

UCH-FC
DOC-ECE
P349
C.1



Análisis de los compromisos y reasignaciones de energía generados ante estocasticidad en la disponibilidad de alimento en roedores

Tesis
Entregada A La
Universidad De Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS MENCIÓN EN ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA EVOLUTIVA

Facultad De Ciencias

Por

Isaac Peña Villalobos

Agosto, 2017



Director de Tesis: Dr. Pablo Sabat Kirkwod

Co-director de tesis: Dra. Verónica Palma Alvarado



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

Isaac Jonathan Peña Villalobos

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas Mención Ecología y Biología Evolutiva, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 3 de agosto de 2017.

Director de Tesis:
Dr. Pablo Sabat Kirkwood

Co-Director de Tesis
Dra. Verónica Palma Alvarado

Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dr. Rodrigo Vásquez

Dra. Carezza Botto

Dr. Alejandro Roth

Dr. Francisco Bozinovic

Dedicado a mis padres y abuelos



Isaac Peña Villalobos

Nació en Santiago, Chile en 1989. Manifestó desde su infancia un interés particular por conocer y comprender su entorno natural, en particular la fauna. El gusto creciente por la Biología fue gratamente nutrido durante su escolaridad, permitiéndole ingresar en 2008 a la Universidad de Chile. En esta casa de estudios obtiene el grado de Licenciado en Ciencias con mención en Biología en 2011 y el de Magíster en Ciencias Biológicas en 2013. En ese mismo año ingresó al programa de Doctorado en Ciencias con mención en Ecología y Biología Evolutiva de la Universidad de Chile, donde continuó trabajando en el laboratorio de *Ecofisiología Animal* realizando su tesis bajo la dirección del Dr. Pablo Sabat en co-tutoría con la Dra. Verónica Palma en el *Laboratory of Stem cells and Development*. Sus intereses se enfocan en el marco de la Fisiología Ecológica y Evolutiva, particularmente en la comprensión de los mecanismos y consecuencias de la interacción entre el ambiente y los ajustes fisiológicos.

AGRADECIMIENTOS

A CONICYT por la Beca de Doctorado Nacional folio N° 21130034, que proveyó el financiamiento para realización de mis estudios de Doctorado en Ciencias Biológicas Mención Ecología y Biología Evolutiva, incluyendo el desarrollo de esta tesis.

Agradezco a mi tutor, el Dr. Pablo Sabat por su confianza, apoyo, conocimientos y por brindarme la oportunidad de ser parte de su laboratorio. Así también agradezco a mi co-tutora la Dra. Verónica Palma por la confianza, la oportunidad de trabajar con su equipo y ser parte de su laboratorio estos últimos años. También quiero agradecer a los miembros de la comisión evaluadora de la Tesis, a la Dra. Carezza Botto, al Dr. Rodrigo Vásquez, al Dr. Alejandro Roth y al Dr. Francisco Bozinovic, por los valiosos comentarios a mi trabajo.

En particular agradezco la ayuda directa e invaluable de Ignacio Casanova, Pablo Lois, Andrés Sazo y Samuel Peña, reconociendo en ellos un gran compromiso y apoyo en el desarrollo de los experimentos. Además, agradezco la ayuda y consejo de todos mis amigos, profesores y compañeros del VP Lab y el Lab de Ecofisiología, en particular valoro el apoyo y dulce compañía de Claudia González en este proceso.

En forma muy especial, doy gracias a mis padres por su amor, esfuerzo e incansable lucha del día a día, la cual ha sido un ejemplo motivador y un gran orgullo para mí.

INDICE DE MATERIAS

Lista de Tablas	vii
Lista de Figuras	viii
Resumen	xi
Summary	xiv

I INTRODUCCIÓN

1

Efectos estructurales en el intestino de roedores restringidos de alimento	4
Relación entre tasas de gasto de energía y conducta exploratoria en roedores ante variabilidad alimentaria	7
Compromisos y reasignaciones de energía generados ante variación en la disponibilidad de alimento en roedores	10

HIPÓTESIS

13

Hipótesis I	13
Objetivos generales	14
Objetivos específicos	14
Hipótesis II	15
Objetivos generales	16
Objetivos específicos	16
Hipótesis III	17
Objetivos generales	18
Objetivos específicos	18

II MATERIALES Y MÉTODOS	20
Diseño experimental.....	21
Variables asociadas con la mantención del organismo	24
Variables relacionadas con la adquisición de energía	29
Análisis Estadístico	37
 III RESULTADOS	 39
Efectos de la variabilidad alimentaria a nivel intestinal.....	40
Dinámica de cambios morfológicos en el intestino delgado luego de un tratamiento de alimentación continua y al 60% del consumo <i>ad libitum</i>	53
Efectos de la variabilidad alimentaria a nivel conductual.....	59
Correlaciones funcionales entre procesos de adquisición de energía	68
Modelos de vías, análisis de SEMPLS.....	70
 IV DISCUSIÓN	 77
Efectos funcionales y estructurales de la restricción calórica y estocasticidad alimentaria en el intestino de <i>Mus musculus</i>	78
Relación entre tasas de gasto de energía y conducta exploratoria en roedores ante variabilidad alimentaria.....	84
Compromisos y reasignaciones de energía generados ante variación en la disponibilidad de alimento en roedores.....	91
Perspectivas futuras.....	97
 V REFERENCIAS	 99

LISTA DE TABLAS

TABLA 1	Diseño experimental.....	23
TABLA 2	Número de individuos por tratamiento y por análisis.....	36
TABLA 3	Masas y análisis de ANCOVA de órganos provenientes de ratones machos (Balb/c) aclimatados a cuatro regímenes dietarios.....	43
TABLA 4	Comparación de las distribuciones de células BrdU+ por criptas.....	45
TABLA 5	Efectos indirectos entre variables latentes del modelo propuesto.....	71
TABLA 6	Coefficientes de vía y su validez estadística mediante bootstrapping, para cuatro tratamientos de regímenes alimentarios.....	74
TABLA 7	Efectos indirectos y su validez estadística mediante bootstrapping, para cuatro tratamientos de regímenes alimentarios en <i>M. musculus</i>	75
TABLA 8	Comparación de coeficientes de vías entre tratamientos, para el modelo propuesto.....	76

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Esquema epitelio intestinal y sus tipos celulares.....	6
FIGURA 2	Comparación de residuos de longitudes de intestinos de machos adultos de <i>Mus musculus</i> (Balb/c) aclimatados durante 20 días a cuatro tratamientos con dos factores: regímenes calóricos (<i>ad libitum</i> y 60%) y dos regímenes periódicos (continuos y estocásticos).....	41
FIGURA 3	Relación entre los residuos de masa y residuos de longitudes, de intestinos de machos adultos de <i>Mus musculus</i> (Balb/c).....	42
FIGURA 4	Imágenes representativas de tinciones inmunohistoquímicas, realizadas en una sección longitudinal de intestino delgado.....	46
FIGURA 5	Histograma de frecuencias absolutas de criptas intestinales indicando números de células BrdU+.....	47
FIGURA 6	Correlación entre los residuos de longitud intestinal y el coeficiente de estabilización del número de células BrdU + por cripta intestinal.....	49
FIGURA 7	Relación observada en individuos de <i>Mus musculus</i> entre la actividad de la n-aminopeptidasa intestinal y el coeficiente de estabilización del número de células BrdU + por cripta intestinal.....	51
FIGURA 8	Contenido calórico de heces, en roedores bajo diferentes tratamientos alimentarios.....	52
FIGURA 9	Tamaño del intestino delgado en función del tiempo al cual son aclimatados machos adultos de <i>Mus musculus</i> (Balb/c).....	54

FIGURA 10	Histograma de frecuencias absolutas de criptas intestinales con diferentes números de células BrdU +, de individuos aclimatados en diferentes momentos a un régimen de alimentación continua de restricción calórica al 60%.....	55
FIGURA 11	Relación entre tasas de gastos de energía y masa del intestino delgado en individuos de <i>Mus musculus</i> , tras estar bajo cuatro tratamientos alimentarios durante 20 días.....	56
FIGURA 12	Relaciones entre temperatura superficial del dorso de individuos de <i>Mus musculus</i> y la actividad de enzimas intestinales, tras 20 días de aclimatación a cuatro tratamientos alimentarios diferentes.....	58
FIGURA 13	Efecto de diferentes tratamientos alimentarios sobre la distancia recorrida en un test de campo abierto (trayectoria final experimento-trayectoria inicio experimento).....	60
FIGURA 14	Relación entre las tasas de gasto de energía y la trayectoria recorrida, en un test de campo abierto por individuos machos de <i>Mus musculus</i> (Balb/c).....	61
FIGURA 15	Relaciones entre tasas de gasto de energía corregidas por masa corporal y el porcentaje de tiempo de descanso o inactividad de individuos de	

	<i>Mus musculus</i> , sometidos a diferentes tratamientos alimentarios durante 20 días.....	63
FIGURA 16	Relaciones entre el tamaño de hígado corregido por masa corporal y la actividad catabólica de este órgano y la conducta de individuos de <i>Mus musculus</i> , sometidos a diferentes tratamientos alimentarios durante 20 días.....	64
FIGURA 17	Relaciones entre temperaturas superficiales y el porcentaje de tiempo de descanso o inactividad de individuos de <i>Mus musculus</i> , sometidos a diferentes tratamientos alimentarios durante 20 días.....	66
FIGURA 18	Relación observada en individuos de <i>Mus musculus</i> entre temperatura mínima superficial dorsal y tiempo asignado a actividad general en un ambiente conocido.....	67
FIGURA 19	Modelo de vías que ilustra los efectos directos e indirectos en variables morfológicas, fisiológicas y conductuales.....	72

RESUMEN

Los organismos homeotermos endotermos, han desarrollado mecanismos fisiológicos que les permiten tolerar la privación al acceso de recursos y/o la restricción calórica durante diferentes ventanas temporales. En particular, diversas especies de roedores presentan una respuesta que se ha denominado paradójica ante la restricción calórica y estocasticidad alimentaria, la que consiste en el aumento del tamaño del intestino y un incremento en la actividad conductual, los cuales implicarían teóricamente reasignar el presupuesto energético hacia estos procesos. En base a estos fenómenos, los objetivos del presente trabajo fueron: explorar los cambios a nivel intestinal desde la dimensión celular a la fisiología digestiva durante el desarrollo de esta respuesta paradójica; evaluar el modo en que la disponibilidad de recursos podría constituir un factor ambiental que afecte la asignación de energía entre procesos de mantención y de adquisición de recursos, y por tanto, modular la relación entre las tasas metabólicas y las conductas exploratorias; e identificar los procesos de reasignación de recursos y el desarrollo de pasos limitantes en el incremento de capacidades de adquisición (cambio intestinal y exploración conductual). Para dar cumplimiento a estos objetivos, se aclimató durante cuatro semanas a machos adultos de *Mus musculus* (Balb/c) en cuatro tratamientos alimentarios con dos factores: dos regímenes calóricos (*ad libitum* y 60% del consumo en condiciones *ad libitum*) y dos regímenes periódicos (continuo y estocástico). En estos individuos se analizó la proliferación y muerte celular mediante técnicas de inmunohistoquímica, masas y longitudes de órganos, actividades de enzimas hidrolíticas y contenido calórico de las heces. Los resultados indican que individuos aclimatados al régimen continuo 60%,

presentaron intestinos de mayor longitud y un menor contenido calórico en las heces. Además, las masas de los intestinos, longitudes intestinales y la actividad de n-aminopeptidasas fueron predichas fuertemente por el coeficiente de estabilización del número de células en proliferación (BrdU+) por cripta intestinal. En base a ello, se propone que los efectos de la restricción calórica, tales como la variación macroscópica e incrementos en la actividad enzimática, ocurren a través de la reducción de la variabilidad de proliferación entre criptas intestinales, sugiriendo un aumento de procesos de bifurcación y trifurcación de criptas.

