0.02	0.24 ± 0.02	0.27 ± 0.04	0.28 ± 0.02	0.26 ± 0.03	0.25 ± 0.04
TAB subcutáneo (g)	2.7 ± 0.1	3.2 ± 0.5	3 ± 0.5	2.7 ± 0.6	3.1 ± 0.2	3.4 ± 0.5
TAB epididimal (g)	3.5 ± 0.2	3.7 ± 0.4	3.6 ± 0.8	4.1 ± 0.03	3.8 ± 0.5	3.7 ± 0.4
TAB mesentérico (g)	2 ± 0.1	3.2 ± 0.2 *	2.5 ± 0.3	2.2 ± 0.2	3.1 ± 0.3 \$	2.9 ± 0.6
TAB perirenal retroperitoneal (g)	2.4 ± 0.4	4.1 ± 0.5 *	2.8 ± 0.3	2.5 ± 0.2	3.2 ± 0.3 \$	3 ± 0.6

Peso de las glándulas adrenales y de los subcompartimentos del tejido adiposo de animales C, AFL y AFO adultos tras ser retados con 48 h de ayuno y administrados con 2 inyecciones ip. diarias de veh o leptina (0.1 µg/g peso corporal), con posterior realimentación por 6 h y sacrificio inmediato. TAB, tejido adiposo blanco. Datos expresados como la media ± EEM en gramos (n=5-6/grupo). * $P<0.05$ vs C-veh, \$ $P<0.05$ vs C-lep.

6.1.5 Efecto del ayuno de 48 h y la administración de leptina sobre la expresión del RNAm de péptidos hipotalámicos

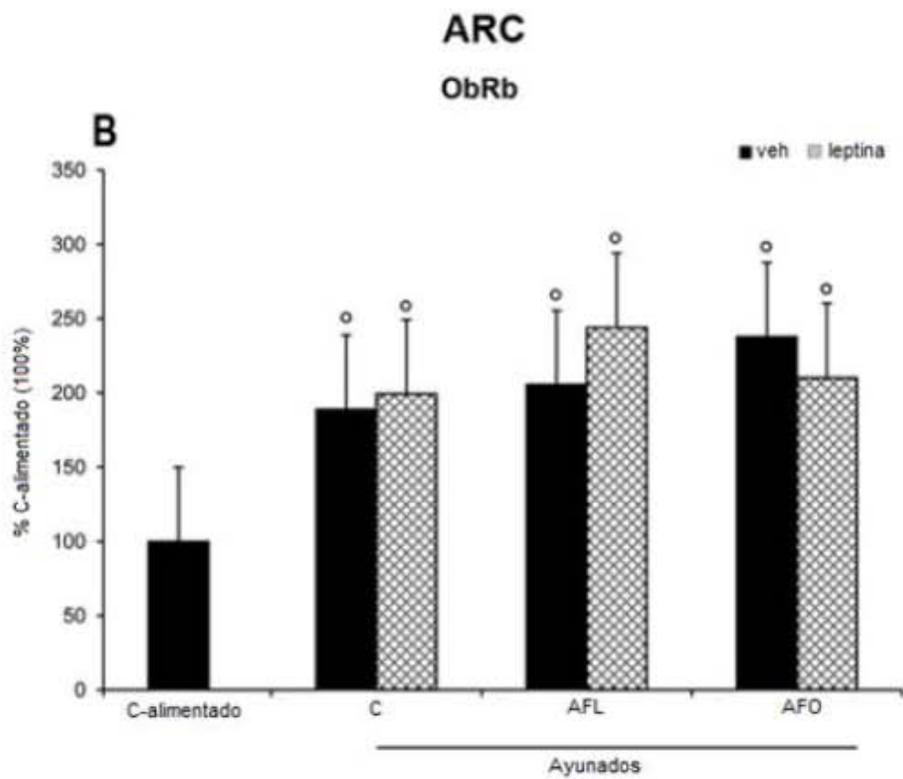
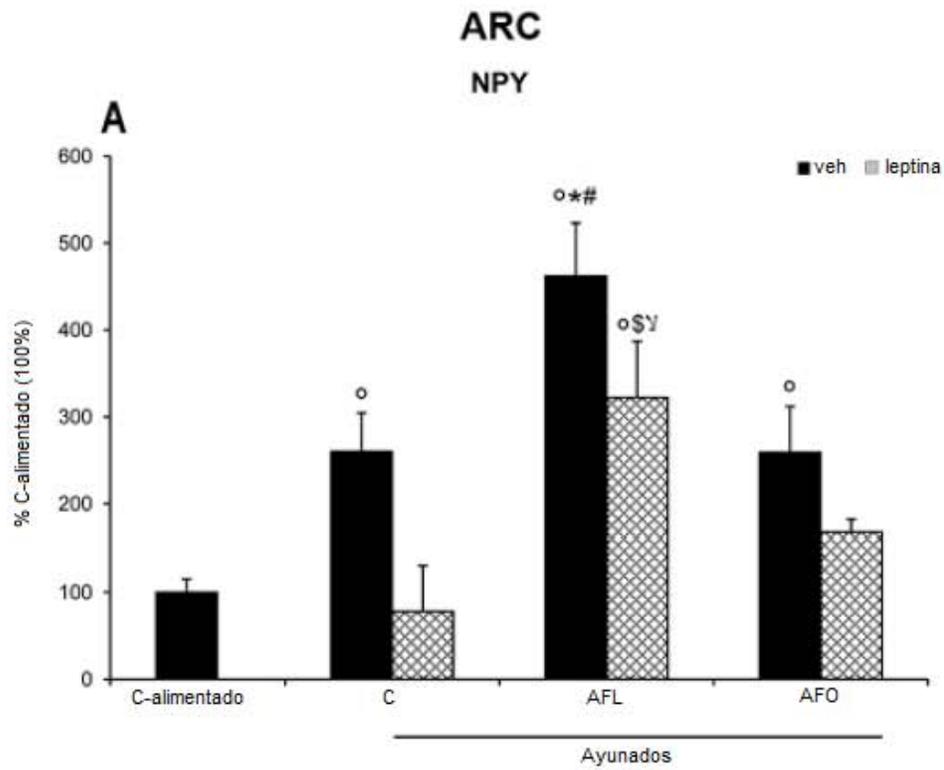
6.1.5.1 Núcleo arcuato (ARC)

Los animales AFL administrados con veh mostraron mayor respuesta a la reportada del ARC frente a un reto metabólico como el ayuno: la expresión del RNAm de NPY en animales AFL incrementó a 177% que la de animales C-veh y AFO-veh vs. el grupo C-alimentado (100%; Fig. 13A). Esto podría estar implicado

en su mayor consumo de alimento y peso corporal presentado antes del ayuno. Como se esperaba, la administración de leptina disminuyó la expresión del RNAm de NPY en animales C-lep y AFO-lep a 56 y 65%, respectivamente vs C-alimentado (100%). En contraste, en el grupo AFL-lep no hubo cambio comparado con AFL-veh (Fig. 13A). El ANOVA de dos vías indicó diferencias entre grupos ($F_{(2,25)}=10.790$, $P<0.001$) y tratamiento ($F_{(1,25)}=6.490$, $P<0.05$).

El contenido del RNAm de ObRb se incrementó conforme a lo esperado en todos los grupos en respuesta al ayuno y con la administración de leptina, pero sin diferencias entre grupos ayunados (Fig. 13B).

En cambio, su señalización se reveló en animales AFL-veh al incrementar 205% del contenido del RNAm de SOCS3 comparándolo con el de animales C-veh (Fig. 13C): esto concordó con el aumento de la expresión de NPY del mismo grupo (Fig. 13A). La administración periférica de leptina incrementó la expresión de SOCS3 a 436 y 531%, respectivamente en los grupos C y AFO vs. la inyección con vehículo, pero no en animales AFL-lep, quienes mantuvieron el mismo incremento que su control (AFL-veh) (Fig. 13C), revelando la alteración en la señalización de leptina en neuronas del ARC de animales AFL. El ANOVA de dos vías mostró un efecto significativo de los grupos ($F_{(2,24)}= 3.879$, $P<0.05$) y del tratamiento ($F_{(1,24)}= 6.590$, $P<0.05$).



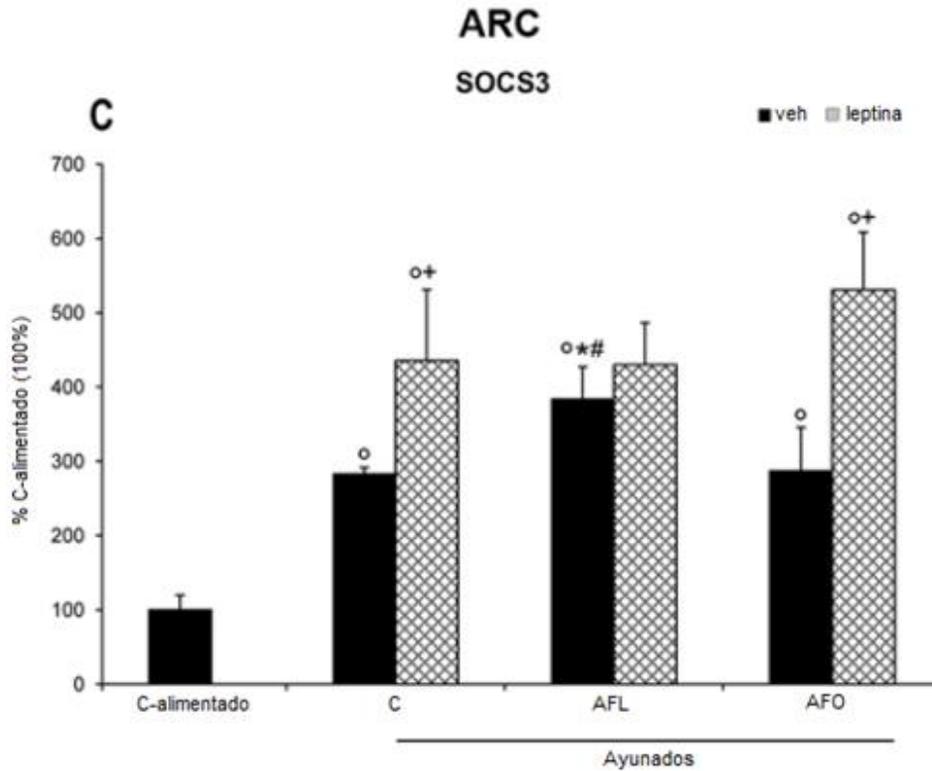
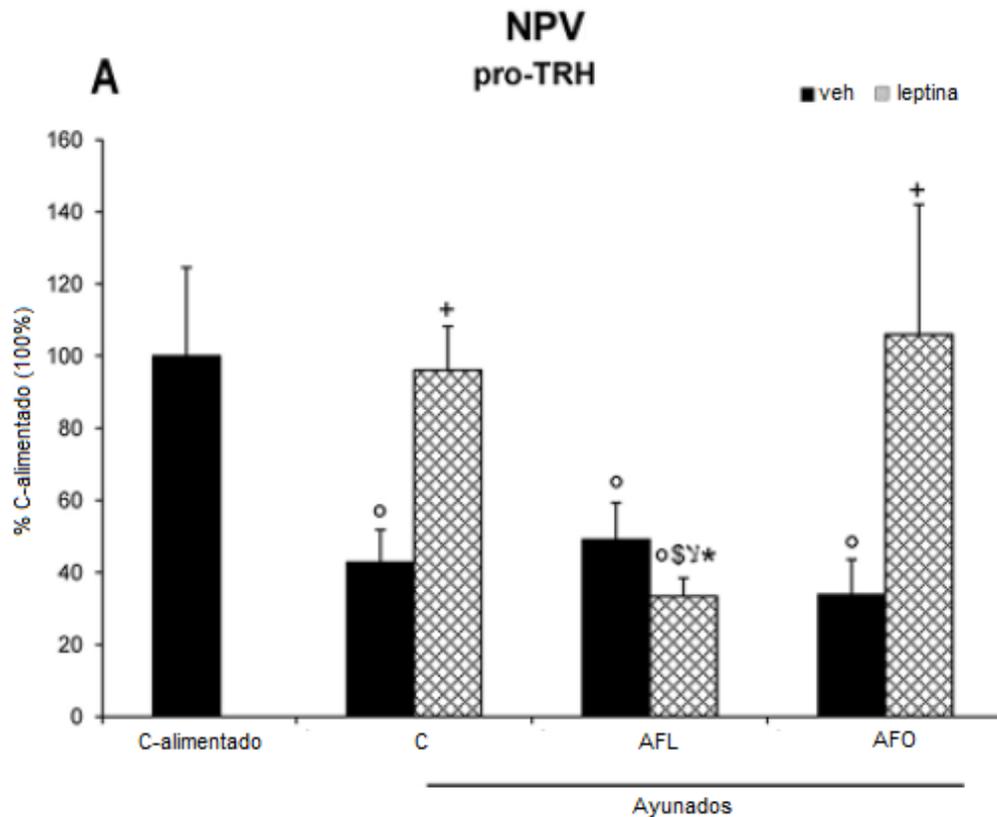


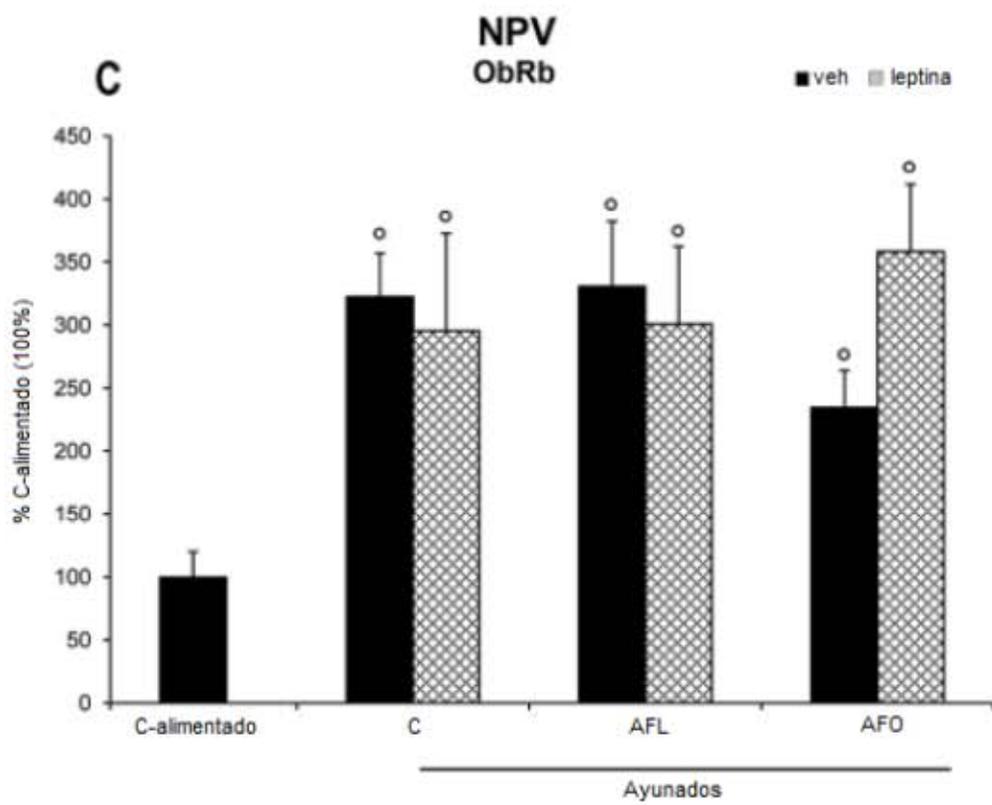
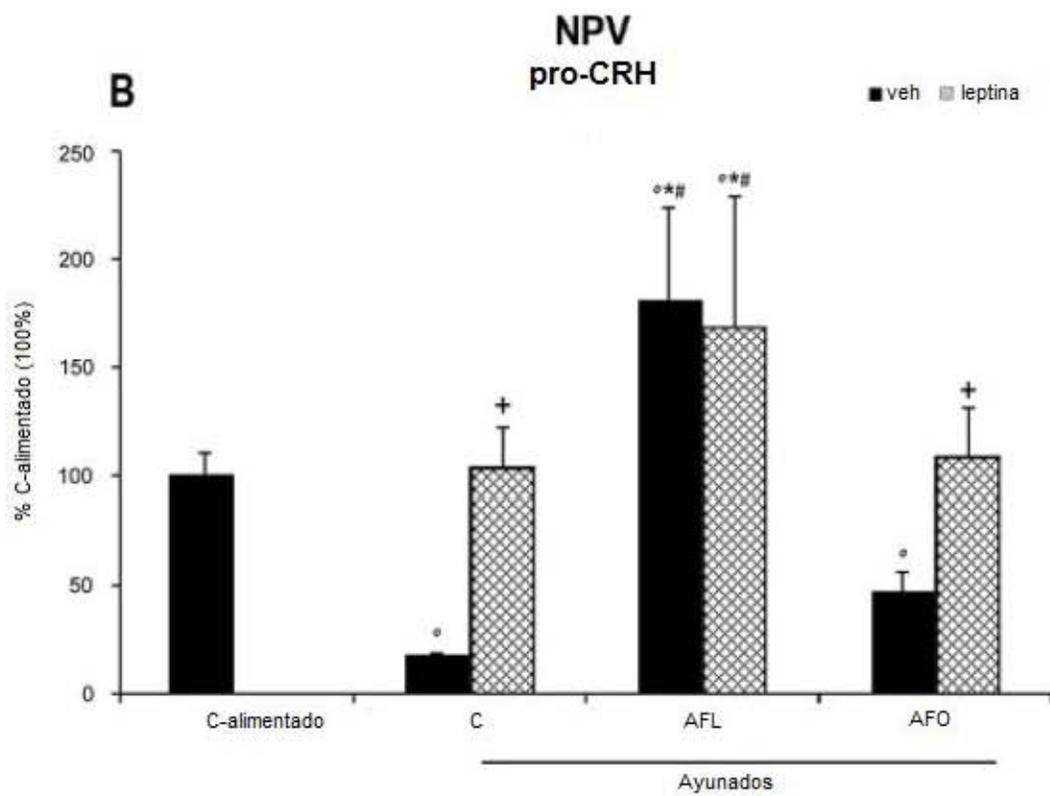
Fig. 13. Expresión de péptidos del ARC en animales adultos C, AFL y AFO ayunados administrados con veh o leptina murina recombinante (0.1 µg/g peso corporal). Los datos son la expresión del RNAm por PCR en tiempo real de cada amplicón estudiado después de ser normalizado contra la expresión del RNAm de actina por el método de cuantificación relativa $2^{-\Delta\Delta Ct}$. A) NPY, B) ObRb y C) SOCS3. Valores expresados como la media \pm EEM del porcentaje de los valores de C-alimentados. (100%; %; n=5-6/grupo). °P<0.05 vs C-alimentado; +P<0.05 vs su respectivo grupo veh; *P<0.05 vs C-veh; #P<0.05 vs AFO-veh; \$P<0.05 vs C-lep, ¥P<0.05 vs AFO-lep.

6.1.5.2 Núcleo paraventricular (NPV)

Como se esperaba, el ayuno de 48 h disminuyó el contenido de RNAm de proTRH en animales C, AFL y AFO (Fig. 14A). De manera interesante, la administración de leptina no fue capaz de aumentarla en el grupo AFL (33%) como sí se observó en C (96%) y AFO (106%) comparando con sus controles (veh) (Fig. 14A). El ANOVA de dos vías mostró efecto de los grupos ($F_{(2,28)}= 19.992$, $P<0.001$), del tratamiento ($F_{(1,28)}= 9.813$, $P<0.01$) y de la interacción entre variables ($F_{(2,28)}= 4.418$, $P<0.05$).

Como se esperaba, la expresión de proCRH disminuyó en los grupos C (18%) y AFO (47%) administrados con veh vs el grupo C-alimentado (=100%), reducción que no se observó en animales AFL-veh cuya expresión de proCRH incrementó a 181% vs. C (Fig. 14B). La administración de leptina restauró el contenido del RNAm de proCRH en grupos C-lep (104%) y AFO-lep (109%) a valores del grupo C-alimentado (100%), pero en animales AFL-lep no incrementó más allá de la expresión en AFL-veh (168%) (Fig. 14B). El ANOVA de dos vías mostró efecto de los grupos ($F_{(2,22)}= 4.990$, $P<0.01$). Por otra parte, la expresión del RNAm de ObRb y SOCS3 en el NPV no se alteró ni en función del tratamiento ni de los diferentes grupos (Fig. 14C-D).





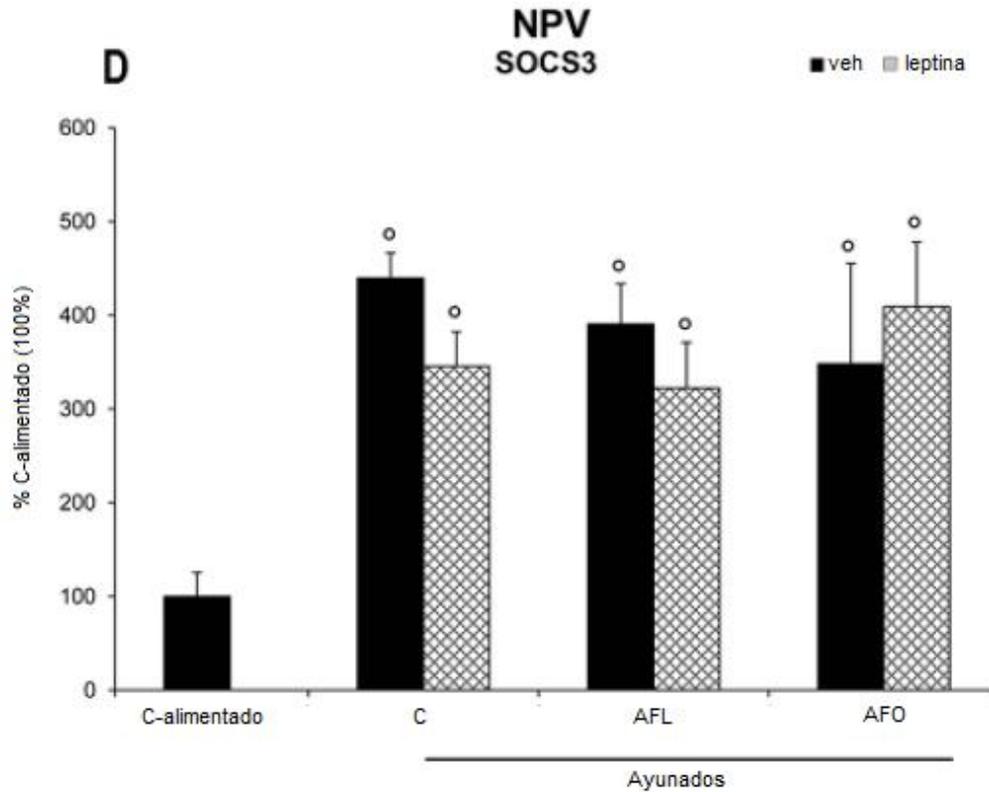


Fig. 14. Expresión de péptidos del NPV en animales adultos C, AFL y AFO ayunados administrados con veh o leptina murina recombinante (0.1 µg/g peso corporal). Los datos son la expresión del RNAm por PCR en tiempo real de cada amplicón estudiado después de ser normalizado contra la expresión del RNAm de actina por el método de cuantificación relativa $2^{-\Delta\Delta Ct}$. A) proTRH, B) proCRH, C) ObRb y D) SOCS3. Valores expresados como la media \pm EEM del porcentaje de los valores de C-alimentados. (100%; %; n=5-6/grupo). $^{\circ}P < 0.05$ vs C-alimentado; $^+P < 0.05$ vs su respectivo grupo veh; $^*P < 0.05$ vs C-veh; $^{\#}P < 0.05$ vs AFO-veh; $^{\$}P < 0.05$ vs C-leptina, $^{\Upsilon}P < 0.05$ vs AFO-leptina.

6.2 Efecto del estrés prenatal (EP) y de iniciar la disponibilidad de alimentos en fase de luz (AFL) o restringirla a la de oscuridad (AFO) en la etapa prepuberal sobre parámetros endócrinos y moleculares de animales adultos.