Respecto a la relación entre las tasas metabólicas y las conductas exploratorias, se analizó la conducta en un ambiente conocido y de exploración, junto a rasgos metabólicos (tasas metabólicas basales y actividad de enzimas mitocondriales en hígado y músculo esquelético) y la temperatura corporal. Los resultados apoyan la hipótesis de asignación de energía, la cual establece que entre las tasas de gasto energético y la conducta exploratoria existen compromisos. En base a los resultados obtenidos, se propone que el hígado es una pieza clave en la asignación de energía, que estaría implicada directamente en los cambios en las tasas de consumo de oxígeno y temperatura de organismos con regímenes alimentarios reducidos e impredecibles.

Finalmente, respecto a los compromisos que permitirían el desarrollo de las respuestas paradójicas, nuestros resultados indican que el aumento de las capacidades digestivas ocurriría por medio de la reducción de las tasas de gasto energético y de la temperatura corporal. Así mismo, los cambios en la actividad conductual cotidiana (i.e., en las jaulas o ambiente conocido), estarían asociados a reducciones de la temperatura corporal. Por

otra parte, se determinó que ante estocasticidad alimentaria, la exploración en un ambiente desconocido se relacionaría con la acumulación de reservas en el tejido adiposo, y que la capacidad locomotora presentaría compromisos con la mejora de capacidades intestinales. Finalmente, se propone que los ajustes intestinales y conductuales son dependientes de la reducción metabólica y termogénica. No obstante, ante estocasticidad alimentaria se desarrollarían compromisos entre las capacidades intestinales y exploratorias. En relación al contexto ecológico, los cambios paradójicos observados en roedores, les otorgarían una mayor capacidad de sobrellevar la variabilidad ambiental, comparando con otros endotermos de similar masa corporal y podrían explicar en parte el éxito de la capacidad invasiva de algunas especies de roedores.

SUMMARY

Endothermic homeothermal organisms have developed physiological mechanisms that allow them to tolerate deprivation of access to resources and/or caloric restriction during different time windows. In particular, several species of rodents present a paradoxical response to caloric restriction and food stochasticity, which consists of an increase in intestine size and an increase in behavioral activity, which would theoretically imply reallocation the energy budget towards these processes. Based on these phenomena, the objectives of the present study were: to explore changes at the intestinal level from the cellular dimension to digestive physiology during the development of this paradoxical response; evaluate the way in which resource availability could be an environmental factor that affects the allocation of energy between maintenance and resource acquisition processes and therefore modulate the relationship between metabolic rates and exploratory behaviors; and identify the processes of resource reallocation and the development of limiting steps in the acquisition capacity increase (intestinal change and behavioral exploration). To fulfill these objectives, adult males of *Mus musculus* (Balb/c) were acclimated for four weeks in four food treatments with two factors: two caloric regimens (*ad libitum* and 60% of consumption in *ad libitum* conditions) and two temporal regimens (continuous and stochastic). In these individuals the proliferation and cell death were analyzed by means of immunohistochemical techniques, organ masses and lengths, hydrolytic enzyme activities and feces caloric content. The results indicate that individuals acclimated to the continuous regime 60%, presented intestines of greater length and a lower caloric content in the feces. In addition, intestinal masses, intestinal lengths and n-

aminopeptidase activity were strongly predicted by the coefficient of stabilization of the number of proliferating cells (BrdU +) by intestinal crypt. Based on this, it is proposed that the effects of caloric restriction, such as macroscopic variation and increases in enzymatic activity, occur through the reduction of proliferation variability among intestinal crypts, suggesting an increase in bifurcation processes and trifurcation of crypts.

Regarding the relationship between metabolic rates and exploratory behaviors, behavior was analyzed in a known and exploratory environment, along with metabolic traits (basal metabolic rates and mitochondrial enzyme activity in liver and skeletal muscle) and body temperature. The results support the hypothesis of energy allocation, which establishes a trade-off between energy expenditure rates and exploratory behavior. Based on the results obtained, it is proposed that the liver is a key element in the energy allocation, which would be directly involved in the changes in the oxygen and temperature consumption rates of organisms with reduced and unpredictable dietary regimes.

Finally, with regard to the trade-off that would allow the development of paradoxical responses, our results indicate that the increase of the digestive capacities would occur through the reduction of energy expenditure rates and body temperature. Also, changes in daily behavioral activity (i.e., in cages or known environment) would be associated with reductions in body temperature. On the other hand, it was determined that in the case of food stochasticity, the exploration in an unknown environment would be related to the accumulation of reserves in the adipose tissue, and that the locomotor capacity would present compromises with the improvement of intestinal capacities.

Finally, it is proposed that intestinal and behavioral adjustments are dependent on the metabolic and thermogenic reduction. However, in the case of food stochasticity, trade-off would be developed between intestinal and exploratory capacities. In relation to the ecological context, the paradoxical changes observed in rodents would give them a greater capacity to cope with environmental variability, comparing with other endotherms of similar body mass and could explain in part the success of the invasive capacity of some species of rodents.

I

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

El acceso a los recursos tróficos por parte de los consumidores puede ser limitado por la disponibilidad espacial (fragmentación del hábitat o recursos distribuidos en parches) y por fluctuaciones temporales (Forda et al. 2001, O'Connor et al. 2009). Además, su obtención puede ser restringida por interacciones ecológicas tales como competencia y depredación, pudiendo generar una privación temporal de alimento (Mitchell 1990, Vásquez 1997). Estas variaciones en la disponibilidad de recursos, a su vez pueden desencadenar en los consumidores ajustes reversibles, que a corto plazo se manifiestan en modificaciones conductuales y fisiológicas, orientadas a evitar que el balance energético en ese período de privación sea negativo (Wang et al. 2006, Zhang et al. 2012). Paralelamente, a un nivel poblacional, estas variaciones en la disponibilidad de recursos pueden constituir presiones selectivas sobre rasgos conductuales relacionados con la obtención de nutrientes (Dingemanse et al. 2004). En particular, ante variaciones predecibles a corto plazo, los organismos endotermos pueden desplazarse estacionalmente en búsqueda del alimento, lo que ocurre por ejemplo en aves acuáticas (Peña-Villalobos et al., 2012), reducir las tasas de gasto de energía a través del desarrollo de sopor diario, como ocurre en aves de la familia Trochilidae (Calder 1994, López-Calleja & Bozinovic, 2003) o caer en un estado de hibernación (sopor prolongado) como ocurre en *Ursus americanus* (Øivind et al. 2011). Por otra parte, ante variaciones estocásticas (i.e., no predecibles) en la disponibilidad de recursos, se ha observado una respuesta denominada

sopor facultativo, presente por ejemplo, en el marsupial *Thylamys elegans* (Bozinovic & Méndez 1997, Bozinovic et al. 2005, 2007).

Las diversas respuestas orgánsmicas ante esta variabilidad ambiental en la disponibilidad de alimentos son frecuentemente acompañadas de ajustes fisiológicos, que permiten obtener un balance energético positivo a través del desarrollo de compromisos (*trade-off*), que implican principalmente una reducción de las tasas metabólicas y de la temperatura corporal, y depresión de la actividad termogénica no tiritante, generando una reasignación de recursos a otros procesos vitales (Severinsen & Munch 1999, Wang et al. 2005, Cao et al. 2009). Estas respuestas a la privación de alimento, documentadas en diversas especies de mamíferos marsupiales y euterios (Bozinovic & Méndez 1997, Bozinovic et al. 2005, Wang et al. 2005, Bozinovic et al. 2007), implican además una reducción-- denominada adaptativa por algunos autores-- de la masa de órganos de alto gasto metabólico y una disminución de la actividad conductual (Karasov & Diamond 1983, Secor et al. 1994, Carey 2005, Wang et al. 2005, Naya & Bozinovic 2006).

Sin embargo, diversas especies de roedores (e.g., *Mus musculus*, *Cricetulus barabensis*, *Eothenomys miletus*) presentan una respuesta denominada "paradójica" ante la privación estocástica de alimento o reducción calórica de la dieta. Esta consiste en un incremento de la masa intestinal (Zhao & Cao 2009, Cao et al. 2009, Zhu et al. 2014) y de la actividad conductual, locomotora o exploratoria (Severinsen & Munch 1999, Hebebrand et al. 2003, Zhao & Cao 2009, Cao et al. 2009, Zhang et al. 2012, Zhu et al. 2014), en paralelo a una disminución de las tasas metabólicas basales y la termogénesis no tiritante (Cao et al. 2009). Con respecto a estas respuestas, se han identificado los mecanismos fisiológicos y

moleculares que las subyacen. Es interesante que tanto la proliferación de las células troncales intestinales (CTI) subyacente a los aumentos en el tejido intestinal, así como los cambios conductuales, serían modulados por el sistema endocrino a través de variaciones plasmáticas en la concentración de hormonas (i.e., leptina e insulina) que dan cuenta del estado energético del organismo (Exner et al. 2000, Asakawa et al. 2001, Hebebrand et al. 2003, Holtkamp et al. 2004, Jensen 2013).

Sin embargo, y en un contexto ecológico-evolutivo, no existe información respecto al potencial efecto de estas respuestas sobre la adecuación biológica (o *fitness*). Así, se desconoce por ejemplo, si la inversión desarrollada por roedores en el tejido intestinal produce cambios en actividades de enzimas digestivas que expliquen a su vez un aumento en la adquisición y procesamiento de energía en períodos en que la disponibilidad de recursos escasea.

Efectos estructurales en el intestino de roedores restringidos de alimento

Diversos estudios han documentado la existencia de modificaciones mediante plasticidad fenotípica de la morfología del intestino en roedores en múltiples contextos asociados con el estrés energético (i.e., altas demandas de energía). En este sentido, es extensamente conocido que los roedores experimentan un aumento del tamaño del intestino durante la lactancia (véase Naya et al. 2007) y que frente a una restricción calórica, el intestino puede incrementar su tamaño (i.e., longitud y/o masa), tanto en cepas de laboratorio (e.g.,

~~*Mus musculus*~~: C57BL/6J, HsdCpb, Balb/c) y especies silvestres (e.g., *Cricetulus barabensis* y *Eothenomys miletus*) (Zhao & Cao 2009, Cao et al. 2009, Zhu et al. 2014).

Los factores proximales que subyacen a los cambios celulares intestinales ante una restricción calórica en roedores han sido reportados por Yilmaz et al. (2012), quienes encontraron que cambios en el estado energético del organismo, son percibidos por una quinasa maestra del control metabólico, llamada mTORC1, la cual afecta a un tipo celular presente en las criptas intestinales, las células de Paneth. Este tipo de células, secretan un factor paracrino (cADPR) mitogénico hacia las células troncales intestinales (CTI), incrementando así la proliferación de células en las criptas. Por lo tanto, el estado energético del organismo, es un factor que determina la proliferación de CTI y por tanto la diferenciación celular a nivel del intestino delgado (Figura 1).

En resumen, a pesar de la evidencia que proviene de los estudios del ámbito eco-fisiológico (i.e., plasticidad intestinal asociada a estrés energético) y las aproximaciones moleculares (i.e., mecanismos de proliferación y crecimiento), a la fecha no existe una mirada integradora de ambas aproximaciones, que nos permitan tener una clara perspectiva mecanicista de la variabilidad ambiental, sobre la plasticidad fenotípica del intestino.

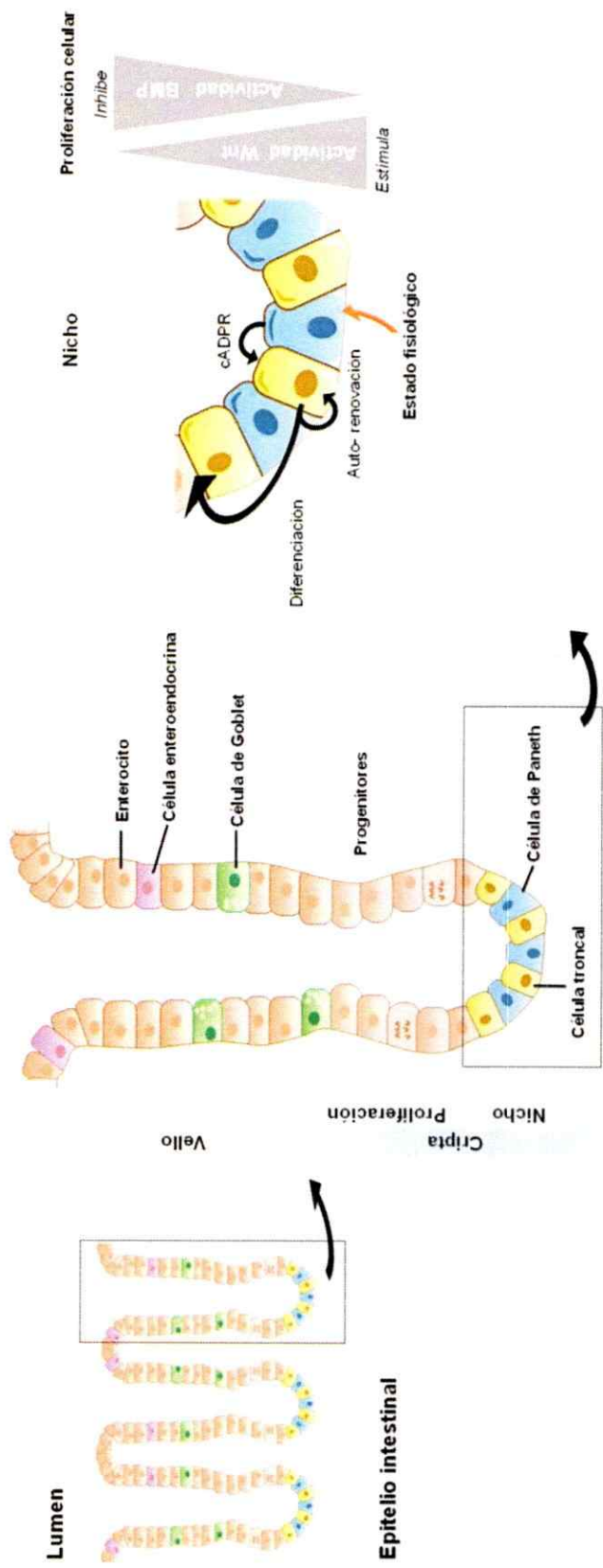


Figura 1. Esquema epitelio intestinal y sus tipos celulares. El intestino de mamíferos posee una capa de células epiteliales organizadas en invaginaciones llamadas criptas de Lieberkühn y proyecciones filiformes llamadas vellos. En las criptas intestinales hay células de Paneth y células troncales. La proliferación celular es modulada por diferentes vías de señalización tales como Wnt y BMP, jugando roles críticos en la regulación de la proliferación, controlando la renovación y diferenciación de células troncales intestinales (CTI). Además, las células de Paneth pueden determinar la condición energética del organismo por medio de la inhibición del complejo mTOR, generando la secreción de una ADP ribosa cíclica (cADPR), que modula la tasa de proliferación o auto-renovación de las CTI (véase Yilmaz et al. 2012, Barker 2014).

Relación entre tasas de gasto de energía y conducta exploratoria en roedores ante variabilidad alimentaria

La actividad conductual puede ser descrita como los niveles de actividad general de un individuo en una situación familiar, y la exploración, definida como la repuesta de un individuo a situaciones novedosas (Le Galliard et al. 2013). Esas conductas son asociadas con la actividad de forrajeo, patrullaje de defensa territorial, encuentro de parejas reproductivas y elección de hábitat (Reale et al. 2007, Biro & Stamps 2008, Cote et al. 2010). La exploración también se define como toda la colección de comportamientos aparentemente no dirigidos incluyendo el movimiento a través del espacio, la cual es incitada por ambientes novedosos (Alyan & Jander 1997). Este carácter fenotípico, consistiría en un rasgo de personalidad que podría variar a nivel intra-específico, tal como la audacia, la agresividad y sociabilidad (Reale et al. 2007). En términos de la actividad exploratoria de un organismo y su integración con aspectos de la ecología evolutiva, se ha propuesto que la actividad y exploración han evolucionado por selección dependiente de frecuencia y que tendrían una relación positiva con la probabilidad de supervivencia (véase Le Galliard et al. 2013).

Por otro lado, algunos estudios han analizado empíricamente la asociación entre el gasto metabólico y la conducta, aun cuando dichos estudios han enfatizado principalmente la personalidad de los individuos como un factor determinante (Biro & Stamps 2010, Careau & Garland, 2012). No obstante, se han descrito diferencias poblacionales en la magnitud y sentido de la asociación entre la actividad exploratoria y las tasas de gasto energético en

aves (Maldonado et al. 2012), lo que sugiere la existencia de efectos ambientales sobre esta asociación (véase Houston 2010, para una aproximación teórica).

Además, a la fecha se desconocen los mecanismos que dirigen esta asociación y no existe un consenso sobre cual debiera ser la relación entre las conductas exploratorias y las tasas de gasto de energía, como tampoco está claro la existencia de una relación causal entre ambas funciones (Maldonado et al. 2012, Careau & Garland 2012). Al respecto, se han planteado al menos cuatro modelos (hay seis, sin embargo dos de ellos son idénticos¹) con diferentes grados de apoyo empírico (véase Careau & Garland 2012), que intentan explicar la asociación funcional entre rasgos conductuales y las tasas de gasto de energía, tales como la tasa metabólica de reposo o basal (RMR, BMR). Los modelos propuestos para explicar la asociación entre la disponibilidad de alimento y las tasas de gasto de energía son: el modelo de asignación, el de desempeño, el independiente y el modelo de sustitución. En breve, el primero de ellos establece una relación negativa entre las tasas de gasto energético y la actividad física, debido a la existencia de compromisos en la asignación de recursos a ambos procesos. El modelo de desempeño, sugiere una relación positiva entre las variables, debido a que individuos con mayores tasas metabólicas, serían capaces de invertir más energía en actividad locomotora. El modelo independiente sugiere que no existe relación entre ambas variables. Y finalmente, el modelo de sustitución establece que en un endotermo situado bajo la temperatura crítica inferior, el costo

¹ I) Modelo de consumo incrementado (= Modelo de desempeño), II) Modelo de compensación (=Modelo de asignación), III) Modelo independiente, IV) Modelo de sustitución. (Véase Careau et al. 2008, Careau & Garland, 2012).

energético asignado a la conducta, es reducido, y no existiría relación entre las tasas de gasto de energía y actividad física (Careau et al. 2008, Careau & Garland 2012).

En términos fisiológicos, se ha observado que la conducta asociada a la búsqueda de alimento y a la actividad física espontánea, está modulada por la acción de hormonas y neuropéptidos sobre centros de integración en el área lateral hipotalámica (Silva et al., 2009). Esta área del cerebro generaría las respuestas descritas ante una restricción calórica. En este sentido, se ha observado que algunos roedores experimentan hiperactividad inducida por semi-inanición (Russell et al. 1987, Morse et al. 1995), junto con la pérdida de peso asociadas a una rápida declinación en la secreción de leptina (i.e., hormona secretada por adipocitos) ante una restricción calórica. Esta disminución de leptina, además de insulina y hormonas gastrointestinales, induce respuestas que modulan el balance energético (ingesta y conductas de forrajeo), por medio de su acción sobre poblaciones neuronales del hipotálamo (área hipotalámico lateral). Incluso en humanos, la hipoleptinemia contribuye con la hiperactividad frecuentemente asociada a la anorexia nerviosa (Exner et al. 2000).

Aun cuando se ha documentado que la privación estocástica de alimento produce un aumento de la frecuencia de la conducta locomotora o exploratoria (mediada a través de una respuesta neuroendocrina), junto a una disminución de las tasas metabólicas, es desconocido si estas funciones presentan compromisos entre ellas, o si esta potencial relación puede ser modificada por cambios en la disponibilidad de recursos. Luego, es relevante evaluar la existencia de una asociación funcional entre las tasas de gasto energético y la conducta exploratoria o actividad, dado que podría dar cuenta de la

existencia de compromisos en la asignación de energía, hacia procesos de exploración, relacionados con la adquisición de información y el forrajeo, ante diferentes escenarios de disponibilidad de alimento.

Compromisos y reasignaciones de energía generados ante variación en la disponibilidad de alimento en roedores.

Los organismos homeotermos endotermos, han desarrollado mecanismos fisiológicos que les permiten tolerar la privación al acceso de recursos y/o la restricción calórica durante diferentes ventanas temporales. Como se mencionó, diversas especies de roedores presentan una respuesta que se ha denominado paradójica ante la restricción calórica, la cual consiste en el aumento del tamaño del intestino y un incremento en la actividad conductual, los cuales implicarían teóricamente reasignar el presupuesto energético hacia estos procesos.

Variaciones en la ingesta de alimento, inducen cambios en los niveles plasmáticos de hormonas relacionadas con la respuesta sistémica a la circulación de nutrientes (e.g., leptina, insulina, ghrelina), las cuales permiten una adecuada respuesta orientada a la acumulación de reservas o a la modulación de actividades catabólicas (Speakman & Mitchell 2011, Jensen et al. 2013).

Bajo el supuesto de la existencia de presupuestos energéticos limitados, se han propuesto modelos explicativos de la manera en que se adquiere y se asigna la energía, a las distintas funciones biológicas en un organismo (Zera & Harshman 2001). Uno de los modelos

conceptuales, es el modelo del barril (Weiner 1992), el cual indica que los procesos de adquisición de energía se encuentran en serie (i.e., son secuenciales). Así, el forrajeo de un animal, precede a la digestión y a su vez este proceso, es seguido por la absorción de nutrientes. Esta relación en serie, establecería que al reducir su funcionamiento, un proceso predecesor limitaría los sustratos empleados por uno posterior (ya sea digestión o absorción). De este modo, la adquisición de recursos se presenta como una relación secuencial de procesos fisiológicos y conductuales. Bajo esta lógica, esta secuencia en la obtención de materia y energía, podría ser equivalente al modelo de optimización, propuesto por Taylor y Weibel (1981) para el sistema respiratorio de mamíferos, el cual bajo la hipótesis de *symmorphosis* o diseño óptimo, establece que no debería existir más estructura (o función), que aquella que permite satisfacer los requerimientos del organismo, tal como se ha observado en los procesos digestivos de rumiantes y peces (Hofmann 1989, Zeng et al. 2012). En particular, ante una variación estocástica de alimento, se desconoce la existencia de una asociación funcional entre la proliferación de las CTI (relacionada con la absorción de nutrientes), y la actividad locomotora (relacionada con la obtención de información y el forrajeo), que en conjunto aumenten las capacidades de incorporación de energía, sin una inversión en exceso o innecesaria en alguno de los procesos involucrados.

Dado lo anterior, el propósito de este trabajo fue explorar la existencia de compromisos entre variables fisiológicas (e. g., metabolismo, termogénesis, recambio celular, conducta entre otras) y las reasignaciones de energía inducidas por la privación estocástica del

alimento y la restricción calórica, evaluando estas respuestas paradójicas y las relaciones entre los cambios fisiológicos y conductuales.

Resumiendo, a través del análisis de tres hipótesis, este estudio pretendió explorar las consecuencias de la variabilidad en la disponibilidad de alimento sobre diversos aspectos de la morfología intestinal, fisiología y conducta de los roedores, con énfasis en la comprensión del desarrollo de las respuestas paradójicas, observadas únicamente en este grupo de mamíferos.

HIPÓTESIS

Hipótesis I: Debido a que la restricción calórica induce cambios a niveles celulares y macroscópicos en el intestino, entonces debería existir una relación entre parámetros histológicos y otros de índole macroscópica y funcional.

Predicciones

I. Animales sometidos a estocasticidad de disponibilidad de alimento o a dietas bajas en calorías, presentarán aumentos en la proliferación celular y esta a su vez se debería relacionar positivamente con parámetros macroscópicos (e.g., masa y/o longitud del intestino delgado).