6.2.1 Peso corporal, consumo de alimento y peso de las glándulas adrenales y subcompartimentos del tejido adiposo

De acuerdo a lo reportado, el EP promovió el aumento de peso corporal alcanzando 20% más que los animales C (100%) a la semana 5 y el 13% a la semana 10 (Fig. 15). En contraste, el desfase del consumo de alimentos ya sea a la fase de luz o de oscuridad no mostró efectos significativos entre grupos, aunque si se observó un aumento similar en todos los grupos estresados prenatalmente (Fig. 15). El ANOVA de dos vías de medidas repetidas mostró efecto del estrés prenatal ($F_{(2,672)}= 33.69$, $p<0.0001$) y de la edad ($F_{(6,672)}= 165.11$, $p<0.0001$). El consumo de alimento aumentó en los 3 grupos experimentales tratados con estrés prenatal, EP-C, EP-AFL y EP-AFO, al compararlos con el grupo C (100%), llegando a consumir 36, 38 y 28%, respectivamente más alimento que C en la semana 8 (Fig. 16). El ANOVA de dos vías de medidas repetidas mostró efecto del estrés prenatal ($F_{(2,672)}= 33.69$, $p<0.0001$) y de la edad ($F_{(6,672)}= 165.11$, $p<0.0001$). No hubo diferencias entre ningún grupo EP, aunque sí aumentó el peso de las glándulas adrenales y de los subcompartimentos del tejido adiposo epididimal, mesentérico y perirenal retroperitoneal en animales EP-C (adrenales: 17%, TAB epididimal: 20%, mesentérico: 123% y perirenal: 47%), EP-AFL (adrenales: 16%, TAB epididimal: 25%, mesentérico: 108% y perirenal: 67%) y EP-AFO (adrenales: 16%, TAB epididimal: 28%, mesentérico: 93% y perirenal: 84%) al compararlos con el grupo C (100%) (Tabla 4; glándulas adrenales: $F_{(3,52)}= 3.065$, $P<0.05$; epididimal: $F_{(3,23)}= 6.288$, $P<0.01$; mesentérico: $F_{(3,20)}= 101.286$, $P<0.01$; perirenal retroperitoneal: $F_{(3,23)}= 16.72$, $P<0.01$).

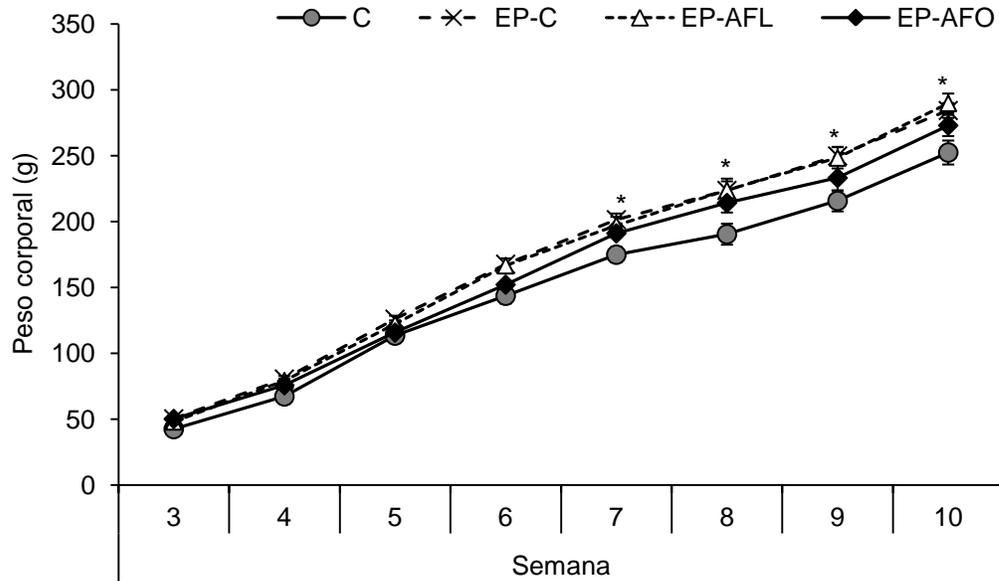


Fig. 15. Reporte semanal del peso corporal de animales C, EP-C, EP-AFL y EP-AFO. Datos expresados como la media \pm error estándar de la media (EEM) en gramos (n=12-13/grupo), *P<0.05 vs C.

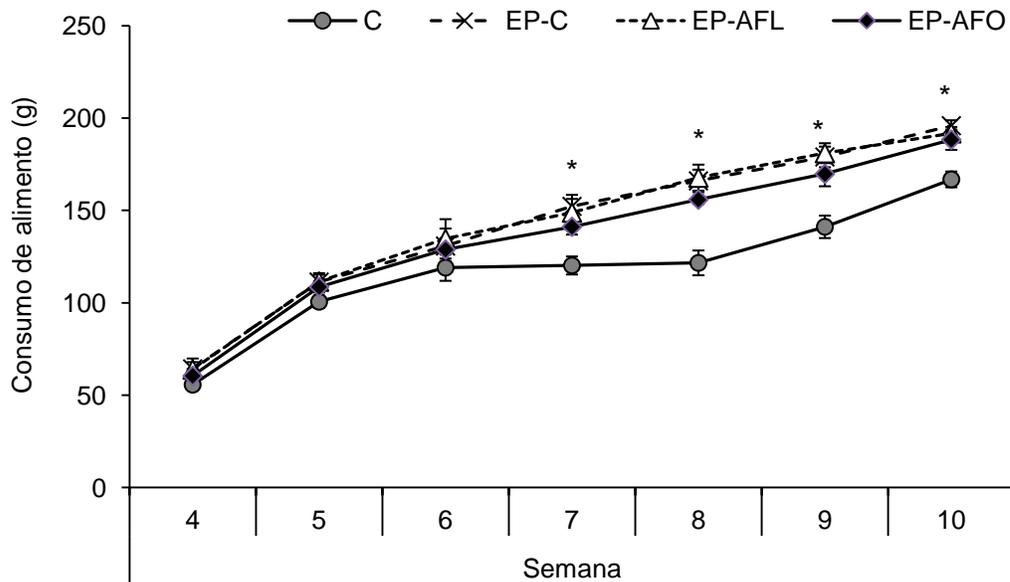


Fig. 16. Reporte semanal del consumo de alimento de animales C, EP-C, EP-AFL y EP-AFO. Datos expresados como la media \pm error estándar de la media (EEM) en gramos (n=12-13/grupo), *P<0.05 vs C.

Tabla 4. Peso de las glándulas adrenales y de los subcompartimentos del tejido adiposo en grupo EP y programas de alimentación diferentes.

	C	EP-C	EP-AFL	EP-AFO
Glándulas adrenales (g)	0.04 ± 0.003	0.05 ± 0.001 *	0.05 ± 0.002 *	0.05 ± 0.001 *
Tejido adiposo pardo (g)	0.27 ± 0.02	0.26 ± 0.04	0.23 ± 0.02	0.26 ± 0.02
TAB subcutáneo (g)	1.8 ± 0.2	1.9 ± 0.2	2.2 ± 0.2	2.1 ± 0.3
TAB epididimal (g)	3.3 ± 0.3	4 ± 0.1 *	4.1 ± 0.1 *	4.2 ± 0.2 *
TAB mesentérico (g)	2 ± 0.1	4.5 ± 0.2 *	4.3 ± 0.1 *	3.9 ± 0.1 *
TAB perirenal retroperitoneal (g)	2.4 ± 0.3	3.5 ± 0.2 *	3.9 ± 0.1 *	4.3 ± 0.1 *

Peso de las glándulas adrenales y de los subcompartimentos del tejido adiposo de animales adultos C, EP-C, EP-AFL y EP-AFO. TAB: tejido adiposo blanco. Datos expresados como la media ± EEM en gramos (glándulas adrenales, tejido adiposo pardo y TAB subcutáneo: n=11-13/grupo; TAB mesentérico, epididimal y perirenal retroperitoneal: n=6/grupo), * P<0.05 vs C.

6.2.2 Concentración sérica de hormonas

La concentración de insulina aumentó 33% en animales EP-C, EP-AFL y EP-AFO al compararla con el grupo C (100%; $F_{(3,32)} = 7.577$, $P < 0.001$) (Tabla 5). La concentración de leptina incrementó de 3, 3.4 y 2.9 veces en animales EP-C, EP-AFL y EP-AFO, respectivamente vs. C (100%; $F_{(3,33)} = 24.173$, $P < 0.001$) (Tabla 5). La concentración de T_4 no cambió entre ningún grupo ($F_{(3,40)} = 1.479$, $P > 0.05$) y la de T_3 aumentó a 111% en EP-C, a 118% en EP-AFL y a 111% en EP-AFO en comparación a los animales C (100%; $F_{(3,39)} = 3.637$) (Tabla 5). El contenido de corticosterona aumentó en animales EP-AFL y EP-AFO llegando al 184 y 197% vs. el de animales C (100%; $F_{(3,20)} = 3.493$, $P < 0.05$) (Tabla 5).

Tabla 5. Contenido sérico de hormonas de animales adultos sometidos a estrés prenatal y programas de alimentación diferentes en la etapa prepuberal

	C	EP-C	EP-AFL	EP-AFO
T ₄ (µg/dl)	11.9 ± 0.8	12.5 ± 0.8	13.8 ± 1	14.3 ± 0.8
T ₃ (ng/dl)	100.6 ± 5.5	111.7 ± 3.9	118.6 ± 3.3 *	115.5 ± 3.5
Insulina (ng/ml)	0.6 ± 0.05	0.8 ± 0.04 *	0.8 ± 0.03 *	0.8 ± 0.04 *
Corticosterona (ng/ml)	248.3 ± 71.4	212.4 ± 52.5	457.4 ± 82.9 *	488.9 ± 92.6 *
Leptina (pg/ml)	1273.7 ± 124.3	2859.7 ± 111.4 *	3244.7 ± 380.7 *	2866.7 ± 110.2 *

La determinación de hormonas fue realizada en el suero de animales C, EP-C, EP-AFL y EP-AFO de 10 semanas de edad (n=6-10/grupo). Datos expresados como la media ± EEM, *P<0.05 vs C.

6.2.3 Expresión del RNAm de proTRH y proCRH en el NPV por HIS

La expresión del RNAm de proTRH de neuronas no hipofisiotrópicas e hipofisiotrópicas de los subcompartimentos anterior, medial y caudal del NPV fue similar entre grupos con EP y a la del grupo C (Fig. 17A-J; aNPV: $F_{(3,41)} = 0.958$, $P > 0.05$; mNPV: $F_{(3,13)} = 0.366$, $P > 0.05$; cNPV: $F_{(3,12)} = 0.132$, $P > 0.05$). La expresión del RNAm de proCRH aumentó 152 y 154 % en los grupos EP-AFL y EP-AFO, y en EP-C se mantuvo similar (109%) al compararlos con la expresión de animales C (100%); en cambio aumentó en EP-AFL y EP-AFO vs EP-C (Fig. 18A-D; $F_{(3,22)} = 3.55$, $P < 0.05$).

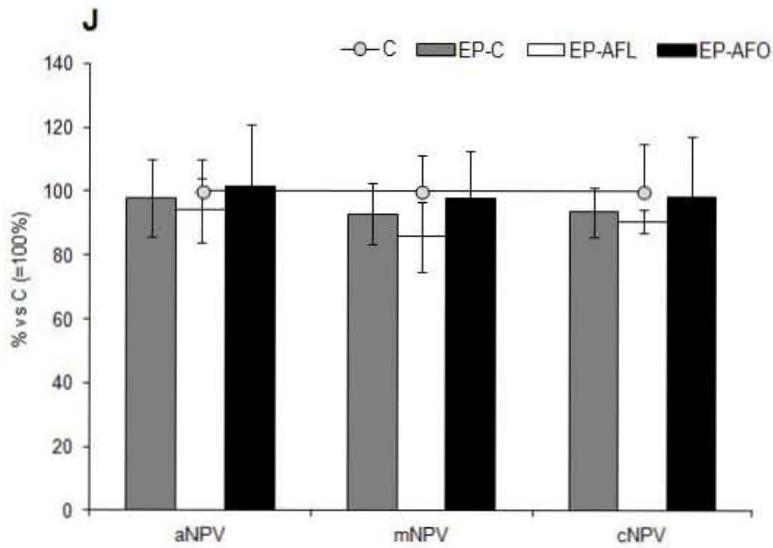
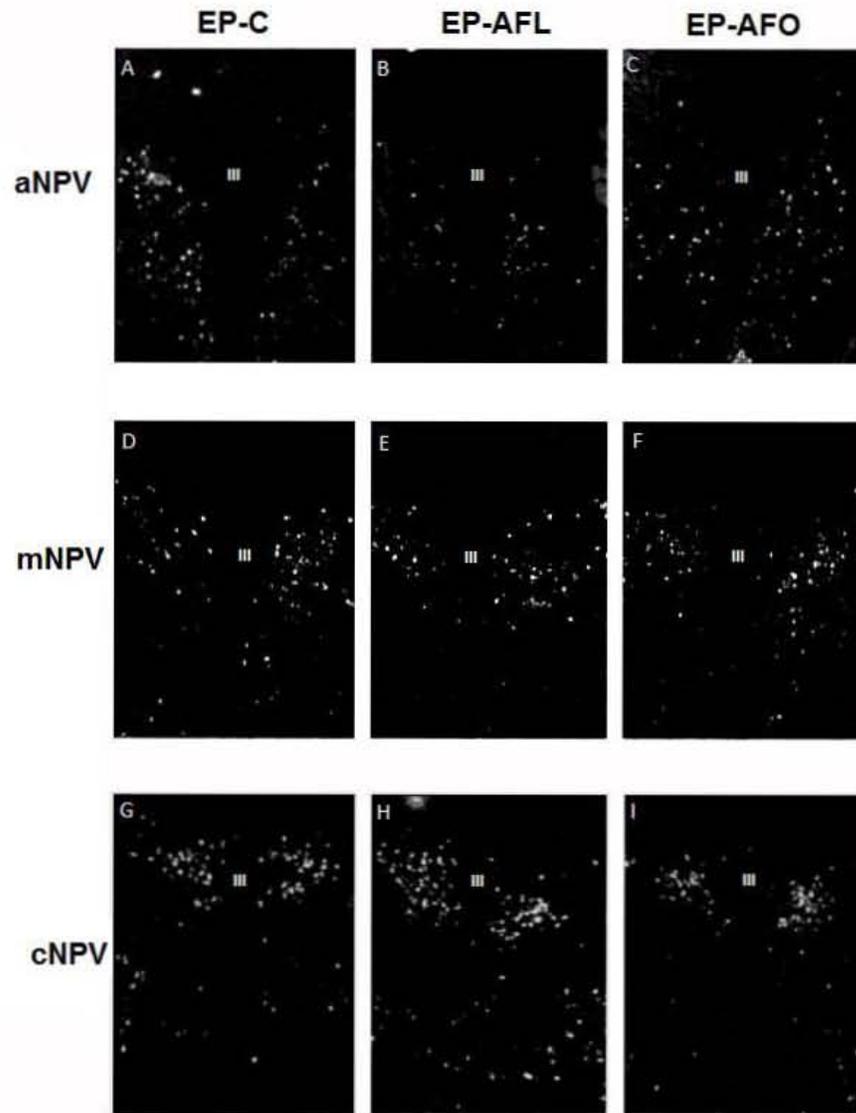


Fig. 17. Expresión de proTRH en subcompartimentos del NPV de grupos con EP y programas de alimentación diferentes. (A-I) Fotomicrografías con iluminación en campo oscuro y magnificación 10X de muestras representativas de la expresión del RNAm de proTRH analizado por HIS y marcado radioactivamente con ^{35}S en el aNPV de animales EP-C (A), EP-AFL (B) y EP-AFO (C), en el mNPV de EP-C (D), EP-AFL (E) y EP-AFO (F), y en el cNPV de EP-C (G), EP-AFL (H) y EP-AFO (I). III: tercer ventrículo. Barra de escala 50 μm . (J) Expresión de proTRH en los subcompartimentos del NPV de animales C, EP-C, EP-AFL y EP-AFO, la línea sobre las barras corresponde al valor del porcentaje del IOD de animales C (100%). Datos expresados como la media \pm EEM del porcentaje de valores de C (100%; n=4/grupo).

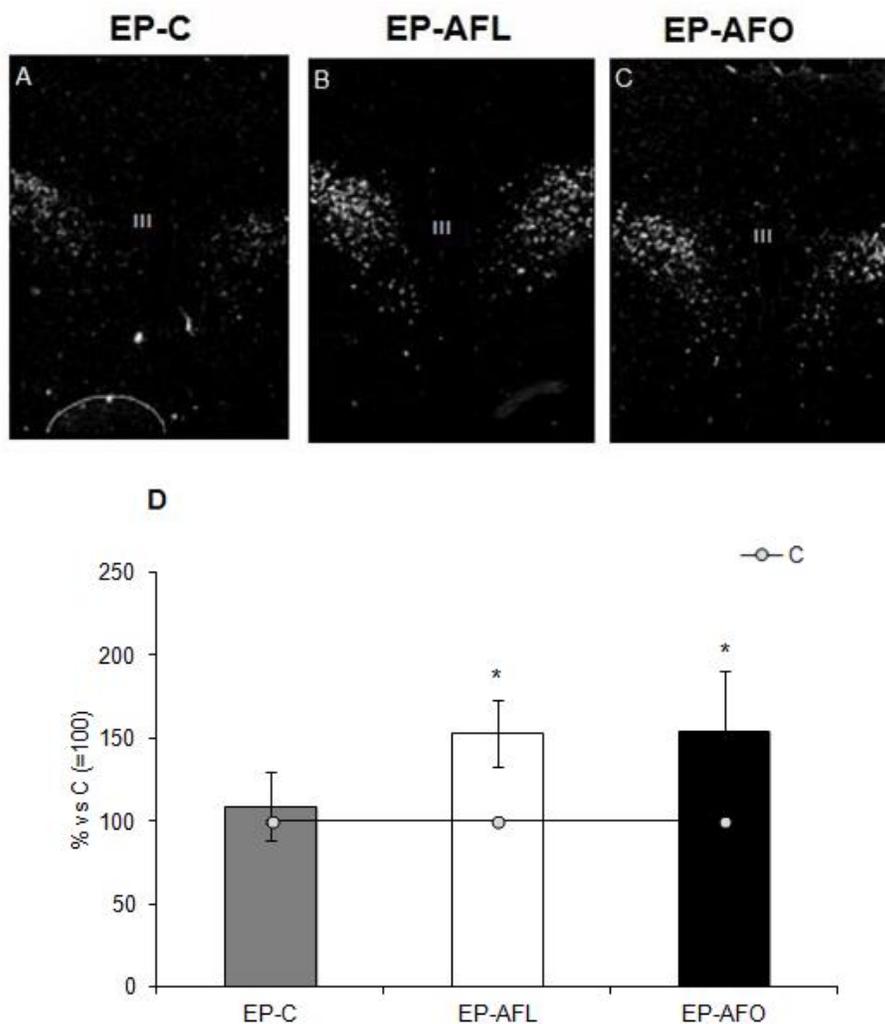


Fig. 18. Expresión de proCRH en el NPV de grupos con EP y programas de alimentación diferentes. (A-C) Fotomicrografías con iluminación en campo oscuro y magnificación 10X de muestras representativas de la expresión del RNAm de proCRH analizado por HIS y marcado radioactivamente con ^{35}S en el NPV de animales EP-C (A), EP-AFL (B) y EP-AFO (C). III: tercer

ventrículo. Barra de escala 50 μm . (D) Expresión de proCRH en el NPV de animales EP-C, EP-AFL y EP-AFO, la línea sobre las barras corresponde al valor del porcentaje del IOD de animales C (100%). Datos expresados como la media \pm EEM del porcentaje de valores de C (100%; n=4-5/grupo). * $P < 0.05$ vs C.

VII. Discusión

La edad prepuberal es una ventana crítica de desarrollo, susceptible a fluctuaciones en los niveles séricos de hormonas, modificando la respuesta de diferentes redes hipotalámicas a un balance energético positivo, como consecuencia de alteraciones en los patrones de alimentación o hábitos alimentarios. Dichas alteraciones llevan a cambios en la actividad de señales que regulan la alimentación y pueden en consecuencia provocar el desarrollo de hiperfagia y sobrepeso prevaleciendo hasta la adultez.

Los hábitos alimentarios en etapas tempranas de la vida pueden condicionar la regulación de la homeostasis energética de los animales cuando éstos llegan a la edad adulta. En este estudio utilizamos un modelo de alimentación en el cual se limita el inicio del consumo de alimentos a la fase de oscuridad (AFO) o a la fase de luz (AFL); dicho modelo de alimentación asemeja el inicio prematuro de la primera comida del día (desayunar en la oscuridad) y mayor tiempo de la disponibilidad de los alimentos en el día (AFL) o el inicio tardío (desayunar 2 h después del amanecer) con menor tiempo de la disponibilidad de alimentos diarios (AFO), con el fin de dilucidar si es posible que al modificar los hábitos alimentarios de animales jóvenes se pueda alterar la expresión de péptidos hipotalámicos, el contenido hormonas que regulan la homeostasis energética y la actividad de los ejes tiroideo y adrenal cuando éstos llegan a la edad adulta.

De la misma manera, el ambiente intrauterino juega un papel importante no sólo en el desarrollo fetal, sino también en el desarrollo de los individuos en la etapa post-natal temprana, en la infancia y en la etapa adulta; por lo que cualquier condición adversa a la que se enfrente una mujer gestante puede aumentar la

susceptibilidad en su descendencia de desarrollar padecimientos metabólicos incluyendo la obesidad y el síndrome metabólico. Sin embargo, un solo factor puede no ser suficiente para el desarrollo de la enfermedad, proponiendo a la interacción de varios como las causas del desarrollo de las mismas.

7.1 Desfase del consumo de alimentos.

7.1.1 Efecto de programas de alimentación diferentes sobre parámetros corporales, endócrinos y moleculares de animales adultos.

Cuando a los animales se les limita el consumo de alimento a una ventana de tiempo específica presentan el desarrollo de la conducta FAA, la cual se caracteriza por aumento de la locomoción y se presenta de 2 a 4 h antes de la disponibilidad del alimento (230). Además de la FAA, hay aumento en la concentración sérica de glucocorticoides y de la expresión del RNAm de NPY, lo cual prepara la ingestión y el procesamiento del alimento (86,231). Después del consumo, se presenta una estimulación contrarreguladora de señales anorexigénicas que promueven la terminación de la conducta alimentaria. Entre éstas se encuentra el incremento del contenido sérico de insulina y leptina, así como de POMC del ARC. Este cambio en vías anabólicas a catabólicas permite la modulación de la homeostasis energética y en consecuencia del peso corporal.

De esta manera, al desacoplar el momento de la presentación del alimento del ciclo de luz/oscuridad y cambiar la disponibilidad del mismo a la fase de descanso (luz en los roedores), se altera la relación entre el gasto de energía y la ingesta de alimentos. Cuando los animales son sometidos a modelos de restricción de alimentos en un periodo de tiempo específico, ya sea en la fase de luz u oscuridad, el inicio de la FAA y la activación de las vías orexigénicas cambia hacia el momento de la presentación de la comida (86,231,232). Así, la alimentación en la fase de luz induciría la liberación de leptina, insulina y corticosterona a un tiempo circádico inusual, favoreciendo mayor consumo y peso corporal.

La alimentación de animales prepuberales en la fase de oscuridad (AFO), presentó un retraso en el ofrecimiento del alimento en relación al inicio del periodo de oscuridad (alimento disponible a las 23:00 h en lugar de a las 19:00 h) y no mostraron cambios ni en el consumo de alimentos ni en el peso corporal. Esto sugiere que el programa de AFO no modificó la secreción de hormonas ni la expresión de péptidos que regulan la conducta alimentaria, permitiendo la adaptación al programa de alimentación *ad libitum* subsecuente hasta la adultez. Debido a que la alimentación de animales AFO estuvo limitada a la fase de actividad, las vías orexigénicas parecieron alcanzar su pico de actividad diario en un momento del día similar al de animales C alimentados *ad libitum*, lo que se evidenció por el consumo de alimento y peso corporal similar al grupo control.

En contraste, el programa de alimentación en la fase de luz (AFL) propició el desarrollo de sobrepeso e hiperfagia en animales adultos. Su aumento en el consumo de alimento repercutió directamente en su ganancia de peso, específicamente en mayor tejido adiposo visceral. Su hiperfagia y sobrepeso pareció asociarse a la hiperactividad del eje HHA; esto se ha descrito en humanos y animales adultos estresados en etapas tempranas de la vida (233,234). Nuestros resultados implicaron que la alimentación en la fase de luz en la etapa prepuberal actúa como un estresor crónico. La alteración en la regulación del eje HHA se mostró por el incremento de la expresión del RNAm de CRH en el NPV, junto con la alta concentración sérica de corticosterona, que sugirió un bloqueo de la retroalimentación negativa de los GC sobre la expresión de CRH en el NPV.

El incremento en el contenido de GC pudo provocar la hiperfagia de animales AFL, ya que la administración icv. e ip. de DEX promueve la expresión y aumenta el contenido hipotalámico de moléculas orexigénicas como NPY, AgRP y AMPK en el ARC (235-238). La hiperfagia pudo deberse a que antes de la presentación de los alimentos, independientemente del ciclo luz/oscuridad, el contenido de glucocorticoides aumentó y NPY pudo liberarse hacia el NPV (231,239).

La elevación sostenida de la concentración de corticosterona pareció también ser responsable del aumento de los depósitos de TAB visceral de animales AFL (240,241) ya que la administración periférica de DEX activa la expresión de genes lipogénicos en los compartimentos de grasa visceral y la diferenciación de pre-adipocitos a adipocitos (242-244); además, la concentración elevada de glucocorticoides en la saliva está asociada positivamente a la acumulación de grasa visceral característica de la enfermedad de Cushing, (245,246).

El grupo AFO presentó contenido de leptina e insulina similares a animales control, sugiriendo que estas hormonas ejercen sus efectos anorexigénicos de manera normal (40,44). Por el contrario, los animales AFL presentaron contenido elevado de leptina e insulina y tanto humanos como roedores con obesidad presentan resistencia a sus efectos, ya que sus niveles aumentados no son capaces de disminuir el apetito ni de aumentar el gasto energético(247,248). La hiperleptinemia de animales AFL sugirió una alteración en su señalización y un probable desarrollo de resistencia a sus efectos. La alta concentración de corticosterona sérica inducida por la alimentación en la fase de luz pudo reducir la sensibilidad neuronal a los efectos de la leptina en este grupo, ya que los GC estimulan la expresión del RNAm de leptina y su liberación del tejido adiposo, pero a su vez reducen la sensibilidad de las neuronas a la hormona (249-251). Por esta razón se analizó si la vía de señalización de leptina mostraba alteraciones evaluando sus efectos sobre la expresión de los RNAm de NPY en el ARC y de TRH en el NPV, contribuyendo al desarrollo de la hiperfagia de los animales AFL.

Respecto al eje tiroideo, se observó que la AFL indujo disfunción del eje HHT, la concentración de T_4 disminuyó en estos animales, lo que pareció impedir que T_3 aumentara de acuerdo a lo descrito. Los pacientes con obesidad presentan mayor actividad del eje HHT con altos niveles de T_3 sérica (158), mientras que roedores obesos muestran mayor expresión del RNAm de TRH en el NPV y contenido de T_3 sérica (178,252); cambios que promueven mayor gasto de energía. En contraste, nuestros resultados mostraron que la alimentación en la fase de luz en la etapa

prepuberal no incrementó la función del eje HHT. La actividad de las desyodasas 1 y 2 (que transforman T_4 en T_3 y T_3 reversa (rT_3)) pudo estar involucrada en los niveles normales de T_3 y bajos de T_4 , ya que los animales obesos que consumen una dieta HFD presentan mayor actividad de la desyodasa D1 en la glándula tiroides, en el hígado y en el riñón, mientras que la actividad de la D2 disminuye en la adenohipófisis y en el tejido adiposo pardo, aumentando la concentración de rT_3 (253). Es probable que en el grupo AFL hubiera cambio en la actividad de estas enzimas, pero es necesario hacer estudios futuros encaminados a su análisis y de la concentración de rT_3 .

Además de las alteraciones en hormonas tiroideas, los niveles del RNAm de TRH disminuyeron en neuronas hipofisiotrópicas de mNPV y cNPV en las ratas AFL. Esta disminución se presentó a pesar de su sobrepeso e hiperleptinemia, los cuales deberían promover la transcripción de TRH (54). Estos resultados están de acuerdo a lo mostrado en animales sobrealimentados con sobrepeso, los cuales también presentan disminución de la expresión del RNAm de TRH en neuronas hipofisiotrópicas del NPV (254). La falta de adaptación del eje HHT pudo disminuir la tasa metabólica de los animales AFL, promoviendo a su vez el almacenamiento excesivo de energía como tejido adiposo. La disminución en la expresión de TRH hipofisiotrópico pudo ser el resultado de los elevados niveles de GC, los cuales reprimen la transcripción del péptido a través del elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE) en el promotor del gen de TRH (170,171), aunque estudios adicionales son necesarios para explorar esta hipótesis.

Debido a sus ya conocidas acciones anorexigénicas (164,255), la expresión de TRH sintetizado en neuronas del aNPV (involucrado en la regulación de la conducta alimentaria) debió aumentar en animales AFL; la falta de aumento de TRH evidenció una adaptación aberrante de estas neuronas al aumento en las reservas lipídicas, lo que pudo contribuir al desarrollo de la hiperfagia y sobrepeso de animales AFL.

7.1.2 Efecto de programas de alimentación diferentes sobre la señalización de leptina en el ARC y en el NPV.

Debido a que AFL en etapa prepuberal promovió hiperfagia en los animales adultos a pesar de la hiperleptinemia que presentaron, pudieron haber desarrollado resistencia a la leptina, lo que está respaldado por la inhibición de la expresión de TRH. Para probar nuestra hipótesis, a animales C, AFL y AFO de 10 semanas de edad que fueron ayunados durante 48 h se les administró vehículo o leptina ip., ya que después del ayuno el contenido sérico de leptina disminuye, siendo responsable a su vez de la reducción en la expresión del RNAm de TRH en el NPV y del aumento del RNAm de NPY en el ARC (54,256), la administración de leptina debería de ser capaz de revertir dichos cambios en animales ayunados si su señalización funcionara adecuadamente.

El ayuno indujo la esperada pérdida de peso y de los depósitos de tejido adiposo en todos los grupos, así como la disminución de la expresión de TRH y CRH del NPV y el aumento del RNAm de NPY del ARC y de ObRb y SOCS3 en el ARC y en el NPV (254,257). Es importante notar que los animales ALF-veh tuvieron un mayor incremento en la expresión de NPY y SOCS3 en el ARC que los grupos C-veh y AFO-veh. SOCS3 es una proteína que inhibe la transducción de la señal de leptina, y su incremento crónico es considerado como un indicativo de la resistencia a la leptina (66). Por lo tanto, nuestros resultados apuntan a la alteración en la vía de señalización de la leptina en el ARC debida a la alimentación en la fase de luz en la etapa prepuberal. Confirmamos estos resultados con la administración de leptina a animales AFL adultos que se ayunaron: la expresión de NPY en el ARC no disminuyó y la expresión de TRH en el NPV no incrementó como se esperaba por efecto de la hormona.

La expresión de TRH en el NPV se regula positivamente a través de dos diferentes vías: la vía directa es aquella donde la leptina actúa sobre los receptores ObRb que se expresan en neuronas TRHérgicas y que estimulan la síntesis del péptido; mientras que la indirecta involucra los efectos de la leptina

sobre la síntesis y liberación de NPY y α -MSH desde las neuronas del ARC que las sintetizan, las cuales son aferentes al NPV y modifican la síntesis de TRH. Esto se debe a que la leptina inhibe a NPY y activa a α -MSH lo que afecta positivamente la expresión de TRH (258,259). Estos cambios también se han observado en animales alimentados con HFD y que desarrollan obesidad, los cuales se vuelven resistentes a la leptina en neuronas del ARC (63,64), aunque otras regiones del cerebro se mantengan sensibles a la hormona (64), sugiriendo que la vía indirecta es la más afectada por la obesidad.

La AFL alteró los efectos centrales de la leptina: la expresión de NPY no disminuyó y la de SOCS3 se mantuvo elevada. La señalización de leptina en el NPV pareció funcional ya que la expresión de SOCS3 cambió de manera similar que los grupos C y AFO. Así, la falta de incremento en los niveles de TRH del NPV después de la administración de leptina en animales AFL pareció deberse a la falta de inhibición de la leptina sobre la expresión de NPY en el ARC. Además, esto pudo ser responsable de la hiperfagia y el sobrepeso de animales AFL, así como también de su inadaptación del eje HHT al balance energético positivo. Es probable que la resistencia a la leptina estuviera relacionada con los altos niveles circulantes de corticosterona, como se ha descrito anteriormente (251). Confirmamos la alteración en la señalización de la leptina, así como de la hiperactividad del eje adrenal por los altos niveles del RNAm de CRH en los animales AFL ayunados, como ya se había reportado en animales sobrealimentados y con sobrepeso (254,260).

7.2 Estrés prenatal y desfase del consumo de alimentos

7.2.1 Efecto del estrés prenatal y de programas de alimentación diferentes sobre parámetros corporales, endócrinos y moleculares de animales adultos.

El peso corporal de las crías al nacer se puede ver afectado dependiendo del tipo de estrés al que fueron sometidas las madres. En el modelo de estrés crónico variable, los animales son sometidos a estresores ligeros, los cuales provocan aumento en el peso corporal al nacer (209,261). Aquí confirmamos los hallazgos

reportados con el aumento de peso desde la semana 3 de vida en todos los grupos que fueron sometidos a estrés prenatal, y el cual prevaleció hasta la edad adulta. Otro factor que puede modular el efecto del estrés sobre el peso es el momento en el que se administra el estresor en las madres gestantes; si es administrado en la última semana de gestación, como ocurre en este estudio, los animales muestran aumento de peso al nacer que se mantiene hasta la edad adulta (262).

Similar a lo ocurrido en animales AFL, el aumento de peso corporal en animales EP-C, EP-AFL y EP-AFO estuvo relacionado con su incrementado peso del tejido adiposo visceral; estas alteraciones estuvieron asociadas al incremento en la concentración sérica de corticosterona que, como ya se mencionó anteriormente, promueve el almacenamiento de reservas energéticas en el tejido adiposo, así como el aumento del consumo alimentario por la activación de vías orexigénicas como la de NPY/AgRP del ARC. Contrario a lo que sucede de manera central, la densidad de GR en el tejido adiposo se encuentra aumentada cuando hay exceso de glucocorticoides circulantes (241), lo que afecta el metabolismo de lípidos inhibiendo la movilización de los mismos y favoreciendo su acumulación, ya sea de manera directa al estimular a la lipasa de lipoproteínas, o de manera indirecta al inhibir los efectos lipolíticos de la hormona de crecimiento (263,264). Además, en estudios en roedores y humanos obesos se ha encontrado que el contenido de la enzima 11- β -deshidrogenasa de dihidroxiesteroides, la cual convierte a la cortisona en glucocorticoides activos, se encuentra aumentada en el tejido adiposo visceral y subcutáneo, lo que permite la proliferación y diferenciación de los adipocitos (265), promoviendo de esta manera el aumento en el peso del tejido adiposo. Dichos efectos pudieran estar favoreciendo el aumento en el tejido adiposo blanco de los animales sometidos a estrés prenatal (EP-C, EP-AFL y EP-AFO) y el peso corporal de los mismos, aunque son necesarios nuevos estudios para determinar la implicación de los mismos en las alteraciones presentes en nuestros animales estresados prenatalmente.

De hecho, las crías sometidas a estrés prenatal aumentaron el consumo de alimento, hecho que se ha constatado en animales sometidos a estrés crónico variable, los cuales aumentan el consumo de leche materna desde la primera semana de vida (261). En este estudio se confirmó tanto el aumento de peso corporal, como el del consumo de alimento en animales sometidos a estrés prenatal, lo que reafirma que factores que puedan causar alteraciones en el ambiente intrauterino, afectan el desarrollo de la cría, y estas alteraciones prevalecen hasta la edad adulta. Los animales adultos sometidos a estrés prenatal y con desfase de la alimentación en la etapa prepuberal no tuvieron cambios al compararlos con los animales únicamente con estrés. El estrés también puede desfasar a los sistemas circádicos que regulan la conducta alimentaria (266), y puesto que el mismo estrés es un factor que promueve el aumento en el consumo de alimento y el peso corporal, los efectos que observamos sobre estos parámetros corresponderían predominantemente al estrés prenatal.

El contenido de corticosterona sérica de animales EP-C no cambió con respecto al de animales C; el de EP-AFL y EP-AFO aumentó contra los dos grupos anteriores. La expresión de CRH del NPV en animales con estrés prenatal (EP-C) fue similar al del grupo C, mientras que combinando el estrés con el desfase de alimentos a la fase de luz u oscuridad (EP-AFL y EP-AFO), la expresión de CRH en el NPV se estimuló. Las crías macho de madres estresadas en la gestación, no presentan cambio en la actividad basal del eje HHA (267) ni en el contenido del RNAm de CRH del NPV cuando son adultos (268); esto concuerda con los resultados del grupo EP-C.

La hiperactividad del eje adrenal de animales estresados prenatalmente se observa al ser sometidos a un estresor posterior: la concentración sérica de ACTH y corticosterona aumenta así como la expresión del RNAm de CRH del NPV (269). Los cambios en los horarios de alimentación en EP-AFL y EP-AFO pudieron actuar como estresores modificando la actividad del eje y activando su respuesta, lo que se evidenció por su aumento corticosterona y en la expresión de CRH en el

NPV. La falla en la retroalimentación negativa del eje HHA se podría explicar por los hallazgos que describen la reducción en la expresión hipocampal del RNAm del MR y de GR (270-272) y que puede deberse a hipermetilación del promotor del gen de GR (273) y al aumento en la expresión, contenido y liberación de CRH de la amígdala (268,269,274), quien afecta positivamente la actividad del eje adrenal.

El incremento en el peso de las glándulas adrenales pudo deberse a su hipertrofia, misma que se ha descrito en animales estresados, que a su vez pudo ser causada por la estimulación constante del sistema simpático adrenal, quien envía señales catecolaminérgicas a la glándula, promoviendo la liberación constante de adrenalina y GC (275), estimulando la actividad del eje HHA de manera crónica.

En humanos existe un vínculo entre la ansiedad gestacional, particularmente en el embarazo tardío, con diferencias en el cortisol salival postnatal (276); los niños de madres con mayor contenido de cortisol salival en las mañanas durante el embarazo o madres con miedo a tener un niño con discapacidades, mostraron altos niveles de cortisol en la saliva (277). En pacientes deprimidos (con estrés crónico subyacente), la inmunoreactividad de neuronas que expresan CRH en el NPV está aumentada y presentan hipertrofia de glándulas adrenales y concentraciones basales elevadas de GC (278). Por lo que el eje HHA de animales EP-AFL y EP-AFO pareció responder de manera exagerada por afectaciones en la retroalimentación negativa del mismo.

En la gestación, las madres presentan cambios adaptativos que disminuyen los efectos de los glucocorticoides sobre el feto. Entre estos se encuentran el aumento de progesterona y de su metabolito, la alopregnanolona, en el cerebro materno y quien inhibe al eje HHA en ratas gestantes y previene al feto de sufrir alteraciones causadas por los glucocorticoides (279). La alopregnanolona aumenta la expresión del RNAm del opioide endógeno encefalina y de su receptor (receptor a opioides μ , MOR) en neuronas noradrenérgicas A2 del núcleo del tracto solitario (NTS), que al activarse desinhiben a neuronas GABAérgicas que

proyectan al NPV e inhiben la liberación de noradrenalina de las mismas neuronas del NTS hacia el NPV, disminuyendo la expresión de CRH y por consiguiente la inhibición del eje HHA en ratas gestantes (280). En cambio, las ratas sometidas a estrés gestacional presentan disminución en la enzima que convierte a la progesterona en alopregnanolona en el cerebro y en la placenta, 11- β -deshidrogenasa de dihidroxiesteroides (281), lo que permite el acceso de un exceso de glucocorticoides hacia la cría y aumenta los efectos deletéreos de éstos sobre su desarrollo. Dado que los efectos del estrés prenatal abarcan una gran cantidad de vías y moléculas que regulan el eje HHA y las respuestas al organismo para contrarrestar el estrés, es importante determinar en el futuro si los grupos EP presentan dichos cambios y si están asociados con la hiperactivación del eje adrenal.

Los animales sometidos a estrés prenatal, indistintamente del programa de alimentación, no mostraron cambios en la concentración sérica de T_4 y T_3 ni en la expresión de TRH en ninguno de los subcompartimentos del NPV. Hay controversia acerca de los efectos del estrés en la actividad del eje tiroideo, pero en un modelo de estrés crónico ligero la expresión del RNAm de TRH en el NPV y los niveles séricos de hormonas tiroideas no cambian (282). Dado que los grupos EP-C, EP-AFL y EP-AFO se encuentran en balance energético positivo y humanos obesos y roedores con obesidad inducida por la dieta aumentan la actividad del eje tiroideo, con aumento del RNAm de TRH en el NPV y de la concentración sérica de TSH en ratas macho (178), era de esperar una hiperactivación del eje tiroideo como mecanismo contraregulatorio que activaría el metabolismo y disminuiría su peso corporal; esto aumentaría su expresión de TRH por el aumento en la concentración sérica de leptina, al no observar estos cambios la vía de señalización de la leptina pudo también encontrarse desensibilizada, como en los animales AFL.

Los animales cuyas madres reciben DEX durante la última semana de gestación desarrollan hiperleptinemia e hiperinsulinemia (283), alteraciones que se han

ligado al desarrollo de resistencia a la insulina y leptina y del síndrome metabólico. Aunque EP-AFL y EP-AFO mostraron un incremento en la concentración sérica de leptina, que debió aumentar la síntesis de TRH, también mostraron aumento en la concentración de corticosterona que pudo contrarrestar los efectos de la leptina en la transcripción de TRH (170,171) y evitar la activación del eje tiroideo frente a su balance positivo de energía, llevándolos al aumento de peso corporal. La expresión de TRH del aNPV no cambió su expresión, a pesar de tener un efecto anorexigénico. Debido a que los animales EP-C presentaron el mismo aumento de peso e hiperfagia que los EP-AFL y EP-AFO, pareció que TRH de esta región no estuvo relacionado a estos cambios y sugiere el estudio de la expresión de péptidos de las neuronas de primer orden del ARC, las cuales se alteran en animales con obesidad (178).

VIII. Conclusiones

- Iniciar el consumo de alimentos en la fase de reposo, aún por un período corto en la prepubertad, lleva al desarrollo de hiperfagia y sobrepeso en los adultos.
- El funcionamiento de los ejes adrenal y tiroideo tanto a nivel hipotalámico como periférico se altera por este cambio y puede asociarse a la hiperfagia y acumulación de tejido visceral observado.
- Se desarrolla una resistencia a la señalización de la leptina en el ARC por este cambio que también pudo asociarse a la hiperfagia y sobrepeso observados.
- El estrés prenatal también causa hiperfagia y sobrepeso en animales adultos. El sobrepeso y la hiperfagia desarrolladas por la exposición a estrés prenatal sugieren resistencia a la insulina y leptina.
- El inicio del consumo de alimentos en la fase de luz u oscuridad induce hiperactivación el eje adrenal de animales sometidos a estrés prenatal.
- Estos resultados son un acercamiento importante para comprender los efectos y alcances de los hábitos alimentarios y los patrones de alimentación en la infancia y sus consecuencias en la salud de individuos

adultos; además apoyan que los hábitos alimentarios en la fase de actividad en la infancia aseguran una programación y función adecuada de la función de los ejes neuroendócrinos y de la regulación de la conducta alimentaria, lo que urge a generar terapias preventivas con la finalidad de evitar el desarrollo de enfermedades metabólicas en la vida adulta.

IX. Perspectivas

- Estudiar la motivación por el consumo de alimentos palatables en animales AFL y con EP.
- Analizar la vía de señalización de la insulina y su implicación en la hiperfagia de animales AFL.
- Determinar si la vía de AMPK puede estar implicada en la hiperfagia de animales AFL y en cambios en la expresión de genes reloj (cry) en el hipotálamo de animales AFL.
- Analizar y comparar la expresión de genes reloj en el hipotálamo y en el hígado entre animales AFL y con EP.

X. Referencias bibliográficas

1. Morton GJ, Meek TH, Schwartz MW. Neurobiology of food intake in health and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 2014;15(6):367-378.
2. Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 2006;443(7109):289-295.
3. Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature* 2000;404(6778):661-71.
4. Volkow N, Wang G, Fowler J, Telang F. Overlapping neuronal circuits in addiction and obesity: evidence of systems pathology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2008;363(1507):3191-3200.
5. Berthoud HR. Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neurosci Biobehav Rev* 2002;26(4):393-428.
6. Williams G, Bing C, Cai XJ, Harrold JA, King PJ, Liu XH. The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. *Physiol Behav* 2001;74(4-5):683-701.
7. Hillebrand JJ, de Wied D, Adan RA. Neuropeptides, food intake and body weight regulation: a hypothalamic focus. *Peptides* 2002;23(12):2283-306.
8. Leibowitz SF, Wortley KE. Hypothalamic control of energy balance: different peptides, different functions. *Peptides* 2004;25(3):473-504.
9. Cell Biology Promotion. 2017.
10. Broberger C, Johansen J, Johansson C, Schalling M, Hokfelt T. The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(25):15043-8.

11. Hahn TM, Breininger JF, Baskin DG, Schwartz MW. Coexpression of Agrp and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat Neurosci* 1998;1(4):271-2.
12. Elias CF, Lee C, Kelly J, Aschkenasi C, Ahima RS, Couceyro PR, Kuhar MJ, Saper CB, Elmquist JK. Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron* 1998;21(6):1375-85.
13. Kristensen P, Judge ME, Thim L, Ribel U, Christjansen KN, Wulff BS, Clausen JT, Jensen PB, Madsen OD, Vrang N. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 1998;393(6680):72-6.
14. Joseph-Bravo P. Hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone neurons as transducers of energy homeostasis. *Endocrinology* 2004;145(11):4813-5.
15. Sawchenko PE, Swanson LW. The organization of forebrain afferents to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *J Comp Neurol* 1983;218(2):121-44.
16. Smith PM, Ferguson AV. Neurophysiology of hunger and satiety. *Dev Disabil Res Rev* 2008;14(2):96-104.
17. Gottfried JA, O'Doherty J, Dolan RJ. Encoding predictive reward value in human amygdala and orbitofrontal cortex. *Science* 2003;301(5636):1104-7.
18. Kow L, Pfaff D. The effects of the TRH metabolite cyclo(His-Pro) and its analogs on feeding. *Pharmacol Biochem Behav* 1991;38(2):359-364.
19. Arase K, York D, Shimizu H, Shargill N, Bray G. Effects of corticotropin-releasing factor on food intake and brown adipose tissue thermogenesis in rats. *Am J Physiol* 1988;255(3 Pt 1):E255-E259.
20. Marsh DJ, Weingarh DT, Novi DE, Chen HY, Trumbauer ME, Chen AS, Guan XM, Jiang MM, Feng Y, Camacho RE. Melanin-concentrating hormone 1 receptor-deficient mice are lean, hyperactive, and hyperphagic and have altered metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 2002;99(5):3240-3245.
21. de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 1998;95(1):322-327.
22. Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 1998;92(4):573-585.
23. Couceyro PR, Koyle EO, Kuhar MJ. Further studies on the anatomical distribution of CART by in situ hybridization. *J. Chem. Neuroanat.* 1997;12(4):229-241.
24. Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, Vale WW. Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroendocrinology* 1983;36(3):165-186.
25. Elias CF, Saper CB, Maratos-Flier E, Tritos NA, Lee C, Kelly J, Tatro JB, Hoffman GE, Ollmann MM, Barsh GS. Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *J. Comp Neurol.* 1998;402(4):442-459.
26. Kalra SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Horvath TL, Kalra PS. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr. Rev* 1999;20(1):68-100.
27. Watts AG, Sanchez-Watts G, Kelly AB. Distinct patterns of neuropeptide gene expression in the lateral hypothalamic area and arcuate nucleus are associated with dehydration-induced anorexia. *J Neurosci* 1999;19(14):6111-21.
28. Baquero AF, de Solis AJ, Lindsley SR, Kirigiti MA, Smith MS, Cowley MA, Zeltser LM, Grove KL. Developmental switch of leptin signaling in arcuate nucleus neurons. *J Neurosci.* 2014;34(30):9982-9994.
29. Bouret SG, Draper SJ, Simerly RB. Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behavior in mice. *J Neurosci.* 2004;24(11):2797-2805.
30. Mistry AM, Swick A, Romsos DR. Leptin alters metabolic rates before acquisition of its anorectic effect in developing neonatal mice. *Am J Physiol* 1999;277(3 Pt 2):R742-R747.
31. Legradi G, Lechan RM. The arcuate nucleus is the major source for neuropeptide Y-innervation of thyrotropin-releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 1998;139(7):3262-3270.