Objetivos generales

1. Evaluar qué tipo de régimen alimentario induce plasticidad intestinal a nivel celular, macroscópico y funcional. Además determinar la temporalidad de dichos cambios.
2. Analizar en qué manera la proliferación celular de las CTI está relacionada con la variación macroscópica del intestino a nivel morfológico y explorar los efectos de la proliferación celular sobre las capacidades digestivas.

Objetivos específicos

1. Evaluar qué tipo de régimen alimentario (cuatro tratamientos, con dos factores: calorías y periodicidad) pueden inducir cambios en la proliferación y muerte celular intestinal mediante técnicas inmunohistoquímicas, variaciones en masa y/ longitud del intestino. Además, identificar la dinámica temporal de la plasticidad intestinal.
2. Analizar de qué manera la proliferación celular se relaciona con la variación macroscópica del intestino a nivel morfológico y explorar los efectos de la proliferación celular sobre las capacidades digestivas, por medio del análisis de enzimas hidrolíticas (n-aminopeptidasas, sacarasa y maltasa) y el análisis del contenido calórico de las heces.

Hipótesis II: Debido a que la privación estocástica de alimento reduciría las tasas metabólicas e incrementaría la conducta locomotora o exploratoria en roedores, se hipotetiza que la disponibilidad de recursos es un factor ambiental que puede modificar la asignación de energía entre procesos de mantención y de adquisición de recursos, y por tanto, puede modular la relación entre las tasas metabólicas y las conductas exploratorias.

Predicciones

1. Roedores sometidos a ambientes con estocasticidad alimenticia o bajo contenido calórico presentarán correlaciones negativas entre la actividad locomotora o exploratoria y las tasas de gasto energético (tasas metabólicas). Por su parte, animales bajo regímenes de alimentación constante o de alto contenido calórico, no presentarán una asociación entre estas variables, debido a que no existirían las señales ambientales que provoquen cambios conductuales, ni compromisos energéticos.

Objetivos generales

1. Analizar la relación entre la conducta exploratoria y las tasas de gasto energético, en función de la disponibilidad de recursos.

Objetivos específicos

1. Analizar la potencial correlación entre la actividad locomotora o exploratoria y las tasas de gasto energético (tasas metabólicas) y cómo esta podría ser modulada en distintos regímenes alimentarios.

Hipótesis III: Debido a que la privación estocástica de alimento generaría respuestas paradójicas, en donde los roedores aumentarían la proliferación de las células troncales intestinales y la actividad locomotora, se hipotetiza que estas respuestas ocurrirían por medio de compromisos energéticos, a expensas de la reducción de la actividad termogénica no tiritante, la actividad metabólica de órganos de alto gasto energético y la tasa metabólica basal. Además, estas reasignaciones de energía, permitirían conjuntamente aumentar las capacidades de incorporación de nutrientes y energía ante la disponibilidad de recursos.

Predicciones

I. Animales sometidos a estocasticidad de disponibilidad de alimento o a dietas bajas en calorías, presentarán correlaciones negativas, entre las variables relacionadas con capacidades de adquisición de energía (actividades catabólicas de apéndices locomotores, conducta exploratoria, proliferación celular intestinal, actividades enzimáticas digestivas y contenido calórico de las heces) y las variables no asociadas a la adquisición de recursos (termogénesis no tiritante, catabolismo en hígado y temperatura corporal).

II. Animales sometidos a estocasticidad alimentaria o a dietas de bajo contenido calórico, presentarán asociaciones positivas entre los procesos de adquisición de energía asociadas al forrajeo (conducta exploratoria, actividad catabólica de apéndices

locomotores), y la absorción o digestión (actividad proliferativa intestinal, actividades enzimáticas digestivas, contenido calórico de las heces).

Objetivos generales

1. Determinar si las respuestas fisiológicas que disminuyen su magnitud ante privación estocástica de alimento, constituyen compromisos orientados a una reasignación de energía hacia procesos de adquisición.
2. Evaluar si los cambios intestinales (celulares y bioquímicos) y conductuales, que ocurren ante estocasticidad alimenticia, están correlacionados funcionalmente, y como estos cambios se asocian con el procesamiento de materia y energía.

Objetivos específicos

1. Analizar en distintos regímenes alimentarios (continuos y estocásticos; con diferentes contenidos calóricos), el desarrollo de compromisos entre variables relacionadas con capacidades de adquisición de energía (actividad catabólica de apéndices locomotores, conducta exploratoria, proliferación celular intestinal actividad enzimática digestiva, contenido calórico de las heces) y requerimientos no asociados a la adquisición

de recursos (~~termogénesis~~ no tiritante, temperatura corporal, catabolismo en hígado, tasas de gasto energético).

2. Determinar la existencia de una relación positiva entre los procesos de adquisición de energía relacionadas al forrajeo (actividad catabólica de músculo de apéndices locomotores y conducta exploratoria), digestión (actividad de n-aminopeptidasas, disacaridasas intestinales; sacarosa y maltasa) y absorción (proliferación de células troncales intestinales y contenido calórico de las heces), en roedores sometidos a distintos regímenes alimenticios (continuos y estocásticos; y con diferentes contenidos calóricos).

II

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental

Este trabajo cuenta con la aprobación del Protocolo de Manejo de Especies Vivas Para Experimentación y Bioseguridad, por parte del Comité de Ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

Como modelo de estudio se utilizaron machos adultos *Mus musculus* (cepa Balb/c), debido a que en esta especie se han realizado múltiples estudios de estocasticidad y privación de alimento, en los cuales desarrolla los cambios denominados como paradójales (Holmes & Mistlberger 2000, Cao et al. 2009, Zhao et al. 2010). Se empleó sólo individuos de este sexo, con el objetivo de reducir la variabilidad metabólica en términos del desarrollo de ciclos reproductivos.

Con el objeto de someter a prueba las hipótesis, se desarrolló un experimento durante 20 días en un tratamiento agudo a 25°C (12:12, luz: oscuridad), donde roedores de 3 meses de edad² fueron sometidos a alimentación continua en dos regímenes calóricos, y una privación estocástica de alimento (alimentación tres veces por semana, en donde se determinaron aleatoria e individualmente los días de acceso al alimento, véase Tabla 1) a dos regímenes calóricos (i.e., cuatro tratamientos de contenido calórico/periodicidad;

² Tanto los individuos utilizados, así como sus progenitores provienen de una condición de alimentación *ad libitum* con el mismo tipo de alimento empleado en este estudio (Prolab RMH 300, Labdiet).

véase Tabla 1). Los individuos fueron aclimatados en jaulas individuales (25 x 15 x 15 cm), sin viruta y sobre rejillas metálicas, con el objetivo de impedir la coprofagia y mecanismos conductuales de regulación térmica. Además, fueron aclimatados bajo la zona termo neutral con el objeto de reducir la capacidad de generar reservas de energía.

Luego del período de aclimatación, se inyectó de manera intraperitoneal 80 μ L del análogo de timidina, BrdU 20 mg/mL (Sigma), generando un pulso de una hora antes del sacrificio (por medio de dislocación cervical), tras lo cual los órganos fueron removidos y masados (\pm 0,001g). Posteriormente, se registró la longitud del intestino y este fue seccionado transversalmente en tres sesiones de igual tamaño. Finalmente, el primer tercio del intestino (duodeno y parte del yeyuno) fue cortado longitudinalmente, dejando una mitad para análisis enzimático almacenado a -80°C y la otra fue fijada en PFA al 4% a 4°C por 2 horas tiempo para posteriores análisis histológicos.

Tabla 1. Diseño experimental. Machos adultos de *Mus musculus* (Balb/c), durante 20 días fueron aclimatados a cuatro condiciones experimentales a partir de dos periodicidades de alimentación (continua y estocástica) y dos regímenes calóricos (*ad libitum* y al 60%)

Alimentación	Ingesta calórica semanal*
Estocástica***	100%* 70 g semanales
Estocástica	60%** 42 g semanales
Continua	100% 70 g semanales
Continua	60% 42 g semanales

*En relación al gasto energético evaluado a 25°C, tal que la acumulación de reservas sea mínima. ** Valor empleado por Yilmaz et al. 2012. ***Alimentación aleatoria 3 veces por semana. Alimento utilizado: Prolab RMH300 (Labdiet) deshidratado.

A continuación se presentan los métodos divididos en dos secciones, la primera tiene relación con la medición de variables asociadas con la mantención del organismo (i) y la segunda, con variables relacionadas con la adquisición de energía (ii).

i) *Variables asociadas con la mantención del organismo*

Determinación de Tasa Metabólica Basal (BMR)

Las mediciones de BMR, fueron realizadas al inicio y final de la aclimatación, mediante la determinación del consumo de oxígeno en animales en estado post absortivo, durante la fase inactiva y en la zona termoneutral empleando un sistema estándar de respirometría abierta. En este procedimiento, los roedores fueron pesados empleando una balanza electrónica Shimadzu AUX220 ($\pm 0,001$ g) y puestos en cámaras metabólicas de acrílico transparente (0,75 L), luego ubicados en una cabina iluminada y con temperatura controlada (Sable Systems, Henderson, Nevada) a temperatura constante ($T_a = 30 \pm 0,5$ °C). La cámara metabólica recibió aire seco a 500 mL min^{-1} . El aire excurrente fue pasado a través de columnas de Driedrite y Baralyme (gránulos absorbentes de CO_2) antes de pasar a través de un analizador de O_2 (model FoxBox, Sable System, Henderson, Nevada) calibrado con una mezcla de oxígeno (20%) y nitrógeno (80%) que fue certificado por cromatografía (INDURA, Chile). Las mediciones y protocolos de calibración se realizaron siguiendo a Williams & Tieleman (2000). Debido a que el vapor de agua y el CO_2 fueron eliminados antes de ingresar al analizador de O_2 , el consumo de oxígeno fue calculado como [Withers (1977: p 122)]: $\text{VO}_2 = [\text{FR} \cdot 60 \cdot (\text{F}_i \text{O}_2 - \text{F}_e \text{O}_2)] / (1 - \text{F}_i \text{O}_2)$, donde FR es la tasa de flujo en mL/min, y F_i y F_e son las concentraciones fraccionales de O_2 que ingresan y salen de la cámara metabólica, respectivamente. La señal originada en el analizador de

oxígeno (%) y el flujómetro fue digitalizada empleando el sistema Universal Interface II (Sable Systems) y fue registrado en un computador personal empleando el software de adquisición de datos EXPEDATA (Sable Systems). El intervalo de muestreo fue de 1 s. Los individuos fueron mantenidos en las cámaras desde 9:00 a 15:00 horas.

Enzimas metabólicas

Reactivos

Los reactivos químicos que se utilizaron para los ensayos de CCO y CS fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (Santiago, Chile) y son los siguientes:

Empleados en soluciones amortiguadoras: Fosfato de potasio monobásico, Fosfato de potasio dibásico, Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol (Tris). Reactivos empleados en el ensayo de enzimático: DL-Dithiothreitol (DTT), Citocromo C de corazón equino, Acetil Coenzima A, 5,5'-Dithiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), ácido oxaloacético.

Preparación de extractos de tejido

Las determinaciones de actividad enzimática, se realizaron con homogenizados de tejidos muscular y hepático. Para ello, inmediatamente después de su sacrificio, se diseccionó en hielo el hígado y la musculatura presente en las extremidades inferiores (*biceps femoris*, *gracilis*, *semitendinosus*, *rectus femoris*, *tibialis anterior* y *vastus lateralis*). Los tejidos fueron almacenados a -80°C, en espera de la realización de los ensayos enzimáticos.