32. Wynne K, Stanley S, McGowan B, Bloom S. Appetite control. *J Endocrinol* 2005;184(2):291-318.
33. Bailer UF, Kaye WH. A review of neuropeptide and neuroendocrine dysregulation in anorexia and bulimia nervosa. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2003;2(1):53-9.
34. Chaudhri O, Small C, Bloom S. Gastrointestinal hormones regulating appetite. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006;361(1471):1187-209.
35. Williams DL, Cummings DE. Regulation of ghrelin in physiologic and pathophysiologic states. *J Nutr* 2005;135(5):1320-5.
36. Bagdade J, Bierman E, Porte DJ. The significance of basal insulin levels in the evaluation of the insulin response to glucose in diabetic and nondiabetic subjects. *J Clin Invest* 1967;46(10):1549-1557.
37. Considine R, Sinha M, Heiman M, Kriauciunas A, Stephens T, Nyce M, Ohannesian J, Marco C, McKee L, Bauer T. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 1996;334(5):292-295.
38. Joshi SR, Parikh RM, Das AK. Insulin--history, biochemistry, physiology and pharmacology. *J Assoc. Physicians India* 2007;55 Suppl(19-25).
39. Ghasemi R, Haeri A, Dargahi L, Mohamed Z, Ahmadiani A. Insulin in the brain: sources, localization and functions. *Mol. Neurobiol.* 2013;47(1):145-171.
40. Gerozissis K. Brain insulin and feeding: a bi-directional communication. *Eur. J Pharmacol.* 2004;490(1-3):59-70.
41. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994;372(6505):425-432.
42. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat. Med.* 1995;1(11):1155-1161.
43. Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 1995;269(5223):540-543.
44. Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, Flier JS. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 1996;382(6588):250-252.
45. Chehab FF. A broader role for leptin. *Nat. Med.* 1996;2(7):723-724.
46. Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* 1998;394(6696):897-901.
47. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 1998;395(6704):763-770.
48. Elmquist JK, Bjorbaek C, Ahima RS, Flier JS, Saper CB. Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J. Comp Neurol.* 1998;395(4):535-547.
49. Bates SH, Myers MG, Jr. The role of leptin receptor signaling in feeding and neuroendocrine function. *Trends Endocrinol Metab* 2003;14(10):447-452.
50. Fei H, Okano HJ, Li C, Lee GH, Zhao C, Darnell R, Friedman JM. Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 1997;94(13):7001-7005.
51. Kloeck C, Haq AK, Dunn SL, Lavery HJ, Banks AS, Myers MG, Jr. Regulation of Jak kinases by intracellular leptin receptor sequences. *J Biol. Chem.* 2002;277(44):41547-41555.
52. Couturier C, Jockers R. Activation of the leptin receptor by a ligand-induced conformational change of constitutive receptor dimers. *J Biol. Chem.* 2003;278(29):26604-26611.
53. White DW, Kuropatwinski KK, Devos R, Baumann H, Tartaglia LA. Leptin receptor (OB-R) signaling. Cytoplasmic domain mutational analysis and evidence for receptor homo-oligomerization. *J Biol. Chem.* 1997;272(7):4065-4071.
54. Legradi G, Emerson CH, Ahima RS, Flier JS, Lechan RM. Leptin prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 1997;138(6):2569-2576.
55. Perello M, Stuart RC, Nillni EA. The role of intracerebroventricular administration of leptin in the stimulation of prothyrotropin releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 2006;147(7):3296-3306.

56. Uehara Y, Shimizu H, Ohtani K, Sato N, Mori M. Hypothalamic corticotropin-releasing hormone is a mediator of the anorexigenic effect of leptin. *Diabetes* 1998;47(6):890-893.
57. Stephens TW, Basinski M, Bristow PK, Bue-Valleskey JM, Burgett SG, Craft L, Hale J, Hoffmann J, Hsiung HM, Kriauciunas A. The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature* 1995;377(6549):530-532.
58. Schwartz MW, Baskin DG, Bukowski TR, Kuijper JL, Foster D, Lasser G, Prunkard DE, Porte D, Jr., Woods SC, Seeley RJ. Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in ob/ob mice. *Diabetes* 1996;45(4):531-535.
59. Schwartz MW, Seeley RJ, Woods SC, Weigle DS, Campfield LA, Burn P, Baskin DG. Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes* 1997;46(12):2119-2123.
60. Elias CF, Aschkenasi C, Lee C, Kelly J, Ahima RS, Bjorbaek C, Flier JS, Saper CB, Elmquist JK. Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron* 1999;23(4):775-786.
61. Thornton JE, Cheung CC, Clifton DK, Steiner RA. Regulation of hypothalamic proopiomelanocortin mRNA by leptin in ob/ob mice. *Endocrinology* 1997;138(11):5063-5066.
62. Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdan MG, Diano S, Horvath TL, Cone RD, Low MJ. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 2001;411(6836):480-484.
63. Enriori PJ, Evans AE, Sinnayah P, Jobst EE, Tonelli-Lemos L, Billes SK, Glavas MM, Grayson BE, Perello M, Nillni EA. Diet-induced obesity causes severe but reversible leptin resistance in arcuate melanocortin neurons. *Cell Metab* 2007;5(3):181-194.
64. Munzberg H, Flier JS, Bjorbaek C. Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice. *Endocrinology* 2004;145(11):4880-4889.
65. Reed AS, Unger EK, Olofsson LE, Piper ML, Myers MG, Jr., Xu AW. Functional role of suppressor of cytokine signaling 3 upregulation in hypothalamic leptin resistance and long-term energy homeostasis. *Diabetes* 2010;59(4):894-906.
66. Bjorbaek C, Elmquist JK, Frantz JD, Shoelson SE, Flier JS. Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Mol. Cell* 1998;1(4):619-625.
67. Zhou Y, Rui L. Leptin signaling and leptin resistance. *Front Med.* 2013;7(2):207-222.
68. Panda S, ogenesch J, Kay S. Circadian rhythms from flies to human. *Nature* 2002;417(329-335).
69. Reppert S, Weaver D. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 2002;418(935-941).
70. Guilding C, Piggins HD. Challenging the omnipotence of the suprachiasmatic timekeeper: are circadian oscillators present throughout the mammalian brain? *Eur. J Neurosci.* 2007;25(11):3195-3216.
71. Kalsbeek A, Perreau-Lenz S, Buijs RM. A network of (autonomic) clock outputs. *Chronobiol. Int.* 2006;23(3):521-535.
72. Meyer-Bernstein EL, Jetton AE, Matsumoto SI, Markuns JF, Lehman MN, Bittman EL. Effects of suprachiasmatic transplants on circadian rhythms of neuroendocrine function in golden hamsters. *Endocrinology* 1999;140(1):207-218.
73. Damiola F, Le MN, Preitner N, Kornmann B, Fleury-Olela F, Schibler U. Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev.* 2000;14(23):2950-2961.
74. Balsalobre A, Brown SA, Marcacci L, Tronche F, Kellendonk C, Reichardt HM, Schutz G, Schibler U. Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science* 2000;289(5488):2344-2347.
75. Davidson AJ, Stokkan KA, Yamazaki S, Menaker M. Food-anticipatory activity and liver per1-luc activity in diabetic transgenic rats. *Physiol Behav.* 2002;76(1):21-26.
76. Albrecht U. Timing to perfection: the biology of central and peripheral circadian clocks. *Neuron* 2012;74(2):246-260.
77. Ebling FJ. The role of glutamate in the photic regulation of the suprachiasmatic nucleus. *Prog. Neurobiol.* 1996;50(2-3):109-132.

78. Moore RY. Neural control of the pineal gland. *Behav. Brain Res.* 1996;73(1-2):125-130.
79. Pevet P. Melatonin: from seasonal to circadian signal. *J Neuroendocrinol.* 2003;15(4):422-426.
80. Uz T, Akhisaroglu M, Ahmed R, Manev H. The pineal gland is critical for circadian Period1 expression in the striatum and for circadian cocaine sensitization in mice. *Neuropsychopharmacology* 2003;28(12):2117-2123.
81. Khaldy H, Leon J, Escames G, Bikjdaouene L, Garcia JJ, Acuna-Castroviejo D. Circadian rhythms of dopamine and dihydroxyphenyl acetic acid in the mouse striatum: effects of pinealectomy and of melatonin treatment. *Neuroendocrinology* 2002;75(3):201-208.
82. Aydin M, Canpolat S, Kuloglu T, Yasar A, Colakoglu N, Kelestimur H. Effects of pinealectomy and exogenous melatonin on ghrelin and peptide YY in gastrointestinal system and neuropeptide Y in hypothalamic arcuate nucleus: immunohistochemical studies in male rats. *Regul. Pept.* 2008;146(1-3):197-203.
83. Peschke E, Bahr I, Muhlbauer E. Melatonin and pancreatic islets: interrelationships between melatonin, insulin and glucagon. *Int. J. Mol. Sci.* 2013;14(4):6981-7015.
84. Adamczyk-Sowa M, Sowa P, Zwirska-Korczała K, Pierzchała K. Labeled [(3)H]-thymidine incorporation in the DNA of 3T3-L1 preadipocytes due to MT(2)- and not MT(3)- melatonin receptor. *J Physiol Pharmacol.* 2014;65(1):135-143.
85. Challet E. Keeping circadian time with hormones. *Diabetes Obes. Metab* 2015;17 Suppl 1(76-83).
86. Stephan FK. The "other" circadian system: food as a Zeitgeber. *J Biol. Rhythms* 2002;17(4):284-292.
87. Mistlberger RE. Food-anticipatory circadian rhythms: concepts and methods. *Eur. J Neurosci.* 2009;30(9):1718-1729.
88. Feillet CA, Albrecht U, Challet E. "Feeding time" for the brain: a matter of clocks. *J Physiol Paris* 2006;100(5-6):252-260.
89. Verwey M, Amir S. Food-entrainable circadian oscillators in the brain. *Eur. J Neurosci.* 2009;30(9):1650-1657.
90. Dibner C, Schibler U, Albrecht U. The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annu. Rev. Physiol* 2010;72(517-549).
91. Mieda M, Williams SC, Richardson JA, Tanaka K, Yanagisawa M. The dorsomedial hypothalamic nucleus as a putative food-entrainable circadian pacemaker. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 2006;103(32):12150-12155.
92. Mendoza J, Pevet P, Felder-Schmittbuhl MP, Bailly Y, Challet E. The cerebellum harbors a circadian oscillator involved in food anticipation. *J Neurosci.* 2010;30(5):1894-1904.
93. Stokkan KA, Yamazaki S, Tei H, Sakaki Y, Menaker M. Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science* 2001;291(5503):490-493.
94. Bodosi B, Gardi J, Hajdu I, Szentirmai E, Obal F, Jr., Krueger JM. Rhythms of ghrelin, leptin, and sleep in rats: effects of the normal diurnal cycle, restricted feeding, and sleep deprivation. *Am J Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* 2004;287(5):R1071-R1079.
95. Patton DF, Mistlberger RE. Circadian adaptations to meal timing: neuroendocrine mechanisms. *Front Neurosci.* 2013;7(185-194).
96. Kalsbeek A, la FS, Fliers E. Circadian control of glucose metabolism. *Mol. Metab* 2014;3(4):372-383.
97. Sukumaran S, Xue B, Jusko WJ, DuBois DC, Almon RR. Circadian variations in gene expression in rat abdominal adipose tissue and relationship to physiology. *Physiol Genomics* 2010;42A(2):141-152.
98. Krieger DT, Hauser H, Krey LC. Suprachiasmatic nuclear lesions do not abolish food-shifted circadian adrenal and temperature rhythmicity. *Science* 1977;197(4301):398-399.
99. Buijs RM, La Fleur SE, Wortel J, Van HC, Zuiddam L, Mettenleiter TC, Kalsbeek A, Nagai K, Nijima A. The suprachiasmatic nucleus balances sympathetic and parasympathetic output to peripheral organs through separate preautonomic neurons. *J Comp Neurol.* 2003;464(1):36-48.
100. Buijs RM, Wortel J, Van Heerikhuizen JJ, Feenstra MG, Ter Horst GJ, Romijn HJ, Kalsbeek A. Anatomical and functional demonstration of a multisynaptic suprachiasmatic nucleus adrenal (cortex) pathway. *Eur. J Neurosci.* 1999;11(5):1535-1544.

101. Ishida A, Mutoh T, Ueyama T, Bando H, Masubuchi S, Nakahara D, Tsujimoto G, Okamura H. Light activates the adrenal gland: timing of gene expression and glucocorticoid release. *Cell Metab* 2005;2(5):297-307.
102. Jasper MS, Engeland WC. Splanchnic neural activity modulates ultradian and circadian rhythms in adrenocortical secretion in awake rats. *Neuroendocrinology* 1994;59(2):97-109.
103. Ando H, Yanagihara H, Hayashi Y, Obi Y, Tsuruoka S, Takamura T, Kaneko S, Fujimura A. Rhythmic messenger ribonucleic acid expression of clock genes and adipocytokines in mouse visceral adipose tissue. *Endocrinology* 2005;146(5631-5636).
104. De Boer S, Van der Gugten J. Daily variations in plasma noradrenaline, adrenaline and corticosterone concentration in rats. *Physiol Behav* 1987;40(323-328).
105. Ahima R, Prabakaran D, Flier J. Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. Implications for energy homeostasis and neuroendocrine function. *J Clin Invest* 1998;101(1020-1027).
106. de Gortari P, González-Alzati M, Cisneros M, Joseph-Bravo P. Effect of Fasting on the Content of Thyrotropin-releasing Hormone and its mRNA in the Central Nervous System and Pyroglutamyl Peptidase II Activity in the Anterior Pituitary of Post-Weaned and Adult Rats. *Nutritional Neuroscience* 2000;3(255-265).
107. Kok P, Roelfsema F, Langendonk JG, Frolich M, Burggraaf J, Meinders AE, Pijl H. High circulating thyrotropin levels in obese women are reduced after body weight loss induced by caloric restriction. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 2005;90(8):4659-4663.
108. Sullivan EL, Grove KL. Metabolic imprinting in obesity. *Forum Nutr.* 2010;63(186-194).
109. Bale TL, Baram TZ, Brown AS, Goldstein JM, Insel TR, McCarthy MM, Nemeroff CB, Reyes TM, Simerly RB, Susser ES. Early life programming and neurodevelopmental disorders. *Biol. Psychiatry* 2010;68(4):314-319.
110. Mahan L, Escott-Stump S. *Nutrición y dietoterapia de Krause*. 10° ed ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2001.
111. Howarth NC, Huang TT, Roberts SB, Lin BH, McCrory MA. Eating patterns and dietary composition in relation to BMI in younger and older adults. *Int. J. Obes. (Lond)* 2007;31(4):675-684.
112. Barquera S, Hernandez-Barrera L, Campos-Nonato I, Espinosa J, Flores M, AB J, Rivera JA. Energy and nutrient consumption in adults: analysis of the Mexican National Health and Nutrition Survey 2006. *Salud Publica Mex.* 2009;51 Suppl 4(S562-S573).
113. Zaveri S, Drummond S. The effect of including a conventional snack (cereal bar) and a nonconventional snack (almonds) on hunger, eating frequency, dietary intake and body weight. *J. Hum. Nutr. Diet.* 2009;22(5):461-468.
114. Al-Naimi S, Hampton SM, Richard P, Tzung C, Morgan LM. Postprandial metabolic profiles following meals and snacks eaten during simulated night and day shift work. *Chronobiol. Int.* 2004;21(6):937-947.
115. Amani R, Gill T. Shiftworking, nutrition and obesity: implications for workforce health- a systematic review. *Asia Pac. J Clin Nutr.* 2013;22(4):505-515.
116. Antunes LC, Levandovski R, Dantas G, Caumo W, Hidalgo MP. Obesity and shift work: chronobiological aspects. *Nutr. Res. Rev.* 2010;23(1):155-168.
117. Qin LQ, Li J, Wang Y, Wang J, Xu JY, Kaneko T. The effects of nocturnal life on endocrine circadian patterns in healthy adults. *Life Sci.* 2003;73(19):2467-2475.
118. Gill S, Panda S. A Smartphone App Reveals Erratic Diurnal Eating Patterns in Humans that Can Be Modulated for Health Benefits. *Cell Metab* 2015;22(5):789-798.
119. Taylor MA, Garrow JS. Compared with nibbling, neither gorging nor a morning fast affect short-term energy balance in obese patients in a chamber calorimeter. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* 2001;25(4):519-528.
120. Togo P, Osler M, Sorensen TI, Heitmann BL. A longitudinal study of food intake patterns and obesity in adult Danish men and women. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* 2004;28(4):583-593.
121. Betts J, Thompson D, Richardson J, Chowdhury E, Jeans M, Holman G, Tzintzas K. Bath Breakfast Project (BBP) - Examining the role of extended daily fasting in human energy balance and associated health outcomes: Study protocol for a randomised controlled trial [ISRCTN31521726]. *Trials* 2011;12(172):

122. Horikawa C, Kodama S, Yachi Y, Heianza Y, Hirasawa R, Ibe Y, Saito K, Shimano H, Yamada N, Sone H. Skipping breakfast and prevalence of overweight and obesity in Asian and Pacific regions: A meta-analysis. *Prev Med* 2011;53(4-5):260-267.
123. Tin S, Yo S, Mak K, Wan K, Lam T. Breakfast skipping and change in body mass index in young children. *Int. J. Obes. (Lond)* 2011;35(7):899-906.
124. Timlin M, Pereira M, Story M, Neumark-Sztainer D. Breakfast eating and weight change in a 5-year prospective analysis of adolescents: Project EAT (Eating Among Teens). *Pediatrics* 2008;121(3):e638-e645.
125. Guidolin M, Gradisar M. Is shortened sleep duration a risk factor for overweight and obesity during adolescence? A review of the empirical literature. *Sleep Med.* 2012;13(7):779-786.
126. Spiegel K, Leproult R, L'hermite-Baleriaux M, Copinschi G, Penev PD, Van CE. Leptin levels are dependent on sleep duration: relationships with sympathovagal balance, carbohydrate regulation, cortisol, and thyrotropin. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 2004;89(11):5762-5771.
127. Van CE, Blackman JD, Roland D, Spire JP, Refetoff S, Polonsky KS. Modulation of glucose regulation and insulin secretion by circadian rhythmicity and sleep. *J. Clin. Invest* 1991;88(3):934-942.
128. Weitzman ED, Zimmerman JC, Czeisler CA, Ronda J. Cortisol secretion is inhibited during sleep in normal man. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 1983;56(2):352-358.
129. Burt J, Dube L, Thibault L, Gruber R. Sleep and eating in childhood: a potential behavioral mechanism underlying the relationship between poor sleep and obesity. *Sleep Med.* 2014;15(1):71-75.
130. Patel SR, Hu FB. Short sleep duration and weight gain: a systematic review. *Obesity. (Silver. Spring)* 2008;16(3):643-653.
131. Taveras EM, Gillman MW, Pena MM, Redline S, Rifas-Shiman SL. Chronic sleep curtailment and adiposity. *Pediatrics* 2014;133(6):1013-1022.
132. Martinez SM, Tschann JM, Greenspan LC, Deardorff J, Penilla C, Flores E, Pasch LA, Gregorich SE, Butte NF. Is it time for bed? Short sleep duration increases risk of obesity in Mexican American children. *Sleep Med.* 2014;15(12):1484-1489.
133. Pileggi C, Lotito F, Bianco A, Nobile CG, Pavia M. Relationship between Chronic Short Sleep Duration and Childhood Body Mass Index: A School-Based Cross-Sectional Study. *PLoS. One.* 2013;8(6):e66680-
134. Boeke CE, Mantzoros CS, Hughes MD, Rifas-Shiman L, Villamor E, Zera CA, Gillman MW. Differential associations of leptin with adiposity across early childhood. *Obesity. (Silver. Spring)* 2013;21(7):1430-1437.
135. Hart CN, Carskadon MA, Considine RV, Fava JL, Lawton J, Raynor HA, Jelalian E, Owens J, Wing R. Changes in children's sleep duration on food intake, weight, and leptin. *Pediatrics* 2013;132(6):e1473-e1480.
136. Eng S, Wagstaff DA, Kranz S. Eating late in the evening is associated with childhood obesity in some age groups but not in all children: the relationship between time of consumption and body weight status in U.S. children. *Int. J. Behav. Nutr. Phys. Act.* 2009;6(27-
137. Baron KG, Reid KJ, Horn LV, Zee PC. Contribution of evening macronutrient intake to total caloric intake and body mass index. *Appetite* 2013;60(1):246-251.
138. Bray MS, Ratcliffe WF, Grenett MH, Brewer RA, Gamble KL, Young ME. Quantitative analysis of light-phase restricted feeding reveals metabolic dyssynchrony in mice. *Int. J. Obes. (Lond)* 2013;37(6):843-852.
139. Salgado-Delgado R, Nadia S, Angeles-Castellanos M, Buijs RM, Escobar C. In a rat model of night work, activity during the normal resting phase produces desynchrony in the hypothalamus. *J Biol. Rhythms* 2010;25(6):421-431.
140. Hatori M, Vollmers C, Zarrinpar A, DiTacchio L, Bushong EA, Gill S, Leblanc M, Chaix A, Joens M, Fitzpatrick JA. Time-restricted feeding without reducing caloric intake prevents metabolic diseases in mice fed a high-fat diet. *Cell Metab* 2012;15(6):848-860.
141. Tsai JY, Villegas-Montoya C, Boland BB, Blasier Z, Egbejimi O, Gonzalez R, Kueht M, McElfresh TA, Brewer RA, Chandler MP. Influence of dark phase restricted high fat feeding on myocardial adaptation in mice. *J Mol. Cell Cardiol.* 2013;55(147-155.