Una porción de tejido a analizar fue puesta en 10 veces su volumen en una disolución amortiguadora (Buffer fosfato 0,1 M y EDTA 0,002 M), luego, estas se homogeneizaron empleando un homogeneizador Ultra-turrax T25 (Janke & Kunkel) a 20000 rpm. Para acceder a las proteínas presentes en la membrana mitocondrial interna, el homogeneizado resultante fue tratado con ultra sonido en un sonicador Sonics (Vibra cell) con una configuración de 20 segundos on, 30 segundos off y una amplitud del 40%, posteriormente se separó una fase acuosa de otra sólida empleando una centrifuga (Bodeco M-240R) a una temperatura de 4°C a 14000 rpm durante 15 minutos. Tras la centrifugación, se colectó el sobrenadante, el cual se almacenó en hielo hasta la realización de los ensayos enzimáticos.

Actividad de Citocromo oxidasa

Con objeto de determinar la funcionalidad de la mitocondria, la actividad de la enzima citocromo oxidada fue medida a 550 nm de acuerdo a Berry & Trupower (1987). Los ensayos fueron realizados en un volumen final de 200 μ L a 25°C, empleando un espectrofotómetro Thermo Scientific Multiskan GO, en un medio de reacción que contenía buffer enzima (Tris-HCl 10 mM pH=7, sacarosa 250 mM), buffer de ensayo (Tris-HCl 10 mM pH=7, NaCl 120 mM) y muestra. La reacción enzimática se inició tras agregar Citocromo c reducido con DTT (Dithiothreitol).

Actividad de Citrato sintasa

La actividad de citrato sintasa fue medida a 412 nm (Srere, 1969). Los ensayos fueron realizados en un volumen final de 200 μ L a 25°C, empleando un espectrofotómetro Thermo Scientific Multiskan GO, en un medio de reacción que contenía 10 mM Tris/HCl, pH 8.0, 10 mM ácido 5,5' ditiobis-(2 nitrobenzoico) (DTNB), 30 mM Acetil Coenzima A (acetil CoA) y 10 mM ácido oxaloacético. La reacción enzimática se inició tras agregar acetil CoA.

Capacidades termogénicas

Registro continuo de temperatura

Con el objetivo de analizar la temperatura superficial de los animales durante toda la aclimatación, se instalaron en el dorso de cada individuo *data-logger* (3 g) de temperatura (I-Buttons model DS1921L, Dallas Semi-conductors, USA) (Brown & Downs 2006, Bozinovic et al., 2007). Los sensores registraron la temperatura de la piel de los animales cada 30 minutos durante 20 días (el menor intervalo considerando las limitaciones de almacenamiento de datos de los *data-logger*). Luego del sacrificio de los animales, los sensores fueron extraídos y analizados con el software OneWireViewer (0.3.17.44). A partir de la información colectada se calculó las temperaturas mínimas, máximas y promedios.

Termogénesis no tiritante

Con el objetivo de analizar las capacidades termogénicas independientes de la actividad muscular, se midió la capacidad termogénica no tiritante mediante la administración de norepinefrina (norepinefrina bitartrato, Sigma-Aldrich) y el registro de consumo de oxígeno posterior. Para ello, se registró durante una hora la tasa metabólica a 25°C en un sistema de respirometría abierto, y luego se administró aproximadamente 0,02 mg de norepinefrina en un volumen de 100 µL (Wunder & Gettinger 1996), por medio de una inyección subcutánea supraescapular a cada individuo (Heldmaier et al. 1971). Finalmente

se registró el consumo de oxígeno tras la inyección durante una hora a 25°C (Zhu et al. 2010).

ii) *Variables relacionadas con la adquisición de energía*

Análisis de enzimas digestivas

N-amino peptidasas

El tejido fue homogeneizado durante 30 segundos en un homogeneizador Ultra Turrax T25 en 20 volúmenes de una solución 0,9% NaCl. Se midió la actividad enzimática en homogeneizado del tejido con el objetivo de evitar la subestimación de actividad. El ensayo de N- amino peptidasa se realizó usando L-alanina-p nitroanilina como sustrato. Brevemente, 7 µL de homogeneizado diluido con una solución 0,9% NaCl, fue mezclada con 67 mL de mezcla de ensayo (2,04 mM L-alanina-p nitroanilina en 0,2 M NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH7). La reacción fue incubada a 37°C y detenida después de 10 minutos usando 126 µL de ácido acético frío 2 M, y la absorbancia fue medida a 384 nm. El contenido de proteínas del homogeneizado intestinal fue determinado usando el método de Bradford. Luego, la actividad enzimática fue estandarizada por gramo de tejido de

intestino y por gramo de proteína (Sabat et al. 1998), y las actividades fueron presentadas como actividad hidrolítica estandarizada $UI\ g^{-1}$ tejido húmedo y $UI\ mg^{-1}$ proteína (donde $UI = \mu\text{mol hidrolizado}\ \text{min}^{-1}$).

Disacaridasas: maltasa y sacarasa

La actividad de las disacaridasas maltasa y sacarasa, fueron determinadas de acuerdo al método de Dahlqvist (1964), modificado por Martínez del Río (1990). Brevemente, el tejido homogeneizado 7 μL fueron incubados a 37°C con 7 μL de soluciones de disacáridos (maltosa o sucrosa) $56\ \text{mmol}\ \text{L}^{-1}$ en buffer 0,1 M Maleato/NaOH, pH 6,5. Después de 10 minutos, la reacción fue detenida añadiendo 186 μl de una solución de detención y revelado (una botella de GODPAD (Valtek) en 250 mL 0,1 M TRIS/HCl, pH 7). La absorbancia fue medida a 505 nm con un espectrofotómetro Thermo Scientific Multiskan GO después de 18 minutos a 20°C . Las actividades enzimáticas estandarizadas fueron calculadas en base a la absorbancia. El contenido de proteínas del homogeneizado intestinal fue determinado usando el método de Bradford. Luego, la actividad enzimática fue estandarizada por gramo de tejido de intestino y por gramo de proteína (Sabat et al. 1998), y las actividades fueron presentadas como actividad hidrolítica estandarizada $UI\ g^{-1}$ tejido húmedo y $UI\ mg^{-1}$ proteína (donde $UI = \mu\text{mol hidrolizado}\ \text{min}^{-1}$).

Análisis de proliferación celular intestinal: Inmunohistoquímica

Luego de ser fijado, el tejido se deshidrató durante 12 horas en una solución de sacarosa al 30% y fue montado en OCT y almacenado a -80°C . Los bloques de OCT fueron cortados empleando un criostato a un grosor de $14\ \mu\text{m}$ y fueron almacenados a -20°C .

Con el objetivo de analizar la proliferación de las células del intestino, se evaluó la incorporación de BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridina, un marcador de proliferación celular análogo de la timidina) en las células de las criptas de Lieberkühn, por medio de técnicas de histología (Yilmaz et al. 2012, Takashima et al. 2013). Además se evaluó proliferación detectando la presencia de histona fosforilada (Anti fosfohistona H3, Merck Millipore) y se determinó expresión de caspasa clivada-3 para evaluar muerte celular (Cell Signaling). Brevemente, los portaobjetos fueron lavados durante 5 minutos en PBT (PBS + Tritón 0,1%), luego se inhibió la actividad de peroxidasa endógena durante 5 minutos empleando una solución de metanol y H_2O_2 0,3%. Posteriormente se lavaron las muestras con PBT y se realizó un protocolo de desenmascaramiento de epítomos, sumergiendo las muestras en una solución de buffer citrato 10 mM/ EDTA 1mM (pH 6) durante una hora a 80°C y luego durante dos minutos en una solución de NaBH_4 0,1%. Luego con el objetivo de desnaturalizar el ADN de las muestras, se sumergieron los portaobjetos en HCl 2N a 37°C durante 30 minutos y se neutralizó con $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 0,1 M (pH 8,5) durante 5 minutos. Posteriormente se bloqueó utilizando suero de un kit ABC (R.T.U Vectastain), durante una hora y se incubó con anticuerpo primario 1:100 Monoclonal Mouse Anti-Bromodeoxyridine Clone Bu20a (Dako) durante 12 horas a 4°C . Posteriormente, se lavó

el exceso de anticuerpo primario y se añadió el anticuerpo secundario kit ABC (R.T.U Vectastain), durante una hora a temperatura ambiente, para luego añadir una solución con el complejo avidina biotina (R.T.U Vectastain) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente luego de lavar con PBT, se reveló la presencia del anticuerpo secundario por medio de DAB (diaminobencidina) 1:10, durante 6 minutos. Tras este procedimiento se tiñeron los núcleos con hematoxilina (1:10) durante 30 segundos y se deshidrataron las muestras usando una batería de alcoholes y se montó con medio Entellan (Merck Millipore). Se analizaron 3 individuos por tratamiento y se contabilizó el número de células marcadas por cripta intestinal, considerando al azar 36 criptas por individuo.

Contenido calórico de las heces

Se analizó el contenido calórico de las heces fecales de los individuos, al comienzo y al finalizar la aclimatación. Brevemente, las muestras fueron colectadas durante un mismo día para los cuatro tratamientos y estas fueron secadas durante una semana a 60°C en una estufa eléctrica (Universal Oven UN55 Memmert). Luego que se extrajo la totalidad de agua contenida en ellas, se masó el total colectado empleando una balanza electrónica Shimadzu AUX220 ($\pm 0,001$ g) y se midió el contenido calórico presente en un gramo de heces fecales tomados al azar (Boily et al. 2008, Yen et al. 2009), por medio de una bomba calorimétrica 1261 Parr (Bartheld et al. 2015).

Conducta

Conducta en un ambiente conocido

Mediante filmaciones, se analizó la actividad desarrollada en un ambiente conocido (i.e., jaulas en donde fueron aclimatados los individuos) al comenzar y al finalizar la aclimatación. En breve, los roedores fueron filmados durante 10 minutos, en fase de actividad (21:00 a 02:00 horas) en oscuridad absoluta. Los registros se realizaron empleando una cámara infrarroja (Wanscam HW0026) ubicada a 1,5 metros por sobre las jaulas en un soporte articulado. La cámara se conectó a un computador personal, dispuesto en una sala contigua en donde se registraron las filmaciones.

Luego, las conductas presentes en las filmaciones fueron analizadas por medio del software BORIS (*Behavioral Observation Research Interactive Software*) (Friard & Gamba 2016), cuantificando el tiempo destinado a cuatro categorías: actividad general, alimentación, aseo y comportamientos de descanso (Speakman et al. 2001, Zhu et al. 2014).

Conducta exploratoria

Se midió la conducta exploratoria a través de un test de campo abierto (Careau et al. 2009) al comienzo y al final de la aclimatación. Para ello, se empleó un cajón cuadrado de acrílico (espesor de 2 mm) de color blanco, con una superficie interna de 1 m² y altura de 30 cm. Estas mediciones se desarrollaron en fase de actividad (21:00 a 02:00) como se describe brevemente: al comenzar la medición los roedores eran situados al centro del campo y durante 10 minutos fueron filmados en oscuridad empleando una cámara infrarroja (Wanscam HW0026) ubicada a 2 metros por sobre la arena de exploración, en un soporte articulado. La cámara se conectó a un computador personal, dispuesto en una sala contigua en donde se registraron las filmaciones.

Entre cada sesión la superficie fue completamente limpiada con etanol al 70%. Se consideró el correr o caminar, como un índice de exploración (Wilson et al. 1976), por lo tanto, se analizó la distancia recorrida, el tiempo de permanencia al centro de la arena y el tiempo destinado al ingresar al centro de la arena, empleando el software Phobos (Telonis & Margarity 2015).

Handwritten scribble or mark at the top left of the page.