142. Lechan RM, Segerson TP. Pro-TRH gene expression and precursor peptides in rat brain. Observations by hybridization analysis and immunocytochemistry. *Ann N Y Acad Sci* 1989;553(29-59).
143. Fekete C, Lechan RM. Negative feedback regulation of hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone (TRH) synthesizing neurons: role of neuronal afferents and type 2 deiodinase. *Front Neuroendocrinol* 2007;28(2-3):97-114.
144. Merchenthaler I, Liposits Z. Mapping of thyrotropin-releasing hormone (TRH) neuronal systems of rat forebrain projecting to the median eminence and the OVLT. Immunocytochemistry combined with retrograde labeling at the light and electron microscopic levels. *Acta Biol Hung* 1994;45(2-4):361-74.
145. Lechan R.M. Update on thyrotropin-releasing hormone. *Thyroid Today* 1993;16(1-11).
146. Ambach G, Palkovits M, Szentagothai J. Blood supply of the rat hypothalamus. IV. Retrochiasmatic area, median eminence, arcuate nucleus. *Acta Morphol Acad Sci Hung* 1976;24(1-2):93-119.
147. Boler J, Enzmann F, Folkers K, Bowers CY, Schally AV. The identity of chemical and hormonal properties of the thyrotropin releasing hormone and pyroglutamyl-histidyl-proline amide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1969;37(4):705-710.
148. Bowers CY. The role of cyclic AMP in the release of anterior pituitary hormones. *Ann N Y Acad Sci* 1971;185(263-90).
149. Joseph-Bravo P, Uribe RM, Vargas MA, Perez-Martinez L, Zoeller T, Charli JL. Multifactorial modulation of TRH metabolism. *Cell Mol Neurobiol* 1998;18(2):231-47.
150. O'Leary R, O'Connor B. Thyrotropin-releasing hormone. *J Neurochem* 1995;65(3):953-63.
151. Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev* 2000;80(4):1523-631.
152. Yu R, Ashworth R, Hinkle PM. Receptors for thyrotropin-releasing hormone on rat lactotropes and thyrotropes. *Thyroid* 1998;8(10):887-94.
153. Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev* 2001;81(3):1097-142.
154. Nikrodhanond AA, Ortiga-Carvalho TM, Shibusawa N, Hashimoto K, Liao XH, Refetoff S, Yamada M, Mori M, Wondisford FE. Dominant role of thyrotropin-releasing hormone in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *J Biol Chem* 2006;281(8):5000-7.
155. Lanni A, Moreno M, Lombardi A, Goglia F. Thyroid hormone and uncoupling proteins. *FEBS Lett* 2003;543(1-3):5-10.
156. Reinehr T, de Sousa G, Andler W. Hyperthyrotropinemia in obese children is reversible after weight loss and is not related to lipids. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 2006;91(3088-3091).
157. Reinehr T, Isa A, de Sousa G, Dieffenbach R, Andler W. Thyroid hormones and their relationship to weight status. *Horm. Res.* 2008;70(51-57).
158. Reinehr T. Obesity and thyroid function. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2010;316(165-171).
159. Rondeel JM, Heide R, de Greef WJ, van Toor H, van Haasteren GA, Klootwijk W, Visser TJ. Effect of starvation and subsequent refeeding on thyroid function and release of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone. *Neuroendocrinology* 1992;56(3):348-53.
160. van Haasteren GA, Linkels E, Klootwijk W, van Toor H, Rondeel JM, Themmen AP, de Jong FH, Valentijn K, Vaudry H, Bauer K. Starvation-induced changes in the hypothalamic content of prothyrotrophin-releasing hormone (proTRH) mRNA and the hypothalamic release of proTRH-derived peptides: role of the adrenal gland. *J Endocrinol* 1995;145(1):143-53.
161. van Haasteren GA, Linkels E, van Toor H, Klootwijk W, Kaptein E, de Jong FH, Reymond MJ, Visser TJ, de Greef WJ. Effects of long-term food reduction on the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in male and female rats. *J Endocrinol* 1996;150(2):169-78.
162. Boelen A, Wiersinga WM, Fliers E. Fasting-induced changes in the hypothalamus-pituitary-thyroid axis. *Thyroid* 2008;18(2):123-9.
163. Blake NG, Eckland DJ, Foster OJ, Lightman SL. Inhibition of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid during food deprivation. *Endocrinology* 1991;129(5):2714-8.

164. Alvarez-Salas E, Aceves C, Anguiano B, Uribe R, García-Luna C, Sánchez E, de Gortari P. Food-restricted and dehydrated-induced anorexic rats present differential TRH expression in anterior and caudal PVN. Role of type 2 deiodinase and pyroglutamyl aminopeptidase II. *Endocrinology* 2012;153(8):4067-4076.
165. Nillni EA. Regulation of the hypothalamic thyrotropin releasing hormone (TRH) neuron by neuronal and peripheral inputs. *Front Neuroendocrinol.* 2010;31(2):134-156.
166. Guo F, Bakal K, Minokoshi Y, Hollenberg AN. Leptin signaling targets the thyrotropin-releasing hormone gene promoter in vivo. *Endocrinology* 2004;145(5):2221-2227.
167. Huo L, Munzberg H, Nillni EA, Bjorbaek C. Role of signal transducer and activator of transcription 3 in regulation of hypothalamic trh gene expression by leptin. *Endocrinology* 2004;145(5):2516-2523.
168. Nillni EA, Vaslet C, Harris M, Hollenberg A, Bjorbak C, Flier JS. Leptin regulates prothyrotropin-releasing hormone biosynthesis. Evidence for direct and indirect pathways. *J Biol. Chem.* 2000;275(46):36124-36133.
169. Fekete C, Sarkar S, Rand WM, Harney JW, Emerson CH, Bianco AC, Beck-Sickinger A, Lechan RM. Neuropeptide Y1 and Y5 receptors mediate the effects of neuropeptide Y on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Endocrinology* 2002;143(12):4513-9.
170. Kakucska I, Qi Y, Lechan RM. Changes in adrenal status affect hypothalamic thyrotropin-releasing hormone gene expression in parallel with corticotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 1995;136(7):2795-2802.
171. Lee GC, Yang IM, Kim BJ, Woo JT, Kim SW, Kim JW, Kim YS, Choi YK. Identification of glucocorticoid response element of the rat TRH gene. *Korean J Intern. Med.* 1996;11(2):138-144.
172. Nieuwenhuizen A, Rutters F. The hypothalamic-pituitary-adrenal-axis in the regulation of energy balance. *Physiol Behav* 2008;94(2):169-177.
173. Tagliaferri M, Berselli ME, Calo G, Minocci A, Savia G, Petroni ML, Viberti GC, Liuzzi A. Subclinical hypothyroidism in obese patients: relation to resting energy expenditure, serum leptin, body composition, and lipid profile. *Obes. Res.* 2001;9(3):196-201.
174. Nyrrnes A, Jorde R, Sundsfjord J. Serum TSH is positively associated with BMI. *Int. J Obes. (Lond)* 2006;30(1):100-105.
175. Knudsen N, Laurberg P, Rasmussen LB, Bulow I, Perrild H, Ovesen L, Jorgensen T. Small differences in thyroid function may be important for body mass index and the occurrence of obesity in the population. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90(7):4019-4024.
176. Reinehr T, Andler W. Thyroid hormones before and after weight loss in obesity. *Arch. Dis. Child* 2002;87(4):320-323.
177. Reinehr T, Isa A, de SG, Dieffenbach R, Andler W. Thyroid hormones and their relation to weight status. *Horm. Res.* 2008;70(1):51-57.
178. Perello M, Cakir I, Cyr NE, Romero A, Stuart RC, Chiappini F, Hollenberg AN, Nillni EA. Maintenance of the thyroid axis during diet-induced obesity in rodents is controlled at the central level. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010;299(6):E976-E989.
179. Habib K, Gold W, Chrousos G. Neuroendocrinology of stress. *Endocrinology Metabolic Clinic* 2001;30(3):695-728.
180. Chrousos G. Organization and Integration of the Endocrine System. *Sleep Medicine Clinics* 2007;2(125-145).
181. McEwen B. Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. *European Journal of Pharmacology* 2008;583(174):185-
182. Van de Kar L, Blair M. Forebrain pathways mediating stress-induced hormone secretion. *Neuroendocrinology* 1999;20(1):1-48.
183. Pacak K, Palkovits M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocrine Reviews* 2001;22(502-548).
184. Sapolsky R, Romero L, Munck A. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating, permissive, suppressive, stimulatory and preparative actions. *Endocrine Reviews* 2000;21(55-89).

185. Potter E, Sutton S, Donaldson C, Chen R, Perrin M, Lewis K, Sawchenko P, Vale W. Distribution of corticotropin-releasing factor receptor mRNA expression in the rat brain and pituitary. *Neurobiology* 1994;91(8777-8781).
186. Schimmer B, Funder J.
187. Antoni F. Hypothalamic control of adrenocorticotropin secretion: advances since the discovery of 41-residue corticotropin-releasing factor. *Endocr Rev* 1986;7(4):351-378.
188. Carroll J, Aron D, Findling J, Tyrrell B.
189. Rosmond R, Holm G, Bjorntorp P. Food-induced cortisol secretion in relation to anthropometric, metabolic and haemodynamic variables in men. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* 2000;24(4):416-422.
190. George SA, Khan S, Briggs H, Abelson JL. CRH-stimulated cortisol release and food intake in healthy, non-obese adults. *Psychoneuroendocrinology* 2010;35(4):607-612.
191. Bell ME, Bhatnagar S, Liang J, Soriano L, Nagy TR, Dallman MF. Voluntary sucrose ingestion, like corticosterone replacement, prevents the metabolic deficits of adrenalectomy. *J Neuroendocrinol.* 2000;12(5):461-470.
192. Foster MT, Warne JP, Ginsberg AB, Horneman HF, Pecoraro NC, Akana SF, Dallman MF. Palatable foods, stress, and energy stores sculpt corticotropin-releasing factor, adrenocorticotropin, and corticosterone concentrations after restraint. *Endocrinology* 2009;150(5):2325-2333.
193. Pecoraro N, Reyes F, Gomez F, Bhargava A, Dallman MF. Chronic stress promotes palatable feeding, which reduces signs of stress: feedforward and feedback effects of chronic stress. *Endocrinology* 2004;145(8):3754-3762.
194. Sharma S, Fulton S. Diet-induced obesity promotes depressive-like behaviour that is associated with neural adaptations in brain reward circuitry. *Int. J. Obes. (Lond)* 2013;37(3):382-389.
195. Balsevich G, Uribe A, Wagner KV, Hartmann J, Santarelli S, Labermaier C, Schmidt MV. Interplay between diet-induced obesity and chronic stress in mice: potential role of FKBP51. *J Endocrinol* 2014;222(1):15-26.
196. Pedersen SB, Jonler M, Richelsen B. Characterization of regional and gender differences in glucocorticoid receptors and lipoprotein lipase activity in human adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78(6):1354-1359.
197. McCarty MF. Modulation of adipocyte lipoprotein lipase expression as a strategy for preventing or treating visceral obesity. *Med. Hypotheses* 2001;57(2):192-200.
198. Connan F, Campbell IC, Katzman M, Lightman SL, Treasure J. A neurodevelopmental model for anorexia nervosa. *Physiol Behav* 2003;79(1):13-24.
199. Tsigos C, Chrousos G. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of Psychosomatic Research* 2002;53(865-871).
200. Eglinton K, McMahan C, Austin M. Stress in pregnancy and infant HPA axis function: Conceptual and methodological issues relating to the use of salivary cortisol as an outcome measure. *Psychoneuroendocrinology* 2007;32(1):1-13.
201. Dobbing J, Sands J. Head circumference, biparietal diameter and brain growth in fetal and postnatal life. *Early Human Development* 1978;2(81-87).
202. Noorlander C, De Graan P, Middeldorp J, Van Beers J, Visser G. Ontogeny of hippocampal corticosteroid receptors: effects of antenatal glucocorticoids in human and mouse. *The Journal of Comparative Neurology* 2006;499(924-932).
203. Weinstock M. The long-term behavioural consequences of prenatal stress. *Neurosci Biobehav Rev* 2008;32(6):1073-1086.
204. Fujioka T, Fujioka A, Endoh H, Sakata Y, Furukawa S, Nakamura S. Materno-fetal coordination of stress-induced fos expression in the hypothalamic paraventricular nucleus during pregnancy. *Neuroscience* 2011;118(2):409-415.
205. Cintra A, Fuxe K, Visser T, Gustafsson J. Evidence for thyrotropin-releasing hormone and glucocorticoid receptor-immunoreactive neurons in various preoptic and hypothalamic nuclei of the male rat. *Brain Research* 1990;506(1):139-144.
206. Diaz R, Brown R, Seckl J. Distinct ontogeny of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor and 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase types I and II mRNAs in the fetal rat brain suggest a complex control of glucocorticoid actions. *J Neurosci* 1998;18(2570):2580-

207. Dallman MF. Stress-induced obesity and the emotional nervous system. *Trends Endocrinol Metab* 2010;21(3):159-165.
208. Connors S, Levitt P, Matthews S, Slotkin T, Johnston M, Kinney H, Johnson W, Dailey R, Zimmerman A. Fetal mechanisms in neurodevelopmental disorders. *Pediatric Neurology* 2008;38(163-176).
209. Tamashiro K, Terrillion C, Hyun J, Koenig J, Moran T. Prenatal stress or high-fat diet increases susceptibility to diet-induced obesity in rat offspring. *Diabetes* 2009;58(1116-1125).
210. Piazza P, Le Moal M. The role of stress in drug self-administration. *Trends in Pharmacological Sciences* 1998;19(2):67-74.
211. Willner P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioral-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology* 2005;52(2):90-110.
212. Weiss J. Does decreased sucrose intake indicate loss of preference in CMS model? *Psychopharmacology* 1997;134(4):368-370.
213. Weinstock M. Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behaviour of the offspring. *Progress in Neurobiology* 2001;65(427-451).
214. Gibson E. Emotional influences on food choice: sensory, physiological and psychological pathways. *Physiol Behav* 2006;89(51):61-
215. Torres S, Nowson C. Relationship between stress, eating behavior, and obesity. *Nutrition* 2007;23(887-894).
216. Serlachius A, Hamer M, Wardle J. Stress and weight change in university students in the United Kingdom. *Physiol Behav* 2007;92(4):548-553.
217. Brunner E, Chandola T, Marmot M. Prospective effect of job strain on general and central obesity in the Whitehall II study. *Am J Epidemiol* 2007;165(7):828-837.
218. Block J, He Y, Zaslavsky A, Ding L, Ayanian J. Psychosocial stress and change in weight among US adults. *Am J Epidemiol* 2009;170(2):181-192.
219. Anderson S, Cohen P, Naumova E, Must A. Association of depression and anxiety disorders with weight change in a prospective community-based study of children followed up into adulthood. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2006;160(3):285-291.
220. Martí O, Martí J, Armario A. Effects of chronic stress on food intake in rats: influence of stressor intensity and duration of daily exposure. *Physiol Behav* 1994;55(4):747-753.
221. Alario P, Gamallo A, Beato M, Tranco G. Body weight gain, food intake and adrenal development in chronic noise stressed rats. *Physiol Behav* 1987;40(1):29-32.
222. Krebs H, Macht M, Weyers P, Weijers H, Janke W. Effects of stressful noise on eating and non-eating behavior in rats. *Appetite* 1996;26(2):193-202.
223. Harris R, Zhou J, Youngblood B, Rybkin I, Smagin G, Ryan D. Effect of repeated stress on body weight and body composition of rats fed low-and high-fat diets. *Am J Physiol* 1998;275(6 Pt 2):1928-1938.
224. Rowland N, Antelman S. Stress-induced hyperphagia and obesity in rats: a possible model for understanding human obesity. *Science* 1976;191(4224):310-312.
225. Wallach M, Dawber M, McMahon M, Rogers C. A new anorexigen assay: stress-induced hyperphagia in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1977;6(5):529-531.
226. Instituto Nacional de Salud Pública. Encuesta Nacional de Nutrición 2016. 2016. México, Secretaría de Salud.
227. Bojanowska E, Nowak A. Interactions between leptin and exendin-4, a glucagon-like peptide-1 agonist, in the regulation of food intake in the rat. *J Physiol Pharmacol*. 2007;58(2):349-360.
228. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 5th ed. USA: Elsevier; 2005.
229. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162(1):156-9.
230. Mistlberger RE. Circadian food-anticipatory activity: formal models and physiological mechanisms. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1994;18(2):171-195.
231. Honma KI, Honma S, Hiroshige T. Critical role of food amount for prefeeding corticosterone peak in rats. *Am J Physiol* 1983;245(3):R339-R344.
232. Froy O. Circadian rhythms and obesity in mammals. *ISRN. Obes.* 2012;2012(437198-

233. Dallman MF, Pecoraro N, Akana SF, La Fleur SE, Gomez F, Houshyar H, Bell ME, Bhatnagar S, Laugero KD, Manalo S. Chronic stress and obesity: a new view of "comfort food". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 2003;100(20):11696-11701.
234. La Fleur SE, Akana SF, Manalo SL, Dallman MF. Interaction between corticosterone and insulin in obesity: regulation of lard intake and fat stores. *Endocrinology* 2004;145(5):2174-2185.
235. Zakrzewska KE, Cusin I, Stricker-Krongrad A, Boss O, Ricquier D, Jeanrenaud B, Rohner-Jeanrenaud F. Induction of obesity and hyperleptinemia by central glucocorticoid infusion in the rat. *Diabetes* 1999;48(2):365-370.
236. Savontaus E, Conwell IM, Wardlaw SL. Effects of adrenalectomy on AGRP, POMC, NPY and CART gene expression in the basal hypothalamus of fed and fasted rats. *Brain Res.* 2002;958(1):130-138.
237. Konno J, Yoshida S, Ina A, Ohmomo H, Shutoh F, Nogami H, Hisano S. Upregulated expression of neuropeptide Y in hypothalamic-pituitary system of rats by chronic dexamethasone administration. *Neurosci. Res.* 2008;60(3):259-265.
238. Shimizu H, Arima H, Watanabe M, Goto M, Banno R, Sato I, Ozaki N, Nagasaki H, Oiso Y. Glucocorticoids increase neuropeptide Y and agouti-related peptide gene expression via adenosine monophosphate-activated protein kinase signaling in the arcuate nucleus of rats. *Endocrinology* 2008;149(9):4544-4553.
239. Kalra SP, Dube MG, Sahu A, Phelps CP, Kalra PS. Neuropeptide Y secretion increases in the paraventricular nucleus in association with increased appetite for food. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 1991;88(23):10931-10935.
240. Campbell JE, Peckett AJ, D'souza AM, Hawke TJ, Riddell MC. Adipogenic and lipolytic effects of chronic glucocorticoid exposure. *Am J Physiol Cell Physiol* 2011;300(1):C198-C209.
241. Rebuffe-Scrive M, Walsh UA, McEwen B, Rodin J. Effect of chronic stress and exogenous glucocorticoids on regional fat distribution and metabolism. *Physiol Behav.* 1992;52(3):583-590.
242. Zilberfarb V, Siquier K, Strosberg AD, Issad T. Effect of dexamethasone on adipocyte differentiation markers and tumour necrosis factor-alpha expression in human PAZ6 cells. *Diabetologia* 2001;44(3):377-386.
243. Marin P, Darin N, Amemiya T, Andersson B, Jern S, Bjorntorp P. Cortisol secretion in relation to body fat distribution in obese premenopausal women. *Metabolism* 1992;41(8):882-886.
244. Chimin P, Farias TS, Torres-Leal FL, Bolsoni-Lopes A, Campana AB, Andreotti S, Lima FB. Chronic glucocorticoid treatment enhances lipogenic activity in visceral adipocytes of male Wistar rats. *Acta Physiol (Oxf)* 2014;211(2):409-420.
245. Geer EB, Shen W, Gallagher D, Punyanitya M, Looker HC, Post KD, Freda PU. MRI assessment of lean and adipose tissue distribution in female patients with Cushing's disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2010;73(4):469-475.
246. Epel ES. Psychological and metabolic stress: a recipe for accelerated cellular aging? *Hormones. (Athens.)* 2009;8(1):7-22.
247. Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Lollmann B, Lowell BB, Flier JS. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat. Med.* 1995;1(12):1311-1314.
248. Hamann A, Matthaei S. Regulation of energy balance by leptin. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 1996;104(4):293-300.
249. Jequier E. Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2002;967(379-388).
250. Asensio C, Muzzin P, Rohner-Jeanrenaud F. Role of glucocorticoids in the physiopathology of excessive fat deposition and insulin resistance. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* 2004;28 Suppl 4(S45-S52).
251. Zakrzewska KE, Cusin I, Sainsbury A, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B. Glucocorticoids as counterregulatory hormones of leptin: toward an understanding of leptin resistance. *Diabetes* 1997;46(4):717-719.

252. Franco JG, Fernandes TP, Rocha CP, Calvino C, Pazos-Moura CC, Lisboa PC, Moura EG, Trevenzoli IH. Maternal high-fat diet induces obesity and adrenal and thyroid dysfunction in male rat offspring at weaning. *J Physiol* 2012;590(21):5503-5518.
253. Araujo RL, Andrade BM, Padron AS, Gaidhu MP, Perry RL, Carvalho DP, Ceddia RB. High-fat diet increases thyrotropin and oxygen consumption without altering circulating 3,5,3'-triiodothyronine (T3) and thyroxine in rats: the role of iodothyronine deiodinases, reverse T3 production, and whole-body fat oxidation. *Endocrinology* 2010;151(7):3460-3469.
254. Arechiga-Ceballos F, Alvarez-Salas E, Matamoros-Trejo G, Amaya MI, Garcia-Luna C, de GP. Pro-TRH and pro-CRF expression in paraventricular nucleus of small litter-reared fasted adult rats. *J Endocrinol* 2014;221(1):77-88.
255. Wittmann G, Fuzesi T, Singru PS, Liposits Z, Lechan RM, Fekete C. Efferent projections of thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons residing in the anterior parvocellular subdivision of the hypothalamic paraventricular nucleus. *J. Comp Neurol.* 2009;515(3):313-330.
256. Marks JL, Li M, Schwartz M, Porte D, Jr., Baskin DG. Effect of fasting on regional levels of neuropeptide Y mRNA and insulin receptors in the rat hypothalamus: An autoradiographic study. *Mol. Cell Neurosci.* 1992;3(3):199-205.
257. Mitchell SE, Nogueiras R, Morris A, Tovar S, Grant C, Cruickshank M, Rayner DV, Dieguez C, Williams LM. Leptin receptor gene expression and number in the brain are regulated by leptin level and nutritional status. *J Physiol* 2009;587(Pt 14):3573-3585.
258. Fekete C, Mihaly E, Luo LG, Kelly J, Clausen JT, Mao Q, Rand WM, Moss LG, Kuhar M, Emerson CH. Association of cocaine- and amphetamine-regulated transcript-immunoreactive elements with thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and its role in the regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis during fasting. *J Neurosci* 2000;20(24):9224-34.
259. Sarkar S, Legradi G, Lechan RM. Intracerebroventricular administration of alpha-melanocyte stimulating hormone increases phosphorylation of CREB in TRH- and CRH-producing neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res.* 2002;945(1):50-59.
260. Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, Baskin DG. Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest* 1996;98(5):1101-1106.
261. Purcell RH, Sun B, Pass LL, Power ML, Moran TH, Tamashiro KL. Maternal stress and high-fat diet effect on maternal behavior, milk composition, and pup ingestive behavior. *Physiol Behav.* 2011;104(3):474-479.
262. Mueller BR, Bale TL. Impact of prenatal stress on long term body weight is dependent on timing and maternal sensitivity. *Physiol Behav.* 2006;88(4-5):605-614.
263. Bjorntorp P. Do stress reactions cause abdominal obesity and comorbidities? *Obes. Rev.* 2001;2(2):73-86.
264. Ottosson M, Lonroth P, Bjorntorp P, Eden S. Effects of cortisol and growth hormone on lipolysis in human adipose tissue. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 2000;85(2):799-803.
265. Seckl JR, Morton NM, Chapman KE, Walker BR. Glucocorticoids and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in adipose tissue. *Recent Prog. Horm. Res.* 2004;59(359-393).
266. Le MN, Damiola F, Tronche F, Schutz G, Schibler U. Glucocorticoid hormones inhibit food-induced phase-shifting of peripheral circadian oscillators. *EMBO J.* 2001;20(24):7128-7136.
267. McCormick CM, Smythe JW, Sharma S, Meaney MJ. Sex-specific effects of prenatal stress on hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress and brain glucocorticoid receptor density in adult rats. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 1995;84(1):55-61.
268. Zohar I, Weinstock M. Differential effect of prenatal stress on the expression of corticotrophin-releasing hormone and its receptors in the hypothalamus and amygdala in male and female rats. *J. Neuroendocrinol.* 2011;23(4):320-328.
269. Brunton PJ, Russell JA. Prenatal social stress in the rat programmes neuroendocrine and behavioural responses to stress in the adult offspring: sex-specific effects. *J. Neuroendocrinol.* 2010;22(4):258-271.

270. Maccari S, Krugers HJ, Morley-Fletcher S, Szyf M, Brunton PJ. The consequences of early-life adversity: neurobiological, behavioural and epigenetic adaptations. *J. Neuroendocrinol.* 2014;26(10):707-723.
271. Maccari S, Piazza PV, Kabbaj M, Barbazanges A, Simon H, Le MM. Adoption reverses the long-term impairment in glucocorticoid feedback induced by prenatal stress. *J Neurosci.* 1995;15(1 Pt 1):110-116.
272. Van W, V, Enache M, Dutriez I, Lesage J, Morley-Fletcher S, Vinner E, Lhermitte M, Vieau D, Maccari S, Darnaudery M. Hypo-response of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis after an ethanol challenge in prenatally stressed adolescent male rats. *Eur. J. Neurosci.* 2006;24(4):1193-1200.
273. Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, Dymov S, Szyf M, Meaney MJ. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat. Neurosci.* 2004;7(8):847-854.
274. Cratty MS, Ward HE, Johnson EA, Azzaro AJ, Birkle DL. Prenatal stress increases corticotropin-releasing factor (CRF) content and release in rat amygdala minces. *Brain Res.* 1995;675(1-2):297-302.
275. McCarty R, Horwatt K, Konarska M. Chronic stress and sympathetic-adrenal medullary responsiveness. *Soc. Sci. Med.* 1988;26(3):333-341.
276. O'Connor TG, Ben-Shlomo Y, Heron J, Golding J, Adams D, Glover V. Prenatal anxiety predicts individual differences in cortisol in pre-adolescent children. *Biol. Psychiatry* 2005;58(3):211-217.
277. Gutteling BM, de WC, Buitelaar JK. Prenatal stress and children's cortisol reaction to the first day of school. *Psychoneuroendocrinology* 2005;30(6):541-549.
278. Raadsheer FC, Hoogendijk WJ, Stam FC, Tilders FJ, Swaab DF. Increased numbers of corticotropin-releasing hormone expressing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of depressed patients. *Neuroendocrinology* 1994;60(4):436-444.
279. Concas A, Mostallino MC, Porcu P, Follesa P, Barbaccia ML, Trabucchi M, Purdy RH, Grisenti P, Biggio G. Role of brain allopregnanolone in the plasticity of gamma-aminobutyric acid type A receptor in rat brain during pregnancy and after delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 1998;95(22):13284-13289.
280. Brunton PJ, McKay AJ, Ochedalski T, Piastowska A, Rebas E, Lachowicz A, Russell JA. Central opioid inhibition of neuroendocrine stress responses in pregnancy in the rat is induced by the neurosteroid allopregnanolone. *J. Neurosci.* 2009;29(20):6449-6460.
281. Pankevich DE, Mueller BR, Brockel B, Bale TL. Prenatal stress programming of offspring feeding behavior and energy balance begins early in pregnancy. *Physiol Behav.* 2009;98(1-2):94-102.
282. Uribe RM, Jaimes-Hoy L, Ramirez-Martinez C, Garcia-Vazquez A, Romero F, Cisneros M, Cote-Velez A, Charli JL, Joseph-Bravo P. Voluntary exercise adapts the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in male rats. *Endocrinology* 2014;155(5):2020-2030.
283. Sugden MC, Langdown ML, Munns MJ, Holness MJ. Maternal glucocorticoid treatment modulates placental leptin and leptin receptor expression and materno-fetal leptin physiology during late pregnancy, and elicits hypertension associated with hyperleptinaemia in the early-growth-retarded adult offspring. *Eur. J. Endocrinol.* 2001;145(4):529-539.

XI. Anexos

11.1 Artículo publicado en la revista *Journal of Endocrinology*: “Prepuberal light phase feeding induces neuroendocrine alterations in adult rats”.

AUTHOR COPY ONLY

Research

C. GARCÍA-LUNA and others

Neuroendocrine changes by feeding schedules

232:1

15–28

Prepuberal light phase feeding induces neuroendocrine alterations in adult rats

C García-Luna, P Soberanes-Chávez and P de Gortari

Department of Neurosciences Research, Molecular Neurophysiology Laboratory, National Institute of Psychiatry Ramón de la Fuente Muñiz, Mexico City, Mexico

Correspondence should be addressed to P de Gortari
Email
gortari@imp.edu.mx

Abstract

Feeding patterns are important factors in obesity evolution. Time-restricted feeding schedules (tRF) during resting phase change energy homeostasis regulation, disrupting the circadian release of metabolism-regulating hormones, such as leptin, insulin and corticosterone and promoting body weight gain. Thyroid (HPT) and adrenal (HPA) axes exhibit a circadian regulation and are involved in energy expenditure, thus studying their parameters in tRF paradigms will elucidate their role in energy homeostasis impairments under such conditions. As tRF in young animals is poorly studied, we subjected prepuberal rats to a tRF either in light (LPF) or in darkness phase (DPF) and analyzed HPT and HPA response when they reach adulthood, as well as their arcuate (ARC) and paraventricular (PVN) hypothalamic nuclei neurons' sensitivity to leptin in subsets of 10-week-old animals after fasting and with i.p. leptin treatment. LPF group showed high body weight and food intake, along with increased visceral fat pads, corticosterone, leptin and insulin serum levels, whereas circulating T_4 decreased. HPA axis hyperactivity was demonstrated by their high PVN *Crf* mRNA expression; the blunted activity of HPT axis, by the decreased hypophysiotropic PVN *Trh* mRNA expression. *Trh* impaired expression to the positive energy balance in LPF, accounted for their ARC leptin resistance, evinced by an increased *Npy* and *Socs3* mRNA expression. We concluded that the hyperphagia of prepuberal LPF animals could account for the HPA axis hyperactivity and for the HPT blocked function due to the altered ARC leptin signaling and impaired NPY regulation on PVN TRH neurons.

Key Words

- ▶ proTRH
- ▶ proCRF
- ▶ leptin
- ▶ feeding schedules

Journal of Endocrinology
(2017) **232**, 15–28

Introduction

Obesity is a major worldwide health concern; its prevalence has doubled in the last 35 years in children and adults (Flegal *et al.* 2016, Ogden *et al.* 2016), it may result from an imbalance between energy intake and energy expenditure leading to increased body fat content. In humans, environmental factors, such as lifestyle and eating habits, have a direct influence on body weight. Changing eating schedules from the activity to the resting phase, increases the risk of individuals to develop

metabolic alterations and weight gain, as seen in shift workers and in people who eat during the night (Qin *et al.* 2003, Al-Naimi *et al.* 2004, Antunes *et al.* 2010, Amani & Gill 2013). Moreover, limiting food intake to an interval of 10–12h during activity phase, regardless of food quality or quantity, reduces body weight (Gill & Panda 2015). Thus, uncoupling the release of rest/activity cycle-induced hormones with feeding schedules by changing eating habits, impairs individuals' energy homeostasis.

In fact, reports of time-restricted feeding paradigms (tRF) show the effects of feeding time on metabolism of rodents: energy homeostasis is impaired in animals eating regular chow during their resting phase (light phase), in comparison with that of animals fed during their activity phase (darkness phase) (Salgado-Delgado *et al.* 2010, Bray *et al.* 2013). In addition, when animals are fed with a high-fat diet (HFD) during the activity period, body weight gain diminishes and lipid and glucose metabolism improves in comparison with HFD-fed animals during the resting phase (Hatori *et al.* 2012, Tsai *et al.* 2013), showing that feeding time is relevant to maintain an adequate energy balance.

Expression and/or release of peripheral signals such as leptin (Ahima *et al.* 1998), insulin (La Fleur *et al.* 1999), glucagon (Ruiter *et al.* 2003), ghrelin (Bodosi *et al.* 2004), corticosterone (De Boer & Van der Gugten 1987) and thyroid hormones (TH) (Jordan *et al.* 1980) have a circadian oscillation, either in response to light/darkness cycle or to feeding schedules. In particular, leptin serum content increases after a meal and when adipose tissue augments, inhibiting food intake and enhancing energy expenditure by activating the transcription of anorexigenic peptides (cocaine and amphetamine-regulated peptide (CART)/proopiomelanocortin (POMC)) from the hypothalamic arcuate nucleus (ARC) and silencing that of orexigenic (neuropeptide Y (NPY)/agouti-related peptide (AgRP)) ones (Cheung *et al.* 1997, Ahima *et al.* 1999, Elias *et al.* 1999). Orexigenic and anorexigenic neuron populations from the ARC project to thyrotropin-releasing hormone (TRH)- and corticotrophin-releasing factor (CRF)-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) (Cone *et al.* 2001), modulating TRH and CRF expression and their neuroendocrine effects.

TRH and CRF direct hypothalamic–pituitary–thyroid (HPT) and adrenal (HPA) axes, respectively. Both axes are regulated by a negative feedback loop having TH and glucocorticoids (GC, corticosterone in rodents) as final effectors. TH influences energy balance activating the synthesis of uncoupling proteins in brown adipose tissue (BAT) and enhancing lipolysis (Lanni *et al.* 2003, Mullur *et al.* 2014). GCs stimulate the proliferation and differentiation of pre-adipocytes, promoting abdominal fat deposition (Bjorntorp 2001, Zilberfarb *et al.* 2001); in addition, they increase gluconeogenesis and glucose serum availability (Imai *et al.* 1990, Schmoll *et al.* 1996, Lin *et al.* 1998) and stimulate ARC NPY expression and food intake (Shimizu *et al.* 2008). TRH and CRF are allocated with anorexigenic actions revealed by their intracerebroventricular injections (Morley &

Levine 1980, Rohner-Jeanrenaud *et al.* 1989, Kow & Pfaff 1991). Leptin activates TRH and CRF expression; thus, conditions altering this hormone content, such as obesity or fasting, can affect energy expenditure and food intake through those peptides' actions (Fekete *et al.* 2006, Perello *et al.* 2010).

ARC NPY/AgRP neurons' projections into PVN and lateral hypothalamus are not completely mature after birth (Bouret *et al.* 2004, Baquero *et al.* 2014). Moreover, leptin exerts its anorexigenic effects on animals from the fourth week of age (Mistry *et al.* 1999), and its involvement in PVN TRH expression regulation requires ARC projection pathways (Legradi & Lechan 1998), making the prepubertal stage critical for changes in animals' feeding that might prevail until adulthood. Although tRF studies have yielded a significant amount of data in adult rats, there is very little information about the response of neuroendocrine axes in younger animals under this feeding schedule.

We hypothesized that the programming of the neuroendocrine axes' function by hormones whose release depend on the rest/activity cycle may be impaired during early developmental stages by changing individuals' feeding habits to the resting phase of the day; and this impairment may be sustained up to adulthood provoking metabolic alterations. The aim of this study was to evaluate if tRF in prepubertal rats, whether in the light or darkness phase, could alter energy homeostasis and neuroendocrine axes regulation when those animals reach adulthood. In addition, we hypothesized an impaired leptin signaling as a candidate pathway involved in body weight gain of animals fed in the light phase.

Methods

Animals

All animal procedures were approved by Psychiatry Institute's Ethical Committee on Animal Experimentation and agreed with the Mexican official norm NOM-062-ZOO-1999 for use and care of laboratory animals. Pregnant Wistar rats ($n=12$) from the animal housing facility of the Psychiatry National Institute were housed individually under controlled light cycle (lights on from 0700 to 1900h and temperature ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) conditions, with *ad libitum* access to standard rat chow (Lab rodent diet #5001, PMI feeds) and water. The day of the delivery was identified as day 0, and dams and pups were left undisturbed until weaning (postnatal day (PN) 21). At PN21, male pups (5–6 males per litter) were separated, individually caged

and divided into 3 experimental groups ($n=22/\text{group}$): control group (C): animals were fed *ad libitum* with standard rat chow and had unrestricted access to water; light-phase fed (LPF) group: which had food available from 1700 to 0900 with *ad libitum* access to water; darkness-phase fed (DPF) group that had food available from 2300 to 0700 with free access to water (Fig. 1A). The tRF schedule was performed from PN21 to PN35 (prepubertal stage) and after PN35 animals were left undisturbed with *ad libitum* access to rat chow and water until they reached adulthood (PN70). Body weight and food intake were measured weekly until PN70, when animals were killed by decapitation. Brains were excised, frozen on dry ice and kept at -70°C until *in situ* hybridization (ISH) analyses of *proTh* and *proCrh* mRNA expression were performed; adipose tissue subcompartments (white adipose tissue (WAT): mesenteric, subcutaneous, epididymal, perirenal retroperitoneal; brown adipose tissue (BAT): subscapular), and adrenal glands were dissected and weighed; trunk blood was collected for serum hormones' determination (triiodothyronine (T_3), thyroxine (T_4), insulin, leptin and corticosterone).

To evaluate hypothalamic neurons' response to fasting and to leptin administration, a subset of ten-

week-old animals from the three experimental groups ($n=4-6/\text{group}$) was subjected to a 48-h fasting and intraperitoneally (i.p.) administered with either vehicle (veh: 0.9% saline solution) or $0.1\mu\text{g}$ per gram of body weight of recombinant mouse leptin (Calbiochem, Merck Millipore) twice a day (07:00 and 19:00h) during the 48-h fasting period, as previously reported (Bojanowska & Nowak 2007). After leptin administration, animals were refed, and food intake was recorded 6 h after food was made available. Body weight loss was measured by weighing animals before and after fasting and the percentage of the changes in body weight loss (% Δ) was calculated by taking the initial weight (10-week-old weight) as 100%. At the end of the refeeding period, animals were killed by decapitation; adipose tissue subcompartments and adrenal glands were treated as mentioned before; brains were excised and maintained at -70°C until real-time PCR (RT-PCR) analyses of ARC and PVN transcripts were performed.

Determination of serum hormones' content

Total serum T_3 , T_4 and insulin were determined by commercial ELISA kits following manufacturer's

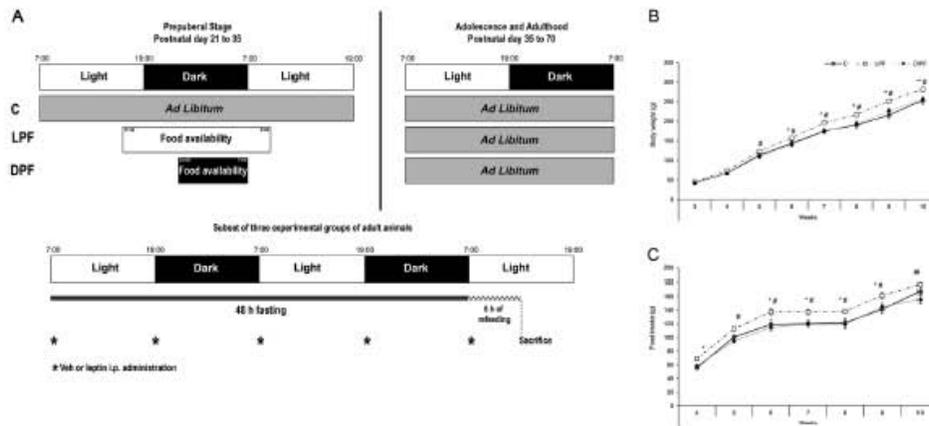


Figure 1 Experimental design, body weight and food intake. (A) Feeding schedule from postnatal day (PN) 21 to 35 of male rats. Control (C) group had *ad libitum* access to food and water, light-phase feeding (LPF) group had access to food from 17:00 to 09:00h and free access to water and darkness-phase feeding (DPF) animals had food availability from 2300 to 0700h and free access to water. From PN 35 to 70, all groups had *ad libitum* access to food and water after which animals were killed. A subset of three adult experimental groups were fasted for 48 h and i.p. administered every 12 h with vehicle (veh) or recombinant mouse leptin ($0.1\mu\text{g}/\text{g}$ B.W.), once 48 h elapsed, animals were allowed to eat for 6 h and killed. (B) Weekly measurements of body weight of C, LPF and DPF animals. (C) Food intake data are the weekly average of the daily food consumption from week 4 to 10 of C, LPF and DPF animals. Data are expressed as the mean \pm S.E.M. In grams ($n=22/\text{group}$). One-way ANOVA of repeated measures followed by Tukey's *post hoc* test showed differences between groups, * $P < 0.05$ vs C; * $P < 0.05$ vs DPF.

instructions (ALPCO, Salem, NH, USA); sensitivity: T_3 , 0.2 ng/mL, T_4 , 0.5 µg/dL and insulin, 0.124 ng/mL; inter-assay variability: T_3 , 10.3%, T_4 , 4.5% and insulin, 9.95%; intra-assay variability: T_3 , 9.6%, T_4 , 4.3% and insulin, 5.79%. Corticosterone and leptin serum concentrations were determined using Enzo Life Sciences ELISA kits (Farmingdale, NY, USA); sensitivity: corticosterone, 27 pg/mL and leptin, 67.2 pg/mL; inter-assay variability: corticosterone, 13.1% and leptin, 11%; intra-assay variability: corticosterone, 8.4% and leptin, 8.1%.

In situ hybridization histochemistry analysis (ISH)

Dissected brains were sectioned using a cryostat (Microm HM 525; Carl Zeiss IMT Corporation) at -20°C to obtain 14 µm thick coronal slices including the whole length of the PVN (aPVN: -0.84 to -1.44 mm from bregma, mPVN: -1.44 to -1.92 mm from bregma and cPVN: -1.92 to -2.28 mm from bregma) (Paxinos & Watson 2005). For each PVN subcompartment, three sections per slide per animal were collected and adhered to Superfrost/Plus slides (Fisher Scientific). Sections were fixed with 4% paraformaldehyde at 4°C for 20 min in PBS buffer, digested with pronase (24 U/mL; Calbiochem (Merck Millipore)) at 20°C for 2 min, and air-dried before hybridization. A mixture of oligonucleotide probes complementary to the following base sequences of *proTrh* mRNA (GenBank accession number: NM_013046.2): 85–129, 407–471 and 568–612 and *proCrF* mRNA (GenBank accession number: NM_031019.1): 114–158, 284–328 and 536–580 were labeled by 3'-tailing with [^{35}S] dATP (1250 Ci/mmol; PerkinElmer) using terminal deoxynucleotidyl transferase (Roche Diagnostics GmbH). All oligonucleotide probes were synthesized by the Biotechnology Institute of the UNAM (Cuernavaca, Morelos, Mexico) and were BLAST-tested to evaluate probe's specificity, which was confirmed using rat database. We used non-complementary probes as negative controls, directed against the same *proTrh* mRNA nucleotide sequences as complementary probes (Arechiga-Ceballos *et al.* 2014, Alvarez-Salas *et al.* 2016). Hybridization protocol with oligonucleotide probes has been described previously (de Gortari & Mengod 2010). Briefly, radioactive-labeled probes were diluted in a solution containing 50% formamide, 4× SSC (1× SSC: 150 mM NaCl, 15 mM sodium citrate), Denhardt's solution (0.02% Ficoll, 0.02% polyvinylpyrrolidone, 0.02% BSA), 10% dextran sulfate, 1% sarkosyl, 20 mM

phosphate buffer pH 7.0), 250 µg/mL yeast tRNA and 500 µg/mL salmon sperm DNA, at a final concentration of 1.5–2 pmol. Fixed-tissues were incubated with hybridization solution and coverslipped with Parafilm (Bemis, Oshkosh, WI, USA). Once the incubation time was completed, sections were washed four times in 0.6 M NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) at 60°C during 45 min each time, and once in the same buffer at room temperature. After washings, sections were dipped into Kodak NTB autoradiography emulsion (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA). Autoradiograms were developed with Kodak-D19 developer (Eastman Kodak Company) after a 3-week exposure at 4°C , fixed in Ilford Hypam fixer (Polysciences Inc., Warrington, PA, USA), dehydrated in 70% and 100% ethanol and coverslipped with Entellan (Merck KGaA).

Image analysis

Autoradiograms were visualized with a Leica microscope DM500 (Leica Microsystems Inc.) under dark-field illumination, and images were obtained using a Leica ICC50 W camera and the 10× objective. Images were analyzed by computer measuring integrated optical density (IOD) of PVN signal using Image-Pro Plus 7.0 software (Media Cybernetics, Inc., Rockville, MD, USA). IOD of the background was measured for each image and subtracted from the PVN targets' signal IOD; three sections per PVN subcompartment per animal were analyzed for *proTrh* and for *proCrF*, and only mPVN was used for ISH analysis, with a final $n=4-5$ /group.

Real-time PCR (RT-PCR)

Brains were hand dissected for RT-PCR analysis of ARC mRNAs (*Npy*, the long isoform of the leptin receptor (*Obrb*) and suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3)) and PVN mRNAs (*Trh*, *CrF*, *obrb* and *Socs3*). PVN (-0.84 to -2.28 mm from bregma) and ARC (-2.28 to -3.48 mm from bregma) (Paxinos & Watson 2005) were punch-dissected from frozen tissues using a 1 mm diameter sample corer and treated as described before for extraction of mRNA by guanidine thiocyanate method (Chomczynski & Sacchi 1987). Briefly, 1.5 mg of RNA was retro-transcribed with oligo-dT primer (100 pmol/mL; Biotechnology Institute of the UNAM, Cuernavaca, Morelos, Mexico) and M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen) to obtain cDNA. ARC *Npy*, *Socs3* and *Obrb*, in addition to PVN *proTrh*, *proCrF*, *Obrb* and *Socs3* mRNA levels, were analyzed

Table 1 Weight of adrenal glands and adipose tissue subcompartments.

	C	LPF	DPF
Adrenal glands (g)	0.04 ± 0.003	0.04 ± 0.002	0.04 ± 0.002
BAT (g)	0.27 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.26 ± 0.02
Subcutaneous WAT (g)	1.8 ± 0.2	2.1 ± 0.2	1.9 ± 0.2
Epididymal WAT (g)	3.3 ± 0.3	3.7 ± 0.4	3.6 ± 0.8
Mesenteric WAT (g)	2 ± 0.1	3.2 ± 0.2*	2.5 ± 0.3
Perirenal retroperitoneal WAT (g)	2.4 ± 0.3	4 ± 0.5*	2.8 ± 0.3

Weight of adrenal glands and adipose tissue subcompartments weight of 10-week-old animals subjected to TRF in prepubertal stage. BAT, brown adipose tissue; WAT, white adipose tissue. Data are expressed as the mean ± S.E.M. In grams (adrenal glands, BAT and subcutaneous WAT; n = 22/group; mesenteric, epididyma and perirenal retroperitoneal WAT; n = 6/group). BAT, brown adipose tissue; C, control; DPF, darkness-phase fed animals; LPF, light-phase fed animals; WAT, white adipose tissue. One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test showed differences between groups.

*P < 0.05 vs C.

by RT-PCR using Applied Biosystems reagents and equipment, comprising TaqMan Universal PCR Master Mix, a 7500 real-time PCR system, oligonucleotide primers (*Npy*, Rn014 10145_m1; *Socs3*, Rn00585674_s1, *Lepr*, Rn01433205_m1; *Trh*, Rn00564880_m1; *Crh*, Rn01462137_m1; *Actb*, Rn00667869_m1). The 2^{-ΔΔCt} relative quantification method was used to calculate the fold-change in target mRNA expression, and beta actin was used as housekeeping gene to normalize RT-PCR data.

Statistics

Changes in food intake and body weight between groups along the 10 experimental weeks were analyzed by two-way ANOVA of repeated measures. Weight of adrenal glands and adipose tissue subcompartments, serum hormones' levels, pro*Trh* and pro*Crf* mRNA expression in PVN subdivisions data were analyzed by one-way ANOVA. Two-way ANOVA was performed to compare body weight loss, changes in food intake after refeeding, the weight of their adrenal glands and adipose tissue subcompartments, and their mRNA expression of peptides in hypothalamic PVN and ARC by RT-PCR, between animals treated with veh or leptin i.p. after 48-h fasting. When P < 0.05, we performed Tukey's post hoc test.

Results

Body weight, food intake and adipose tissue weight

Body weight of LPF animals increased 11% from week 5 in comparison with DPF group and 9% and 12% from week 6 when compared with C and DPF groups; such increase was maintained until week 10 of the experi-

ment, reaching a 17% increase at ninth week (Fig. 1B). Two-way ANOVA of repeated measures showed that there was a significant effect of feeding schedule ($F_{(2,736)} = 37.46$, $P < 0.0001$), age ($F_{(7,736)} = 801.54$, $P < 0.0001$) and the interaction between variables ($F_{(14,736)} = 1.71$, $P < 0.05$). In a similar fashion, food intake of LPF group increased an average of 12% along the experiment in comparison with C and DPF animals (Fig. 1C). Two-way ANOVA of repeated measures revealed an effect of feeding schedule ($F_{(2,672)} = 33.69$, $P < 0.0001$) and age ($F_{(6,672)} = 165.11$, $P < 0.0001$).