Tabla 2. Número de individuos por tratamiento y por análisis

Variables	Análisis	Estocástica 100% (E-100)	Estocástica 60% (E-60)	Continua 100% (C-100)	Continua 60% (C-60)
		n	n	n	n
BMR		12	12	12	12
Enzimas metabólicas		6	6	6	6
Temperatura corporal		12	12	12	12
Enzimas digestivas		6	6	6	6
Adquisición de energía	Proliferación celular intestinal	3	3	3	3
	Contenido calórico de heces	12	12	12	12
	Conducta	12	12	12	12
Total de individuos		12	12	12	12

Análisis Estadístico

Los promedios de las variables morfológicas y bioquímicas de los diferentes tratamientos fueron comparados a través de ANOVA de una vía, ANOVA factorial y ANCOVA. En los casos en que las variables correlacionaron con la masa corporal, se analizaron los residuos de masas y variables fisiológicas para los análisis de regresión. Además, se evaluó la existencia de posibles asociaciones entre las variables relacionadas con las tasas de gasto de energía y aquellas variables relacionadas con la exploración y actividad general, por medio de correlaciones simples de Pearson. Para los análisis, se emplearon los residuos de la masa corporal sobre aquellas variables que co-variaron con la masa del individuo.

La distribución de las células marcadas con los anticuerpos (i.e., BrdU, Caspasa o histona fosforilada), fue analizada por medio de la comparación de sus distribuciones, empleando la prueba de Kolmogorov-Smirnov con corrección de Bonferroni.

Con el objetivo de analizar la variabilidad en el número de marcas positivas entre criptas en el análisis estadístico, se calculó el coeficiente de estabilización (CoE) para cada individuo. Este cálculo consiste en el recíproco del coeficiente de variación (Liu & Zheng 1989). Luego, un alto valor de CoE, significa que el tejido presenta criptas que responden homogéneamente a los procesos celulares (e.g., presenta poca variabilidad en el número de células marcadas).

Con el objetivo de explorar las relaciones causales entre procesos de mantención y adquisición, se desarrolló un análisis de ecuaciones estructurales (*path analysis*) a través del método de mínimos cuadrados parciales (*Structural Equation Models using the Partial Least Squares: SEMPLS*). Este análisis requiere de un número mínimo de individuos por tratamiento, es por ello que sólo se analizaron variables cuantificadas en el total de individuos, quedando fuera de él los datos enzimáticos (24 individuos) e histológicos (12 individuos). Finalmente, se realizó un análisis multi-grupo, donde se compararon las interacciones entre variables latentes y efectos indirectos obtenidas en cada tratamiento. Todas las interacciones entre variables y parámetros de robustez, fueron analizadas a través de 500 bootstraps. Los análisis se desarrollaron en el programa SmartPLS (Ringle et al. 2015) y Statistica 7.

III
RESULTADOS

RESULTADOS

Efectos de la variabilidad alimentaria a nivel intestinal

Morfología

Tras la aclimatación a diferentes condiciones alimentarias se observó que los roedores presentaron diferencias en el tamaño del intestino delgado (ANCOVA $F_{(3, 28)}=3,420$, $p=0,030$). Específicamente, el grupo aclimatado a una dieta constante al 60% de la ingesta máxima, presentó en promedio intestinos 9,5% más largos que el resto de los tratamientos. Del mismo modo, el análisis de los residuos de la masa del intestino indicó que los individuos aclimatados al tratamiento de alimentación al 60% (en adelante C-60 o E-60) presentaron intestinos de mayor longitud (ANOVA de dos vías $F_{(1, 42)}=6,825$, $p=0,012$, Figura 2). Los residuos de la masa y longitud intestinal correlacionaron positivamente al considerar todos los individuos, explicando la longitud en un 20% a través de la masa ($r^2 = 0,220$; $r = 0,469$; $p = 0,001$, Figura 3). Paralelamente, el grupo de ratones alimentados *ad libitum* y continuamente (C-100) presentaron menor acumulación de tejido adiposo inguinal y menor acumulación de tejido adiposo epididimal que los grupos C-60 y E-100. Además, el grupo C-100 presentó órganos reproductivos mayores que E-60 y una menor masa del estómago que C-60. Finalmente, este último grupo mostró un bazo de mayor

masa que los animales que se aclimataron al régimen E-60 (Ver todas las comparaciones en la tabla 3).

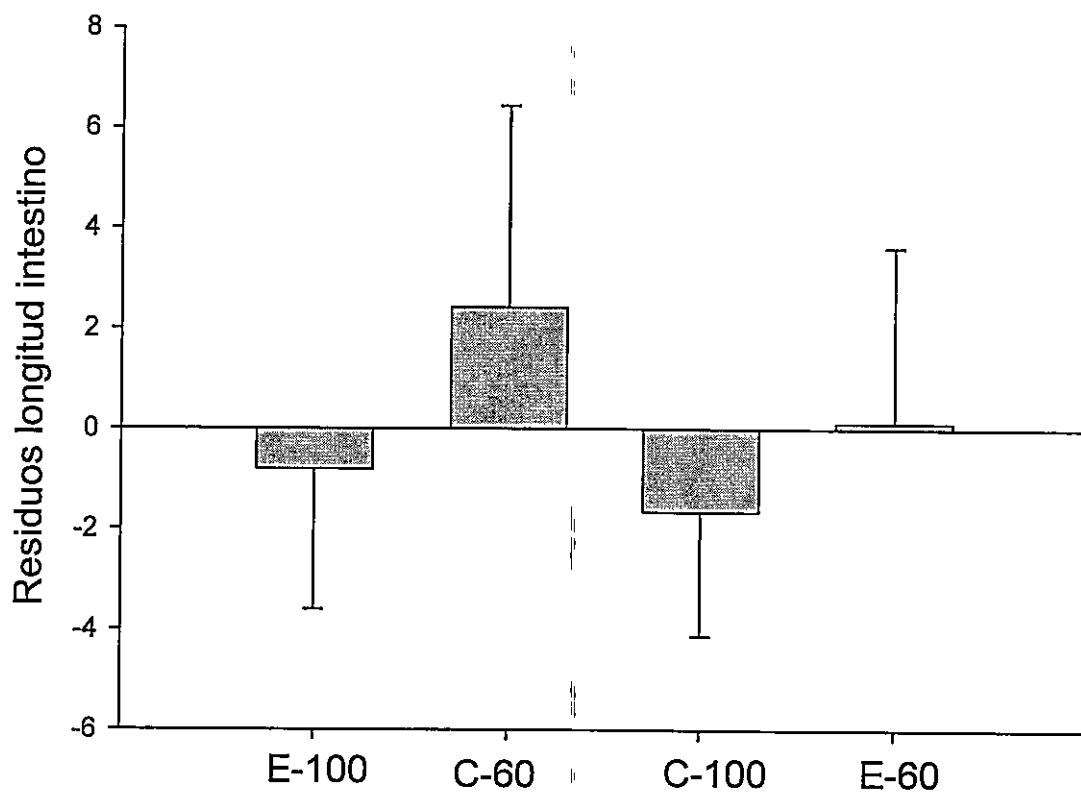


Figura 2. Comparación de residuos de longitudes de intestinos de machos adultos de *Mus musculus* (Balb/c) aclimatados durante 20 días a cuatro tratamientos con dos factores: regímenes calóricos (*ad libitum* y 60%) y dos regímenes periódicos (continuos y estocásticos).

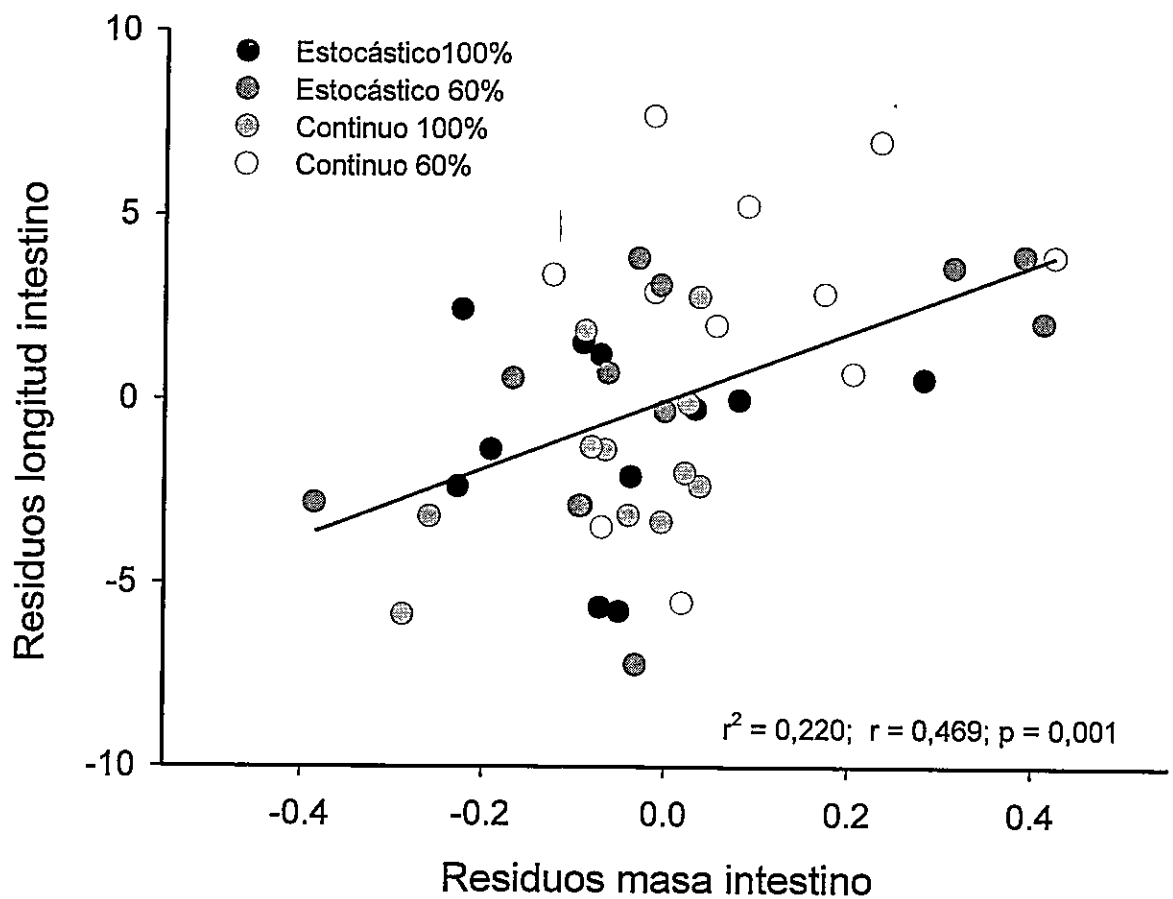


Figura 3. Relación entre los residuos de masa y residuos de longitudes, de intestinos de machos adultos de *Mus musculus* (Balb/c) aclimatados durante cuatro semanas a cuatro tratamientos con dos factores: regímenes calóricos (*ad libitum* y 60%) y dos regímenes periódicos (continuos y estocásticos)

Tabla 3. Masas y análisis de ANCOVA de órganos provenientes de ratones machos (Balb/c) aclimatados a cuatro regímenes dietarios. Abreviaciones, C-100: alimentación continua y *ad libitum* (100%); C-60: alimentación continua y al 60% del consumo *ad libitum*; E-100: alimentación estocástica con oferta equivalente al 100%; E-60: alimentación estocástica con oferta equivalente al 60%. Superíndices diferentes indican diferencias significativas luego de una prueba *a posteriori* de Tukey.