Adrenal glands, BAT, subcutaneous and epididymal subcompartments of WAT showed no significant differences among groups (Table 1). In contrast, LPF group's mesenteric and perirenal retroperitoneal WAT weight increased to 154% and to 173%, respectively, when compared with C animals (100%) (Table 1; mesenteric: $F_{(2,15)} = 10.019$, $P < 0.01$; perirenal retroperitoneal: $F_{(2,15)} = 5.566$, $P < 0.05$).

Serum hormones' concentration

Although T₄ serum concentration was reduced by 21% in LPF animals compared with C ($F_{(2,30)} = 3.727$, $P < 0.05$), T₃

Table 2 Serum hormones' content.

	C	LPF	DPF
T ₄ (µg/dL)	11.9 ± 0.8	9.3 ± 0.8**	11.5 ± 0.5
T ₃ (ng/dL)	100.6 ± 5.5	107.7 ± 4.1	93.1 ± 3.9
Insulin (ng/mL)	0.6 ± 0.05	0.9 ± 0.08*	0.7 ± 0.04
Corticosterone (ng/mL)	248.3 ± 71.4	667.4 ± 110**	205 ± 81.8
Leptin (pg/mL)	1273.7 ± 124.3	1839.3 ± 211**	1306.3 ± 150.6

Hormones' determinations were performed on serum of 10-week-old animals subjected to TRF in prepubertal stage (PN21–PN35). The number of animals analyzed was n = 6/group. Values are expressed as the mean ± S.E.M. C, control group; DPF, darkness-phase fed group; LPF, light-phase fed group. One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test showed differences between groups. *P < 0.05 vs C; **P < 0.05 vs DPF.

content showed no differences between groups (Table 2). Insulin, corticosterone and leptin serum concentrations had a 1.4-fold, 2.7-fold and 1.4-fold increase, respectively, in LPF animals in comparison with C group and a 3.3-fold corticosterone increase compared with DPF animals (Table 2; insulin: $F_{(2,24)}=5.273$, $P<0.05$; corticosterone: $F_{(2,16)}=8.092$, $P<0.01$; leptin: $F_{(2,45)}=3.660$, $P<0.05$).

proTrh and proCrf mRNA expression in PVN by ISH histochemistry

proTrh mRNA expression from non-hypophysiotropic aPVN neurons showed no significant differences in animals either fed in light or in darkness phase (Fig. 2A, B, C, J). Hypophysiotropic TRHergic neurons of medial and

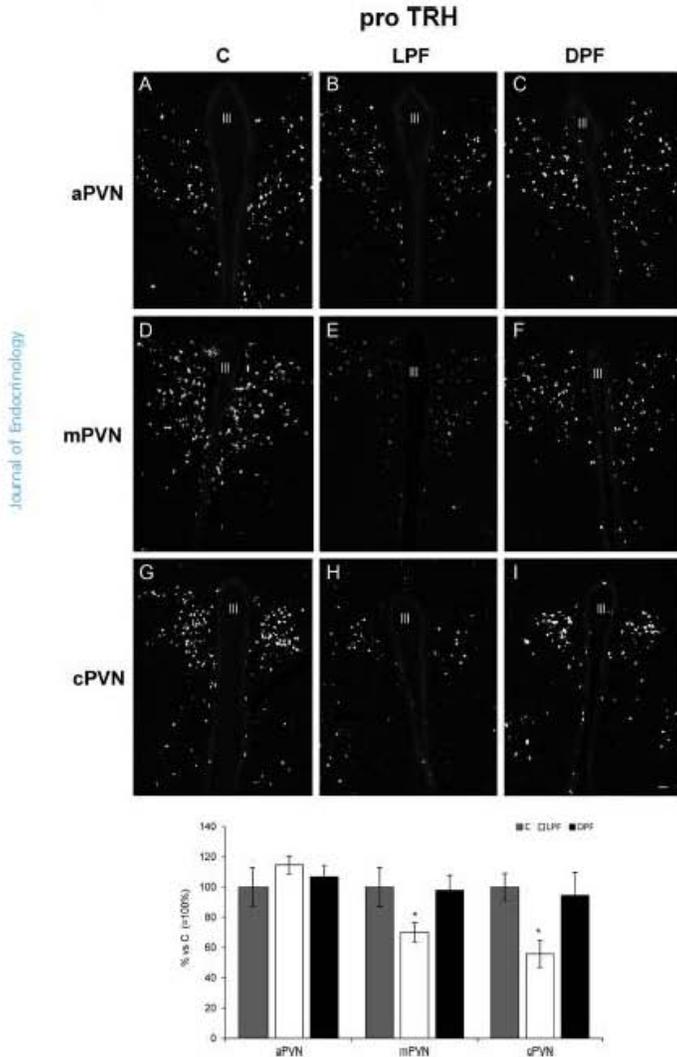


Figure 2 proTrh mRNA expression in PVN subcompartments. (A–I) Low-power 10 \times -magnification dark-field illumination photomicrographs of representative samples of radioactive-labeled proTRH mRNA by ISH of aPVN of C (A), LPF (B) and DPF (C), of mPVN of C (D), LPF (E) and DPF (F), and of cPVN of C (G), LPF (H) and DPF (I) groups. III: third ventricle. Scale bar 50 μ m. (J) Expression of proTRH in PVN subcompartments of C, LPF and DPF animals. Control (C), light-phase feeding (LPF) and darkness-phase feeding (DPF) groups. Data are expressed as the mean \pm s.e.m. of percentage of C values (100%; n=4–5/group). One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test showed differences between groups, * $P<0.05$ vs C; # $P<0.05$ vs DPF.

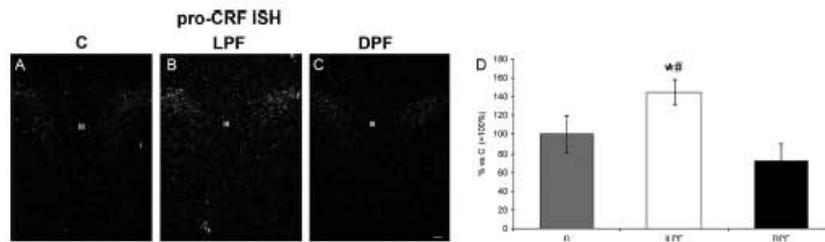


Figure 3 proCRF mRNA expression in PVN. (A–C) Low-power 10× magnification dark-field illumination photomicrographs of representative samples of radioactive-labeled proCRF mRNA by ISH in PVN of C (A), LPF (B) and DPF (C) groups. III: third ventricle. Scale bar 50 μm. (D) Expression of proCRF in PVN of C, LPF and DPF animals. Control (C), light-phase feeding (LPF), darkness-phase feeding (DPF) groups. Data are expressed as the mean ± S.E.M. of percentage of C values (100%; n=4–5/group). One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test showed differences between groups, *P<0.05 vs C; #P<0.05 vs DPF.

caudal PVN direct HPT axis function, and *proThh* mRNA expression was decreased in LPF group to 70% in mPVN ($F_{(2,19)}=4.43, P<0.05$), whereas in cPVN decreased to 56% in comparison with those of C (100%) (Fig. 2D, E, F, G, H, I, J; $F_{(2,18)}=4.969, P<0.05$). *proCrf* mRNA expression increased to 144% in PVN of LPF animals in comparison with that of C (100%) and DPF groups (Fig. 3A, B, C, D; $F_{(2,10)}=6.608, P<0.05$).

Effect of 48-h fasting and leptin administration on body weight and food intake after 6-h of refeeding

As LPF rats showed an increase in body weight, visceral WAT weight and in serum leptin levels, HPT axis should be activated promoting and increased metabolic rate, but instead, hypophysiotropic PVN *proThh* mRNA expression was decreased. We exposed animals of the three groups to a 48-h fasting in addition to veh or leptin i.p. administration and measured hypothalamic feeding-involved neuropeptides' expression as well as, leptin signaling molecules mRNA levels. Fasted animals treated either with veh or leptin decreased their body weight in a similar manner between groups (Fig. 4A); the %Δ in body weight loss was as follows: 6.5%, 9.6% and 7.3% in C-veh, LPF-veh and DPF-veh groups and 8.5%, 8.8% and 8.4% in C-leptin, LPF-leptin and DPF-leptin animals, respectively, compared with their basal body weight before fasting, but no significant differences were found.

After 48 h of fasting and treatment with either veh or leptin, animals were refed for 6 h and their food intake was registered. As expected, data showed that leptin treatment decreased food intake to 78% in C-leptin and

to 84% in DPF-leptin groups when compared with their respective veh groups (100%) (Fig. 4B). On the other hand, LPF-leptin animals ate 84% more than C-leptin animals (Fig. 4B). Two-way ANOVA showed significant differences between groups ($F_{(2,28)}=34.498, P<0.001$) and in the interaction between groups and treatment ($F_{(2,28)}=14.088, P<0.001$). Concerning adrenals and adipose tissue subcompartments weight, we found that in LPF animals, the weight of mesenteric and perirenal retroperitoneal WAT was higher than C animals as stated before (Table 3). The weight of adrenal glands and the rest of adipose tissue subcompartments did not show significant changes between groups or treatment (Table 3). Two-way ANOVA showed differences only between groups in mesenteric WAT ($F_{(2,28)}=4.726, P<0.05$) and perirenal retroperitoneal WAT ($F_{(2,28)}=4.075, P<0.05$), but not in treatment or in the interaction of variables.

Effect of 48-h fasting and leptin administration on hypothalamic mRNA peptides expression

Arcuate nucleus LPF animals administered with veh showed the reported ARC response to a metabolic challenge such as fasting; we found that *Npy* mRNA expression in LPF group was increased to 177% to that of C- and DPF-veh animals. *Npy* mRNA increase could be implicated in the higher chow consumption as well as in the higher body weight that LPF rats presented (Fig. 5A). As expected, leptin administration decreased *Npy* mRNA expression in C and DPF animals to 56% and 65%, respectively. In contrast, *Npy* mRNA content of LPF group administered with leptin did not change compared with LPF-veh (Fig. 5A). Two-way ANOVA

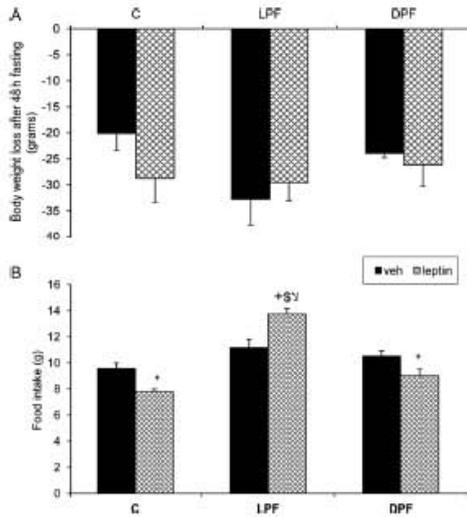


Figure 4 Body weight loss and food intake of adult C, LPF and DPF fasted animals administered i.p. with veh or leptin. (A) Body weight loss before 48-h fasting of ten-week-old C, LPF and DPF groups administered with veh or recombinant mouse leptin (0.1 µg/g B.W.). Values are expressed as the mean ± s.e.m. of grams of body weight loss (n = 5–6/group). (B) Food intake of C, LPF and DPF 48-h fasted groups administered with veh or recombinant mouse leptin (0.1 µg/g B.W.), allowed to fed for 6 h after fasting. Values are expressed as the mean ± s.e.m. of grams of food consumed (n = 5–6/group). Two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test showed differences between groups. *P < 0.05 vs their respective veh groups; [†]P < 0.05 vs C-leptin; [‡]P < 0.05 vs DPF-leptin.

indicated that differences were within groups ($F_{(2,23)} = 10.790$, $P < 0.001$) and treatment ($F_{(1,23)} = 6.490$, $P < 0.05$), but there was no interaction.

Impairment of leptin signaling was revealed by a 205% increase of *Socs3* mRNA content in LPF-veh

animals when compared with C-veh mRNA expression (100%: Fig. 5B), which might be associated with the increased expression of *Npy* in the same group (Fig. 5A). Peripheral administration of leptin increased *Socs3* expression in C and DPF groups, but not in LPF animals, which maintained the same increase as veh-administered animals (Fig. 5B), revealing an impairment in leptin signaling in the ARC neurons of LPF animals. Two-way ANOVA showed a significant effect of group ($F_{(2,24)} = 3.879$, $P < 0.05$) and treatment ($F_{(1,24)} = 6.590$, $P < 0.05$), and no significant differences in the interaction of the variables. Additionally, as expected *Obrb* mRNA levels increase in all groups in response to fasting and leptin administration, but no differences in expression between fasted groups (Fig. 5C).

Paraventricular nucleus Despite veh-administered animals were under a 48-h fasting challenge, *proTrh* mRNA levels in LPF group showed a more pronounced tendency to decrease than C and DPF animals (Fig. 5D). Interestingly, leptin administration did not increase *proTrh* expression in LPF as it did in C and DPF groups compared with their veh-administered counterparts (Fig. 5D). Two-way ANOVA showed a significant effect of group ($F_{(2,28)} = 19.992$, $P < 0.001$), treatment ($F_{(1,28)} = 9.813$, $P < 0.01$) and the interaction of the variables ($F_{(2,28)} = 4.418$, $P < 0.05$). As expected, *proCrf* expression diminished in C- (18%) and DPF-veh (47%) vs C-fed groups (100%); a reduction not seen in LPF-veh animals whose *proCrf* mRNA levels increased to 181% (Fig. 5E). Leptin administration restored *proCrf* mRNA content to C-fed levels in C- (104%) and DPF-leptin (109%) animals, but in LPF-leptin group, it did not increase beyond LPF-veh *proCrf* expression (168%) (Fig. 5E). Two-way ANOVA showed effect of group ($F_{(2,22)} = 4.990$, $P < 0.01$). Furthermore, *Obrb* and

Table 3 Effect of 48-h fasting and leptin treatment in weight of adrenals and adipose tissue subcompartments.

	Fasted + Vehicle			Fasted + Leptin		
	C	LPF	DPF	C	LPF	DPF
Adrenal glands (g)	0.07 ± 0.004	0.06 ± 0.005	0.06 ± 0.005	0.06 ± 0.005	0.06 ± 0.007	0.06 ± 0.003
BAT (g)	0.26 ± 0.02	0.24 ± 0.02	0.27 ± 0.04	0.28 ± 0.02	0.26 ± 0.03	0.25 ± 0.04
Subcutaneous WAT (g)	2.7 ± 0.1	3.2 ± 0.5	3 ± 0.5	2.7 ± 0.6	3.1 ± 0.2	3.4 ± 0.5
Epididymal WAT (g)	3.5 ± 0.2	3.7 ± 0.4	3.6 ± 0.8	4.1 ± 0.03	3.8 ± 0.5	3.7 ± 0.4
Mesenteric WAT (g)	2 ± 0.1	3.2 ± 0.2*	2.5 ± 0.3	2.2 ± 0.2	3.1 ± 0.3 [†]	2.9 ± 0.6
Perirenal retroperitoneal WAT (g)	2.4 ± 0.4	4.1 ± 0.5*	2.8 ± 0.3	2.5 ± 0.2	3.2 ± 0.3 [‡]	3 ± 0.6

Weight of adrenal glands and adipose tissue subcompartments of 10-week-old animals subjected to TRF in prepuberal stage that were challenged with a 48-h fasting with i.p. administration of veh or recombinant mouse leptin (0.1 µg/g B.W.) twice a day during the 48 h of fasting. After that, animals were allowed to eat for 6 h and then killed, and adrenal glands and adipose tissue subcompartments were dissected and weighted. Values are the mean ± s.e.m. in grams, n = 5–6/group. BAT, brown adipose tissue; C, control group; DPF, darkness-phase fed group; LPF, light-phase fed group; WAT, white adipose tissue. Two-way ANOVA followed by Tukey's test when $P < 0.05$ was performed, *P < 0.05 vs C-veh, [†]P < 0.05 vs C-leptin.

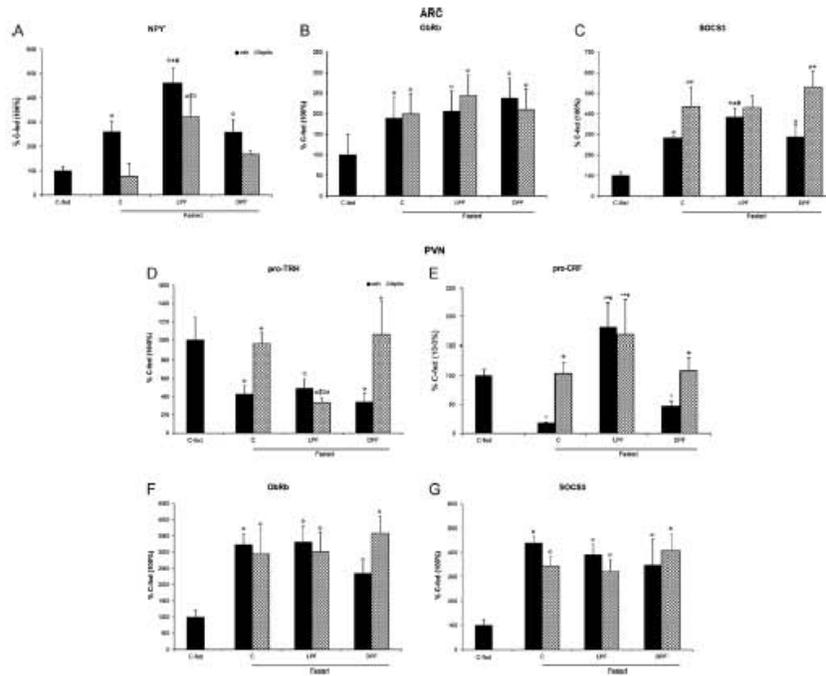


Figure 5 Hypothalamic ARC and PVN peptides' expression of fasted C, LPF and DPF adult animals administered with veh or recombinant mouse leptin (0.1 µg/g B.W.). Data are mRNA expression by real-time PCR of each studied amplicon after being normalized against actin mRNA expression by the 2^{-ΔΔCt} relative quantization method. ARC NPY (A), OBRb (B), SOCS3 (C) and PVN proTRH (D), proCRF (E) OBRb (F) and SOCS3 (G) were examined. Values are expressed as the mean ± S.E.M. of percentage of C-fed values (100%; n = 5–6/group). Two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test showed differences between groups. *P < 0.05 vs C-fed; *P < 0.05 vs their respective veh groups; *P < 0.05 vs C-veh; *P < 0.05 vs DPF-veh; *P < 0.05 vs C-leptin, *P < 0.05 vs DPF-leptin.

Socs3 mRNA expression in PVN was not altered neither by treatment nor by group (Fig. 5E, G).

Discussion

Prepuberty is a critical window of neuronal development, susceptible to serum hormones' levels fluctuations, modifying the response of different hypothalamic networks to a positive energy balance, as a consequence of alterations in feeding patterns. Such alterations can lead to an impaired activity of feeding-regulatory signals and consequently to hyperphagia and overweight that might last until adulthood. Altering feeding patterns during prepuberty could impair hypothalamic neuronal development, and consequently, feeding regulation.

Therefore, we studied the effect of a time-restricted feeding schedule during prepuberal stage on adult animals' food intake, body weight and expression of hypothalamic peptides involved in regulation of energy homeostasis by controlling HPA and HPT axis function.

Two hours before lights are off, *ad libitum*-fed animals, present locomotion activation (food anticipatory activity (FAA)) along with increased serum GC content and ARC *Npy* mRNA facilitating food intake consumption. Afterwards, a counter-regulatory stimulation of anorexigenic signals is presented; after a meal, animals show high insulin and leptin serum content, as well as, ARC *Pomc* mRNA levels. This shift from anabolic to catabolic pathways allows the energy homeostasis and regulation of body weight. Thus, uncoupling the moment of food presentation from

Journal of Endocrinology

the light/darkness cycle by shifting food availability to the resting (light) phase, alters the energy expenditure relation with food intake. When animals are subjected to a tRF, the onset of FAA and activation of orexigenic pathways are changed toward the moment of food presentation, which uncouples central and peripheral clocks; thus, feeding in the light phase induces leptin and insulin release in an unusual circadian time, with a consequent activation of brain peptides' synthesis that leads to an aberrant control of energy homeostasis.

Prepuberal darkness-phase feeding, which had a short delay in the offering of food in relation to the start of the darkness period (food available at 2300 instead of 1900h) showed no changes in any of the evaluated parameters when compared with controls. This suggested that the DPF schedule during prepuberty did not change their food intake and allowed them to adapt to the subsequent 24-h *ad libitum* food intake schedule up to adulthood. As their tRF was limited in the darkness phase, FAA and the orexigenic pathways seemed to peak at a similar moment of the day than that of *C. ad libitum*-fed animals during prepuberty, which was evinced by their unchanged food intake and body weight throughout their lifespan.

In contrast, shifting the feeding schedule to the light phase during prepuberty, produced hyperphagia and overweight in LPF group, which seemed associated to their HPA axis hyperactivity, as has been described before in early-stage stressed adult animals and humans (Dallman *et al.* 2003, La Fleur *et al.* 2004); our results implied that prepuberal light phase feeding could be acting as a chronic stressor. Impaired regulation of the HPA axis was evinced by the increased PVN *Crf* mRNA, along with a higher GC concentration, which seemed to show a blocked negative feedback of GC into the PVN.

The higher GC content could be related to food intake stimulation of LPF because the i.p. injection of the synthetic GC dexamethasone (DEX), increases the orexigenic effects of factors and pathways, such as those of ARC NPY/AgRP (Shimizu *et al.* 2008) and AMPK, respectively (Savontaus *et al.* 2002, Konno *et al.* 2008, Shimizu *et al.* 2008). In fact, the AMPK pathway has been involved in regulation of both circadian and metabolic-induced genes' expression (Lopez *et al.* 2008, Lamia *et al.* 2009, de Andrade *et al.* 2015); thus, its function might be relevant for LPF-related metabolic and neuroendocrine alterations, and it would be interesting to study its role in LPF impairments. This could be possible as before the presentation of a meal regardless of the light/darkness period, NPY is released into the PVN, and the serum GC content increases

(Honma *et al.* 1983, Kalra *et al.* 1991), suggesting that the chronic elevation in GC of light-phase feeding schedule, caused their hyperphagia through activating ARC NPY pathway.

The sustained high GC levels also seemed responsible for the increased visceral WAT depots of LPF animals (Rebuffe-Scrive *et al.* 1992, Campbell *et al.* 2011). This is supported by the activation of lipogenic genes in visceral fat pads and the differentiation of pre-adipocytes to adipocytes (Zilberfarb *et al.* 2001) by peripheral DEX administration (Marin *et al.* 1992, Chimin *et al.* 2014). This is also supported by the fact that in Cushing's disease, energy deposits are mainly accumulated in visceral adipose tissue (Geer *et al.* 2010) and that salivary GC concentration is positively associated with visceral adiposity (Epel 2009).

The high GC serum content induced by the prepuberal light-phase feeding could reduce neuronal sensitivity to leptin and insulin effects in this group (Zakrzewska *et al.* 1997, Asensio *et al.* 2004). Therefore, we aimed to study an impaired leptin's signaling and its effects on ARC *Npy* and PVN *Trh* mRNAs expression to explain hyperphagia of LPF animals despite their hyperleptinemia.

In this study, light phase feeding induced a dysfunction of HPT axis as T_4 concentration decreased in LPF animals, which hampered T_3 to increase as expected. Previous reports show that obese patients present an enhanced HPT axis activity that is evinced by their higher T_3 serum levels (Reinehr 2010), whereas rodents had higher PVN *Trh* mRNA expression and circulating T_3 (Perello *et al.* 2010, Franco *et al.* 2012). Those changes promote higher energy expenditure. In contrast, our results showed that light phase feeding during prepuberty did not increase HPT axis function.

Furthermore, *Trh* mRNA levels decreased in hypophysiotropic neurons of mPVN and cPVN in LPF group, despite their overweight and hyperleptinemia that should enhance TRH transcription (Legradi *et al.* 1997). The aforementioned results are in accordance to those of overweight early-overfed animals, whose *Trh* expression in hypophysiotropic neurons of mPVN is also decreased (Arechiga-Ceballos *et al.* 2014). This lack of adaptation might decrease rats' metabolic rate, promoting excessive energy storage as adipose tissue. The decreased expression of hypophysiotropic *Trh* could be the result of enhanced levels of GC, which repress peptide's transcription through a glucocorticoid-responsive element on TRH gene's promoter (Kakucska *et al.* 1995, Lee *et al.* 1996). Additional experiments would be relevant to explore this idea.