Variables (g)	C-100	C-60	E-100	E-60	F _(3,39)	p
Masa corporal F _(3,42)	28,166 ± 2,618	29,289 ± 4,182	28,114 ± 1,978	26,558 ± 2,573	1,703	0,181
Corazón	0,181 ± 0,019	0,207 ± 0,061	0,193 ± 0,022	0,12 ± 0,045	0,870	0,464
Hígado	1,512 ± 0,209	1,573 ± 0,261	1,408 ± 0,189	1,409 ± 0,293	0,891	0,454
Tejido adiposo epididimal	0,316 ± 0,117 ^a	0,488 ± 0,306 ^{b,c}	0,531 ± 0,158 ^b	0,366 ± 0,193 ^{a,c}	5,407	0,003
Tejido adiposo inguinal	0,205 ± 0,085 ^a	0,444 ± 0,294 ^b	0,354 ± 0,128 ^b	0,367 ± 0,205 ^b	6,640	0,001
Sistema reproductor	0,754 ± 0,108 ^a	0,690 ± 0,077 ^{a,b}	0,701 ± 0,068 ^{a,b}	0,648 ± 0,087 ^b	2,981	0,042

Continuación página anterior

Variables (g)	C-100	C-60	E-100	E-60	F(3,39)	P
Estómago	0,194 ± 0,027 ^a	0,255 ± 0,060 ^b	0,214 ± 0,031 ^{a,b}	0,226 ± 0,057 ^{a,b}	4,301	0,010
Intestino delgado	1,072 ± 0,122	1,239 ± 0,167	1,087 ± 0,156	1,158 ± 0,238	1,980	0,132
Intestino grueso	0,363 ± 0,050	0,364 ± 0,068	0,346 ± 0,052	0,371 ± 0,068	0,326	0,806
Ciegos intestinales	0,209 ± 0,036	0,204 ± 0,027	0,207 ± 0,050	0,205 ± 0,064	0,102	0,958
Riñón	0,505 ± 0,058	0,517 ± 0,070	0,52 ± 0,043	0,499 ± 0,047	0,271	0,846
Bazo	0,134 ± 0,036 ^a	0,117 ± 0,027 ^{a,b}	0,109 ± 0,022 ^{a,b}	0,092 ± 0,013 ^b	4,451	0,009

Proliferación celular

No se encontraron diferencias en las medias de marcas de células BrdU+ por cripta una vez finalizados los tratamientos (ANOVA $F_{(3, 8)} = 0,570$, $p=0,650$). En la Figura 4 se muestran imágenes representativas de los resultados de histología.

El análisis de distribución de células BrdU+, indicó que el grupo C-60 presentó una distribución diferente a los restantes grupos (Kolmogorov-Smirnov: $p < 0,008$, ver tabla 4). En los histogramas se observan cinco puntos de alta frecuencia, los cuales están presentes en los cuatro tratamientos. En estos máximos, se aprecia una reducción del primero de ellos en el grupo C-60 respecto a los demás, y una mayor frecuencia entre 7-10, 12-14 y 15 a 20 células BrdU+ (Figura 5).

Tabla 4. Comparación de las distribuciones de células BrdU+ por criptas. Se comparó entre cuatro regímenes alimentarios, mediante la comparación de Kolmogorov-Smirnov de dos conjuntos de datos. Se consideró la corrección de Bonferroni sobre los p-valores (diferencias en $p < 0,0083$).

Tratamientos	C-60	E-60	C-100	E-100
C-60		0,002	0,001	0,008
E-60	0,002		0,062	0,125
C-100	0,001	0,062		0,996
E-100	0,008	0,125	0,996	

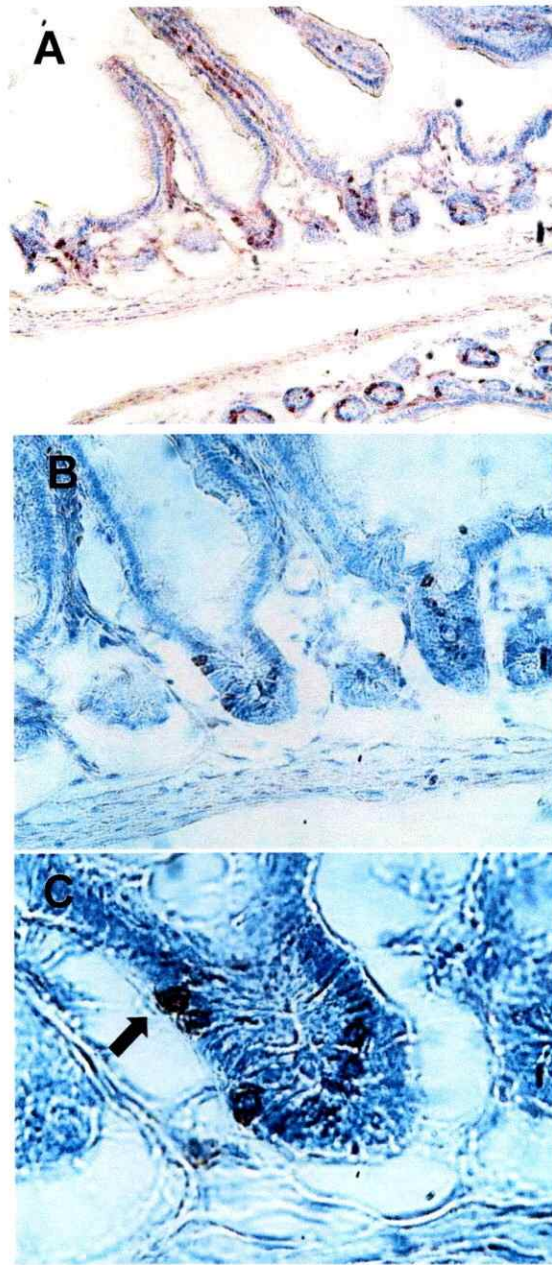


Figura 4. Imágenes representativas de tinciones inmunohistoquímicas, realizadas en una sección longitudinal de intestino delgado. Se observan células BrdU+ a tres aumentos. A) 20X, B) 40X y C) 100X. Flecha indica célula BrdU+ individualizada en una cripta.

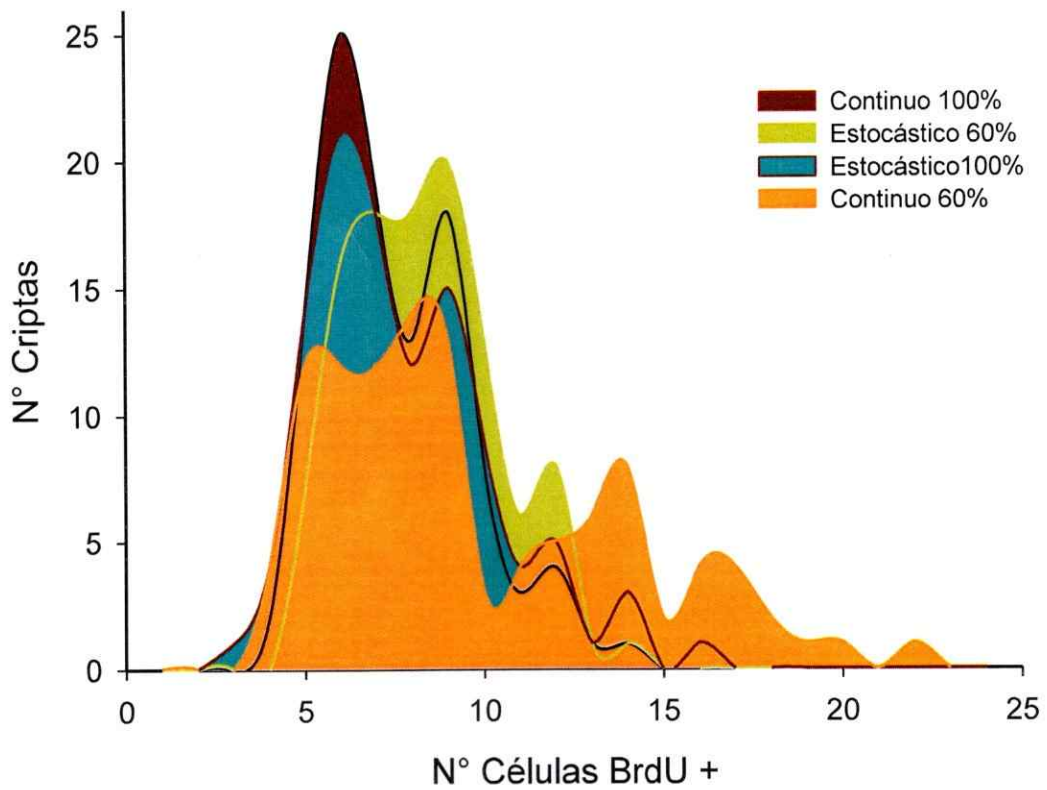


Figura 5. Histograma de frecuencias absolutas de criptas intestinales indicando números de células BrdU+, provenientes de machos adultos de *Mus musculus* (Balb/c) aclimatados a cuatro tratamientos con dos factores: regímenes calóricos (*ad libitum* y 60%) y dos regímenes periódicos (continuos y estocásticos), durante cuatro semanas. Ver el texto para más detalles.

Proliferación celular y morfología macroscópica

En relación a los valores de CoE para las células BrdU+, no se encontraron diferencias entre los tratamientos experimentales (ANOVA $F_{(3,8)}=1,095$, $p=0,406$). Sin embargo, este índice presentó una relación positiva con la masa corporal ($r^2 = 0,436$; $r = -0,66$; $p = 0,019$). Además, se encontró una relación positiva y significativa entre los residuos de CoE para las células BrdU y los residuos de la longitud intestinal ($r^2 = 0,751$; $r = 0,867$; $p < 0,001$, Figura 6). Del mismo modo, se observó una relación positiva entre CoE para caspasa y la longitud intestinal ($r^2 = 0,415$; $r = 0,645$; $p = 0,024$).

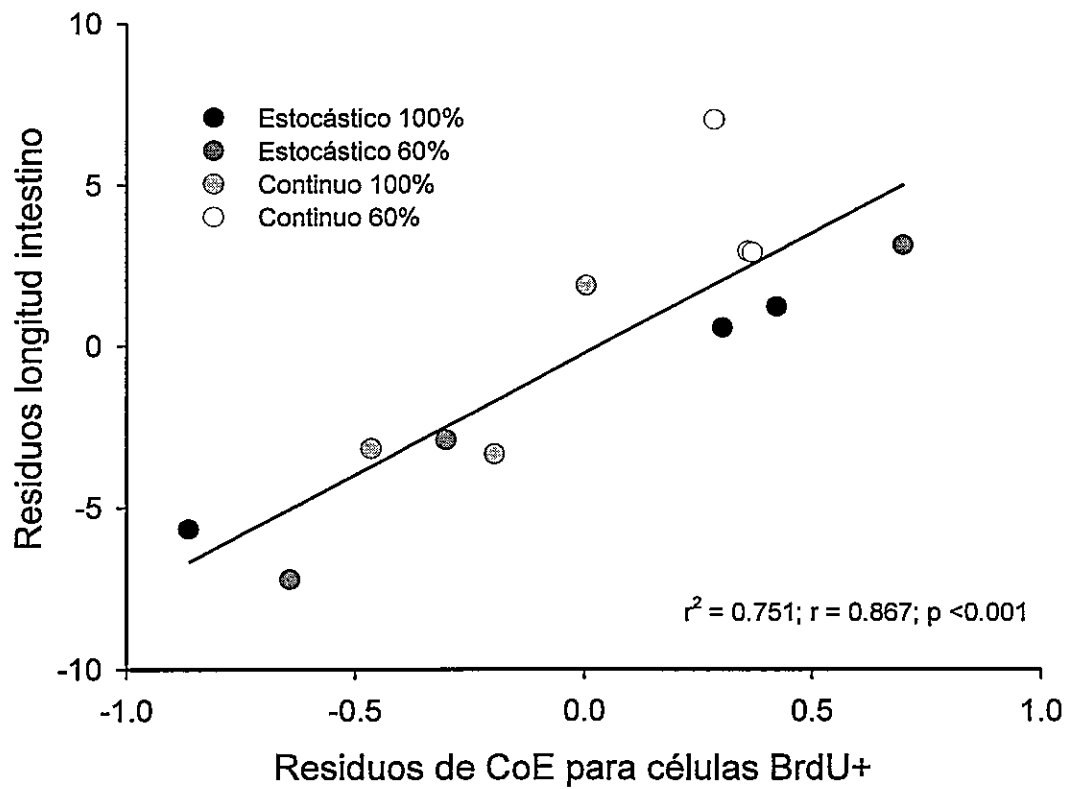


Figura 6. Correlación entre los residuos de longitud intestinal y el coeficiente de estabilización (CoE) del número de células BrdU + por cripta intestinal. A partir de intestinos de machos adultos de *Mus musculus* (Balb/c) aclimatados a cuatro tratamientos con dos factores: regímenes calóricos (*ad libitum* y 60%) y dos regímenes periódicos (continuos y estocásticos), durante cuatro semanas.