We expected that the expression of *Tth* from feeding regulating-involved neurons of the aPVN subcompartment were increased in LPF animals, given the known anorexigenic actions of the synthesized TRH in that PVN subregion (Wittmann *et al.* 2009, Alvarez-Salas *et al.* 2012). As *Tth* mRNA levels did not change despite of the positive energy balance in LPF rats, it is likely that they had an impaired adaptation to their high lipids deposits, contributing to the display of their hyperphagia.

As feeding in light-phase during prepuberty promoted hyperphagia despite the hyperleptinemia, we hypothesized that prepuberal light-phase feeding could result in leptin resistance, which besides was supported by the blunted *Tth* expression, which should be upregulated by leptin. To test our hypothesis, we injected i.p. vehicle or leptin to 48-h fasted ten-week-old animals of all groups. Our rationale was that since after fasting, the low leptin levels are responsible for the decreased PVN *Tth* mRNA content and for the high ARC NPY expression (Marks *et al.* 1992, Legradi *et al.* 1997). Leptin administration should be able to reverse those changes in fasted animals if its signaling is properly functional.

Fasting induced the expected loss in body weight and adipose tissue depots in all groups. Also, we observed the expected PVN *Tth* and *Crf* expression decrease, as well as the upregulation in ARC *Npy*, PVN and ARC *Obrb* and *Socs3* mRNA content (Mitchell *et al.* 2009, Arechiga-Ceballos *et al.* 2014). It was noteworthy that LPF-veh-fasted group had a further increase in ARC *Npy* and *Socs3* than in fasted DPF-veh and control-veh. SOCS3 is a protein that inhibits the signal transduction of leptin; thus, its chronic increment is considered as indicative of hormone's resistance (Bjorbaek *et al.* 1998). Therefore, our results supported an impaired ARC signaling of leptin due to feed prepuberal animals during the light period. We corroborated this with the leptin administration to light-phase-fed prepuberal animals that were fasted in adulthood, whose ARC *Npy* expression did not decrease, and PVN *Tth* mRNA levels did not increase as expected by hormone's effects.

PVN *Tth* expression is known to be upregulated by leptin through two different pathways. The direct one is due to leptin's action on *Obrb* signaling in the PVN that upregulates *Tth* transcription. The indirect one involves leptin effects on ARC *Npy* and alpha *Msh* expression and release. This allows PVN TRH synthesis to be activated because NPY exerts negative actions on its synthesis and alpha MSH enhances it (Fekete *et al.* 2002, Sarkar *et al.* 2002).

We here evinced that light-phase feeding during prepuberty impaired central leptin actions: ARC *Npy* expression did not decrease, and we observed a sustained elevation of that of *Socs3*. Leptin signaling in the PVN seemed functional as *Socs3* was similarly changed to that of DPF and controls. We thus assumed that the lack of increase in PVN *Tth* mRNA levels after leptin administration in LPF rats was due to their impaired leptin-induced downregulation of *Npy* in the ARC. This could be responsible for their hyperphagia and overweight, as well as for the lack of adaptation of the HPT axis to their positive energy balance. It is likely that leptin resistance was related to the high GC circulating levels, as has been described (Dallman *et al.* 2004).

Finally, we confirmed an impairment of leptin signaling as well as HPA axis hyperactivity by the high *proCrf* expression in LPF-veh fasted group and by the lack of a further increase in LPF-leptin rats.

In conclusion, prepuberal animals subjected to rF during light phase showed impairment in energy homeostasis regulatory mechanisms that persisted until adulthood. Their overweight and hyperphagia could be the result of leptin resistance in the ARC.

Our results support that eating habits and regular feeding patterns in the activity phase in childhood may assure an adequate programming of the neuroendocrine axes function by the rest/activity cycle-induced release of peripheral hormones that coordinate energy homeostasis avoiding metabolic alterations later in life.

Declaration of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Funding

This work was supported by Conacyt grant CB2010/128316 (P.G.).

Acknowledgements

The authors wish to thank J.L. Calderón and R. Cardoso for their help with illustrations.

References

- Ahima RS, Kelly J, Elmquist JK & Flier JS 1999 Distinct physiologic and neuronal responses to decreased leptin and mild hyperleptinemia. *Endocrinology* **140** 4923–4931. (doi:10.1210/en.140.11.4923)
- Ahima RS, Prabakaran D & Flier JS 1998 Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. Implications for energy homeostasis and neuroendocrine function. *Journal of Clinical Investigation* **101** 1020–1027. (doi:10.1172/JCI1176)

- Al-Naimi S, Hampton SM, Richard P, Tzong C & Morgan LM 2004 Postprandial metabolic profiles following meals and snacks eaten during simulated night and day shift work. *Chronobiology International* **21** 937–947. (doi:10.1081/CBI-200037171)
- Alvarez-Salas E, Aceves C, Anguiano B, Uribe R, Garcia-Luna C, Sánchez E & de Goertari P 2012 Food-restricted and dehydrated-induced anorexic rats present differential TRH expression in anterior and caudal PVN. Role of type 2 deiodinase and pyroglutamate aminopeptidase II. *Endocrinology* **153** 4067–4076. (doi:10.1210/en.2011-2011)
- Alvarez-Salas E, Mengod G, Garcia-Luna C, Soberanes-Chavez P, Matamoros-Trejo G & de GP 2016 Mct8 and trh co-expression throughout the hypothalamic paraventricular nucleus is modified by dehydration-induced anorexia in rats. *Neuropeptides* **56** 33–40. (doi:10.1016/j.npep.2015.11.001)
- Amani R & Gill T 2013 Shiftworking, nutrition and obesity: implications for workforce health – a systematic review. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* **22** 505–515. (doi:10.6133/apjcn.2013.22.4.11)
- Antunas LC, Lavandowski R, Dantas G, Caumo W & Hidalgo MP 2010 Obesity and shift work: chronobiological aspects. *Nutrition Research Reviews* **23** 155–168. (doi:10.1017/S0954422410000016)
- Arechiga-Ceballos F, Alvarez-Salas E, Matamoros-Trejo G, Amaya MI, Garcia-Luna C & de GP 2014 Pro-TRH and pro-CRF expression in paraventricular nucleus of small litter-reared fasted adult rats. *Journal of Endocrinology* **221** 77–88. (doi:10.1530/JOE-13-0458)
- Asensio C, Muzzin P & Rohner-Jeanrenaud F 2004 Role of glucocorticoids in the physiopathology of excessive fat deposition and insulin resistance. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* **28** (Supplement 4) S45–S52. (doi:10.1038/sj.ijo.0802856)
- Baquero AJ, de Solís AJ, Lindsley SR, Kirighi MA, Smith MS, Crowley MA, Zeltser LM & Grove KL 2014 Developmental switch of leptin signaling in arcuate nucleus neurons. *Journal of Neuroscience* **34** 9982–9994. (doi:10.1523/JNEUROSCI.0933-14.2014)
- Bjorbaek C, Elmquist JK, Frantz JD, Shoelson SE & Flier JS 1998 Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Molecular Cell* **1** 619–625. (doi:10.1016/S1097-2765(00)80062-3)
- Bjorntorp P 2001 Do stress reactions cause abdominal obesity and comorbidities? *Obesity Reviews* **2** 73–86. (doi:10.1046/j.1467-789x.2001.00027.x)
- Bodoli B, Gardi J, Hajdu I, Szentirmai E, Obal F Jr & Krueger JM 2004 Rhythms of ghrelin, leptin, and sleep in rats: effects of the normal diurnal cycle, restricted feeding, and sleep deprivation. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **287** R1071–R1079. (doi:10.1152/ajpregu.00294.2004)
- Bojanowska E & Nowak A 2007 Interactions between leptin and exendin-4, a glucagon-like peptide-1 agonist, in the regulation of food intake in the rat. *Journal of Physiology and Pharmacology* **58** 349–360.
- Bouret SG, Draper SJ & Simerly RB 2004 Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science* **304** 108–110. (doi:10.1126/science.1095004)
- Bray MS, Rascliffe WF, Grenett MH, Brewer RA, Gamble KL & Young ME 2013 Quantitative analysis of light-phase restricted feeding reveals metabolic dyssynchrony in mice. *International Journal of Obesity* **37** 843–852. (doi:10.1038/ijo.2012.137)
- Campbell JE, Peckett AJ, D'Souza AM, Hawke TJ & Riddell MC 2011 Adipogenic and lipolytic effects of chronic glucocorticoid exposure. *American Journal of Physiology: Cell Physiology* **300** C198–C209. (doi:10.1152/ajpcell.00045.2010)
- Cheung CC, Clifton DK & Steiner RA 1997 Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology* **138** 4489–4492. (doi:10.1210/endo.138.10.5570)
- Chimin P, Farias TS, Torres-Leal FL, Bolsoni-Lopes A, Campana AB, Andreotti S & Lima FB 2014 Chronic glucocorticoid treatment enhances lipogenic activity in visceral adipocytes of male Wistar rats. *Acta Physiologica* **211** 409–420. (doi:10.1111/apha.12226)
- Chomczynski P & Sacchi N 1987 Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* **162** 156–159. (doi:10.1016/0003-2697(87)90021-2)
- Cone RD, Cowley MA, Butler AA, Fan W, Marks DL & Low MJ 2001 The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* **25** (Supplement 5) S63–S67. (doi:10.1038/sj.ijo.0801913)
- Dallman MF, Akana SF, Strack AM, Scribner KS, Pecoraro N, La Fleur SE, Houshyar H & Gomez F 2004 Chronic stress-induced effects of corticosterone on brain: direct and indirect. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1018** 141–150. (doi:10.1196/annals.1296.017)
- Dallman MF, Pecoraro N, Akana SF, La Fleur SE, Gomez F, Houshyar H, Bell ME, Bhatnagar S, Laugero KD & Manalo S 2003 Chronic stress and obesity: a new view of 'comfort food'. *PNAS* **100** 11696–11701. (doi:10.1073/pnas.1934666100)
- de Andrade IS, Zemdegs JC, de Souza AP, Watanabe RL, Telles MM, Nascimento CM, Oyama LM & Ribeiro EB 2015 Diet induced obesity impairs hypothalamic glucose sensing but not glucose hypothalamic extracellular levels, as measured by microdialysis. *Nutrition and Diabetes* **5** 1–8. (doi:10.1038/nutd.2015.12)
- De Boer SF & Van der Gugten J 1987 Daily variations in plasma noradrenaline, adrenaline and corticosterone concentrations in rats. *Physiology and Behavior* **40** 323–328. (doi:10.1016/0031-9384(87)90054-0)
- de Goertari P & Mengod G 2010 Dopamine D1, D2 and mu-opioid receptors are co-expressed with adenylyl cyclase 5 and phosphodiesterase 7B mRNAs in striatal rat cells. *Brain Research* **1310** 37–45. (doi:10.1016/j.brainres.2009.11.009)
- Elias CF, Aschkenasi C, Lee C, Kelly J, Ahima RS, Bjorbaek C, Flier JS, Saper CB & Elmquist JK 1999 Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron* **23** 775–786. (doi:10.1016/S0896-6273(01)80035-0)
- Epel ES 2009 Psychological and metabolic stress: a recipe for accelerated cellular aging? *Hormones* **8** 7–22. (doi:10.14310/horm.2002.1217)
- Fekete C, Sarkar S, Rand WM, Harney JW, Emerson CH, Bianco AC, Beck-Sickinger A & Lechan RM 2002 Neuropeptide Y1 and Y5 receptors mediate the effects of neuropeptide Y on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Endocrinology* **143** 4513–4519. (doi:10.1210/en.2002-220574)
- Fekete C, Singru PS, Sanchez E, Sarkar S, Christoffolete MA, Riberio RS, Rand WM, Emerson CH, Bianco AC & Lechan RM 2006 Differential effects of central leptin, insulin, or glucose administration during fasting on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis and feeding-related neurons in the arcuate nucleus. *Endocrinology* **147** 520–529. (doi:10.1210/en.2005-0956)
- Flegal KM, Kruszon-Moran D, Carroll MD, Fryar CD & Ogden CL 2016 Trends in obesity among adults in the United States, 2005 to 2014. *JAMA* **315** 2284–2291. (doi:10.1001/jama.2016.6458)
- Franco JG, Fernandes TP, Rocha CP, Calvino C, Pazos-Moura CC, Lisboa PC, Moura EG & Trevenzoli IH 2012 Maternal high-fat diet induces obesity and adrenal and thyroid dysfunction in male rat offspring at weaning. *Journal of Physiology* **590** 5503–5518. (doi:10.1113/jphysiol.2012.240655)
- Geer EB, Shen W, Gallagher D, Punyanitya M, Looker HC, Post KD & Freda PU 2010 MRI assessment of lean and adipose tissue distribution in female patients with Cushing's disease. *Clinical Endocrinology* **73** 469–475. (doi:10.1111/j.1365-2265.2010.03829.x)
- Gill S & Panda S 2015 A smartphone app reveals erratic diurnal eating patterns in humans that can be modulated for health benefits. *Cell Metabolism* **22** 789–798. (doi:10.1016/j.cmet.2015.09.005)
- Haori M, Vollmers C, Zarrinpar A, DiTacchio L, Bushong EA, Gill S, Leblanc M, Chaix A, Joens M, Fitzpatrick JA, et al. 2012 Time-restricted feeding without reducing caloric intake prevents metabolic diseases in mice fed a high-fat diet. *Cell Metabolism* **15** 848–860. (doi:10.1016/j.cmet.2012.04.019)

- Honma KJ, Honma S & Hiroshige T 1983 Critical role of food amount for prefeeding corticosterone peak in rats. *American Journal of Physiology* **245** R339–R344.
- Imai E, Stromstedt PE, Quinn PG, Carlstedt-Duke J, Gustafsson JA & Granner DK 1990 Characterization of a complex glucocorticoid response unit in the phosphoenolpyruvate carboxylase gene. *Molecular and Cellular Biology* **10** 4712–4719. (doi:10.1128/MCB.10.9.4712)
- Jordan D, Rousset B, Perrin F, Fournier M & Orgiazzi J 1980 Evidence for circadian variations in serum thyrotropin, 3,5,3'-triiodothyronine and thyroxine in the rat. *Endocrinology* **107** 1245–1248. (doi:10.1210/endo-107-4-1245)
- Kakuska I, Qi Y & Lechan RM 1995 Changes in adrenal status affect hypothalamic thyrotropin-releasing hormone gene expression in parallel with corticotropin-releasing hormone. *Endocrinology* **136** 2795–2802. (doi:10.1210/en.136.7.2795)
- Kalra SP, Dube MG, Sahu A, Phelps CP & Kalra PS 1991 Neuropeptide Y secretion increases in the paraventricular nucleus in association with increased appetite for food. *PNAS* **88** 10931–10935. (doi:10.1073/pnas.88.23.10931)
- Konno J, Yoshida S, Ina A, Ohmomo H, Shutoh F, Nogami H & Hisano S 2008 Upregulated expression of neuropeptide Y in hypothalamic-pituitary system of rats by chronic dexamethasone administration. *Neuroscience Research* **60** 259–265. (doi:10.1016/j.neures.2007.11.005)
- Kow LM and Pfaff DW 1991 The effects of the TRH metabolite cyclo(His-Pro) and its analogs on feeding. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* **38** 359–364. (doi:10.1016/0091-3057(91)90291-9)
- La Fleur SE, Akana SF, Manalo SL & Dallman MF 2004 Interaction between corticosterone and insulin in obesity: regulation of food intake and fat stores. *Endocrinology* **145** 2174–2185. (doi:10.1210/en.2003-1359)
- La Fleur SE, Kalsbeek A, Wortel J & Buijs RM 1999 A suprachiasmatic nucleus generated rhythm in basal glucose concentrations. *Journal of Neuroendocrinology* **11** 643–652. (doi:10.1046/j.1365-2826.1999.00373.x)
- Lamia KA, Sachdeva UM, DiTacchio L, Williams EC, Alvarez JG, Egan DE, Vasquez DS, Juguilon H, Panda S, Shaw RJ, et al. 2009 AMPK regulates the circadian clock by cryptochrome phosphorylation and degradation. *Science* **326** 437–440. (doi:10.1126/science.1172156)
- Lanni A, Moreno M, Lombardi A & Goglia F 2003 Thyroid hormone and uncoupling proteins. *FEBS Letters* **543** 5–10. (doi:10.1016/S0014-5793(03)00320-X)
- Lee GC, Yang IM, Kim BJ, Woo JT, Kim SW, Kim JW, Kim YS & Choi YK 1996 Identification of glucocorticoid response element of the rat TRH gene. *Korean Journal of Internal Medicine* **11** 138–144. (doi:10.3904/kjim.1996.11.2.138)
- Legrati G, Emerson CH, Ahima RS, Flier JS & Lechan RM 1997 Leptin prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* **138** 2569–2576. (doi:10.3904/kjim.1996.11.2.138)
- Legrati G & Lechan RM 1998 The arcuate nucleus is the major source for neuropeptide Y-innervation of thyrotropin-releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* **139** 3262–3270. (doi:10.1210/en.139.7.3262)
- Lin B, Morris DW & Chou JY 1998 Hepatocyte nuclear factor 1alpha is an accessory factor required for activation of glucose-6-phosphatase gene transcription by glucocorticoids. *DNA and Cell Biology* **17** 967–974. (doi:10.1089/dna.1998.17.967)
- Lopez M, Lage R, Saha AK, Perez-Tilve D, Vazquez MJ, Varela L, Sangiao-Alvarellos S, Tovar S, Raghay K, Rodriguez-Cuenca S, et al. 2008 Hypothalamic fatty acid metabolism mediates the orexigenic action of ghrelin. *Cell Metabolism* **7** 389–399. (doi:10.1016/j.cmet.2008.03.006)
- Marin P, Darin N, Amemiya T, Andersson B, Jern S & Bjorntorp P 1992 Cortisol secretion in relation to body fat distribution in obese premenopausal women. *Metabolism* **41** 882–886. (doi:10.1016/0026-0495(92)90171-6)
- Marks JL, Li M, Schwartz M, Porte D Jr & Baskin DG 1992 Effect of fasting on regional levels of neuropeptide Y mRNA and insulin receptors in the rat hypothalamus: An autoradiographic study. *Molecular and Cellular Neuroscience* **3** 199–205. (doi:10.1016/1044-7431(92)90039-5)
- Mistry AM, Swick A & Romsos DR 1999 Leptin alters metabolic rates before acquisition of its anorectic effect in developing neonatal mice. *American Journal of Physiology* **277** R742–R747.
- Mitchell SE, Nogueiras R, Morris A, Tovar S, Grant C, Cruickshank M, Rayner DV, Dieguez C & Williams LM 2009 Leptin receptor gene expression and number in the brain are regulated by leptin level and nutritional status. *Journal of Physiology* **587** 3573–3585. (doi:10.1113/jphysiol.2009.173328)
- Morley JE & Levine AS 1980 Thyrotropin releasing hormone (TRH) suppresses stress induced eating. *Life Sciences* **27** 269–274. (doi:10.1016/0024-3205(80)90147-2)
- Mullur R, Liu YY & Brent GA 2014 Thyroid hormone regulation of metabolism. *Physiological Reviews* **94** 355–382. (doi:10.1152/physrev.00030.2013)
- Ogden CL, Carroll MD, Lawman HG, Fryar CD, Kruszon-Moran D, Kit BK & Flegal KM 2016 Trends in obesity prevalence among children and adolescents in the United States, 1988–1994 through 2013–2014. *JAMA* **315** 2292–2299. (doi:10.1001/jama.2016.6361)
- Paxinos G & Watson C 2005 *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, edn 5th. Burlington, MA, USA: Elsevier.
- Perello M, Cakir I, Cyr NE, Romero A, Stuart RC, Chiappini F, Hollenberg AN & Nillni EA 2010 Maintenance of the thyroid axis during diet-induced obesity in rodents is controlled at the central level. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism* **299** E976–E989. (doi:10.1152/ajpendo.00448.2010)
- Qin LQ, Li J, Wang Y, Wang J, Xu JY & Kaneko T 2003 The effects of nocturnal life on endocrine circadian patterns in healthy adults. *Life Sciences* **73** 2467–2475. (doi:10.1016/S0024-3205(03)00628-3)
- Rebuffe-Scrive M, Walsh UA, McEwen B & Rodin J 1992 Effect of chronic stress and exogenous glucocorticoids on regional fat distribution and metabolism. *Physiology and Behavior* **52** 583–590. (doi:10.1016/0031-9384(92)90351-2)
- Reinehr T 2010 Obesity and thyroid function. *Molecular and Cellular Endocrinology* **316** 165–171. (doi:10.1016/j.mce.2009.06.005)
- Rohner-Jeanrenaud F, Walker CD, Greco-Perotto R & Jeanrenaud B 1989 Central corticotropin-releasing factor administration prevents the excessive body weight gain of genetically obese (fa/fa) rats. *Endocrinology* **124** 733–739. (doi:10.1210/endo-124-2-733)
- Ruiter M, La Fleur SE, Van HC, van der V, Kalsbeek A & Buijs RM 2003 The daily rhythm in plasma glucagon concentrations in the rat is modulated by the biological clock and by feeding behavior. *Diabetes* **52** 1709–1715. (doi:10.2337/diabetes.52.7.1709)
- Salgado-Delegado R, Nadia S, Angeles-Castellanos M, Buijs RM & Escobar C 2010 In a rat model of night work, activity during the normal resting phase produces desynchrony in the hypothalamus. *Journal of Biological Rhythms* **25** 421–431. (doi:10.1177/0748730410383403)
- Sarkar S, Legrati G & Lechan RM 2002 Intracerebroventricular administration of alpha-melanocyte stimulating hormone increases phosphorylation of CREB in TRH- and CRH-producing neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Research* **945** 50–59. (doi:10.1016/S0006-8993(02)02619-7)
- Savontaus E, Corwell JM & Wardlaw SL 2002 Effects of adrenalectomy on AGRP, POMC, NPY and CART gene expression in the basal hypothalamus of fed and fasted rats. *Brain Research* **958** 130–138. (doi:10.1016/S0006-8993(02)03674-0)
- Schmoll D, Allan BB & Burchell A 1996 Cloning and sequencing of the 5' region of the human glucose-6-phosphatase gene: transcriptional

- regulation by cAMP, insulin and glucocorticoids in H4IIE hepatoma cells. *FEBS Letters* **383** 63–66. (doi:10.1016/0014-5793(96)00224-4)
- Shimizu H, Arima H, Watanabe M, Goto M, Banno R, Sato I, Ozaki N, Nagasaki H & Oiso Y 2008 Glucocorticoids increase neuropeptide Y and agouti-related peptide gene expression via adenosine monophosphate-activated protein kinase signaling in the arcuate nucleus of rats. *Endocrinology* **149** 4544–4553. (doi:10.1210/en.2008-0229)
- Tsai JY, Villegas-Montoya C, Boland BB, Blasier Z, Egbejimi O, Gonzalez R, Kuehl M, McElfresh TA, Brewer RA, Chandler MP, et al. 2013 Influence of dark phase restricted high fat feeding on myocardial adaptation in mice. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **55** 147–155. (doi:10.1016/j.yjmcc.2012.09.010)
- Wittmann G, Fuzesi T, Singru PS, Liposits Z, Lechan RM & Fekece C 2009 Efferent projections of thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons residing in the anterior parvocellular subdivision of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Journal of Comparative Neurology* **515** 313–330. (doi:10.1002/cne.22017)
- Zakrzewska KE, Cusin I, Sainsbury A, Rohner-Jeanrenaud F & Jeanrenaud B 1997 Glucocorticoids as counterregulatory hormones of leptin: toward an understanding of leptin resistance. *Diabetes* **46** 717–719. (doi:10.2337/diab.46.4.717)
- Zilberfarb V, Siquier K, Strosberg AD & Issad T 2001 Effect of dexamethasone on adipocyte differentiation markers and tumour necrosis factor-alpha expression in human PAZ6 cells. *Diabetologia* **44** 377–386. (doi:10.1007/s001250051630)

Received in final form 23 September 2016

Accepted 11 October 2016

Accepted Preprint published online 11 October 2016