Capacidades digestivas

La magnitud de las actividades de enzimas hidrolíticas del intestino delgado fue similar entre tratamientos (ANOVA maltasa: $F_{(3, 20)}=0,685$, $p=0,572$; sacarasa: $F_{(3, 20)}=1,749$, $p=0,189$ y N-aminopeptidasa $F_{(3, 20)}=0,378$, $p=0,770$). Sin embargo, se encontró una relación positiva entre la actividad de las aminopeptidasas intestinales (estandarizadas por gramo de proteína) y el CoE para células BrdU+ ($r^2 = 0,514$; $r = 0,717$; $p = 0,009$, Figura 7).

Además, el análisis del contenido calórico de las heces, indicó que no hubo diferencias al inicio de la aclimatación ($F_{(3, 40)}=0,889$, $p=0,455$). No obstante, tras las cuatro semanas de aclimatación los individuos del grupo C-60, mostraron una reducción significativa respecto a la condición *ad libitum* ($F_{(3, 43)}=3,726$, $p=0,018$, Figura 8). Además, se encontró un efecto significativo de la periodicidad y el régimen calórico (ANOVA factorial $F_{(1,43)}=5,800$, $p=0,020$; $F_{(1,43)}=4,176$, $p=0,047$, respectivamente).

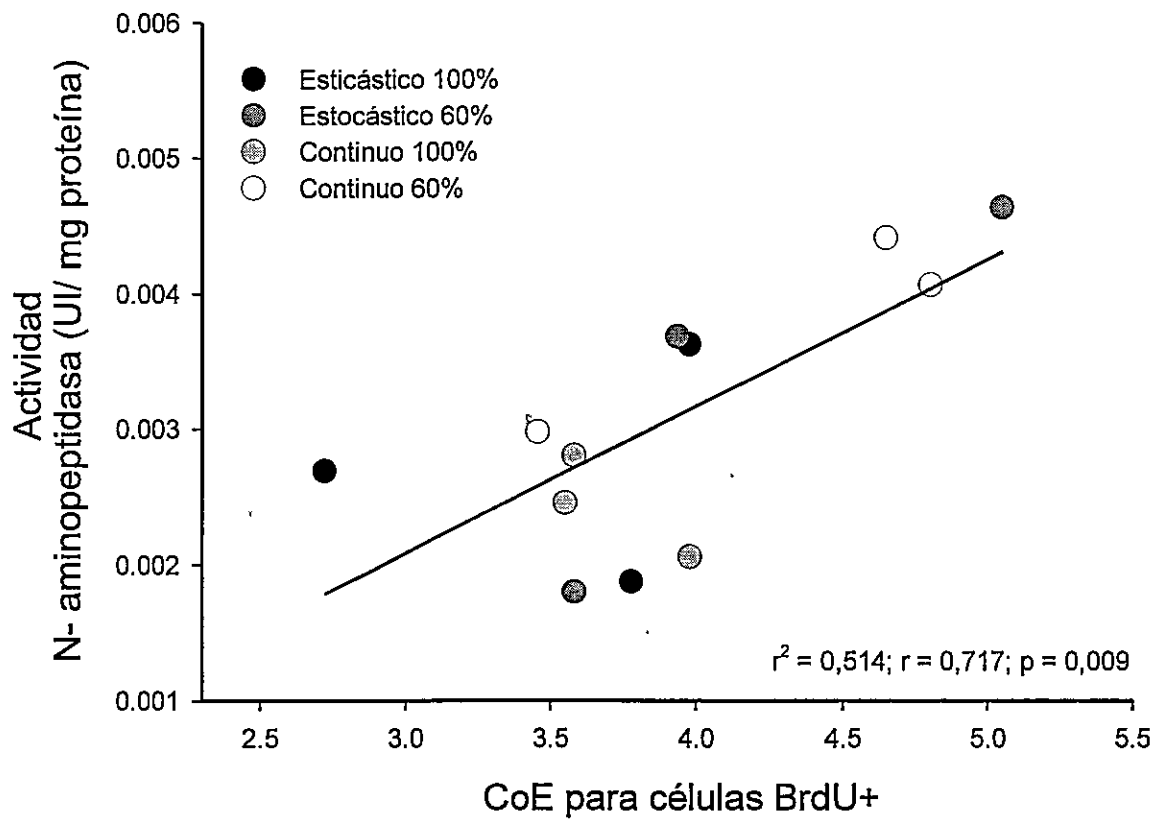


Figura 7. Relación observada en individuos de *Mus musculus* entre la actividad de la n-aminopeptidasa intestinal y el coeficiente de estabilización del número de células BrdU+ por cripta intestinal después de someterse a cuatro tratamientos alimentarios diferentes durante 20 días.

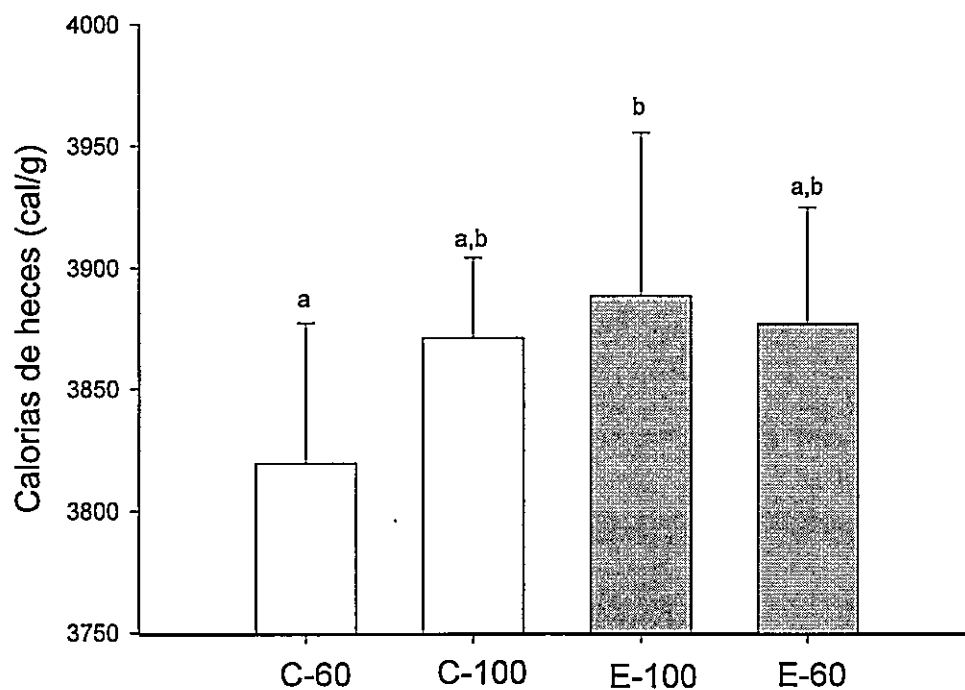


Figura 8. Contenido calórico de heces, en roedores bajo diferentes tratamientos alimentarios. Efecto de regímenes alimentarios en el contenido calórico de heces (ANOVA Factorial), de machos adultos de *Mus musculus* (Balb/c) aclimatados a cuatro tratamientos con dos factores: regímenes calóricos (*ad libitum* y 60%) y dos regímenes periódicos y estocástico), durante cuatro semanas. Abreviaciones C-100: alimentación continua y *ad libitum* (100%); C-60: alimentación continua y al 60% del consumo *ad libitum*; E-100: alimentación estocástica con oferta equivalente al 100%; E-60: alimentación estocástica con oferta equivalente al 60 %.

Dinámica de cambios morfológicos en el intestino delgado luego de un tratamiento de alimentación continua y al 60% del consumo ad libitum

Dada las diferencias encontradas, se analizó la morfología y rasgos histológicos en individuos del tratamiento C-60 a los días 3, 9 y 20 de aclimatación (n=5 en cada grupo). Respecto a la longitud y masa, no se encontró diferencias significativas entre los grupos (ANOVA $F_{(2, 17)}=0,859$, $p=0,441$). Sin embargo, el análisis de regresión lineal reveló un incremento de la longitud total del intestino delgado a través del tiempo. De esta manera, se encontró que la longitud del intestino es predicha del siguiente modo: Longitud del intestino delgado [cm] = $36,252 + 0,223 \cdot \text{días}$ ($r^2 = 0,227$; $r = 0,476$; $p = 0,029$, Figura 9), con una tasa de crecimiento de 0,223 centímetros por día. El tamaño de intestino, además se relacionó positivamente con el CoE para células BrdU+, tanto para la masa húmeda del órgano, así como para los residuos de la longitud ($r^2 = 0,546$; $r = 0,739$; $p = 0,023$ y $r^2 = 0,648$; $r = 0,805$; $p = 0,009$, respectivamente). En el análisis de distribución de células BrdU+ en las criptas intestinales, sólo se encontró diferencias entre el día 20 y los días 3 y 9 (Kolmogorov-Smirnov $p < 0,001$; Figura 10).

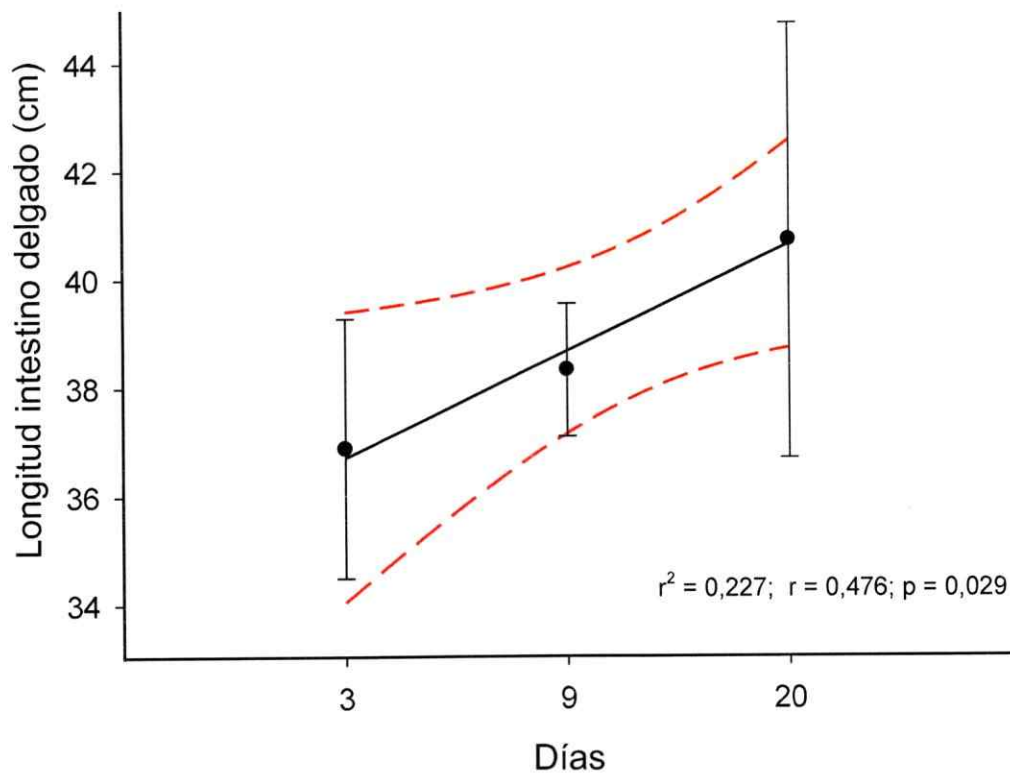


Figura 9. Tamaño del intestino delgado en función del tiempo al cual son aclimatados machos adultos de *Mus musculus* (Balb/c) a un tratamiento de reducción calórica al 60% de la ingesta *ad libitum*. Líneas rojas segmentadas indican un intervalo de confianza del 95%.

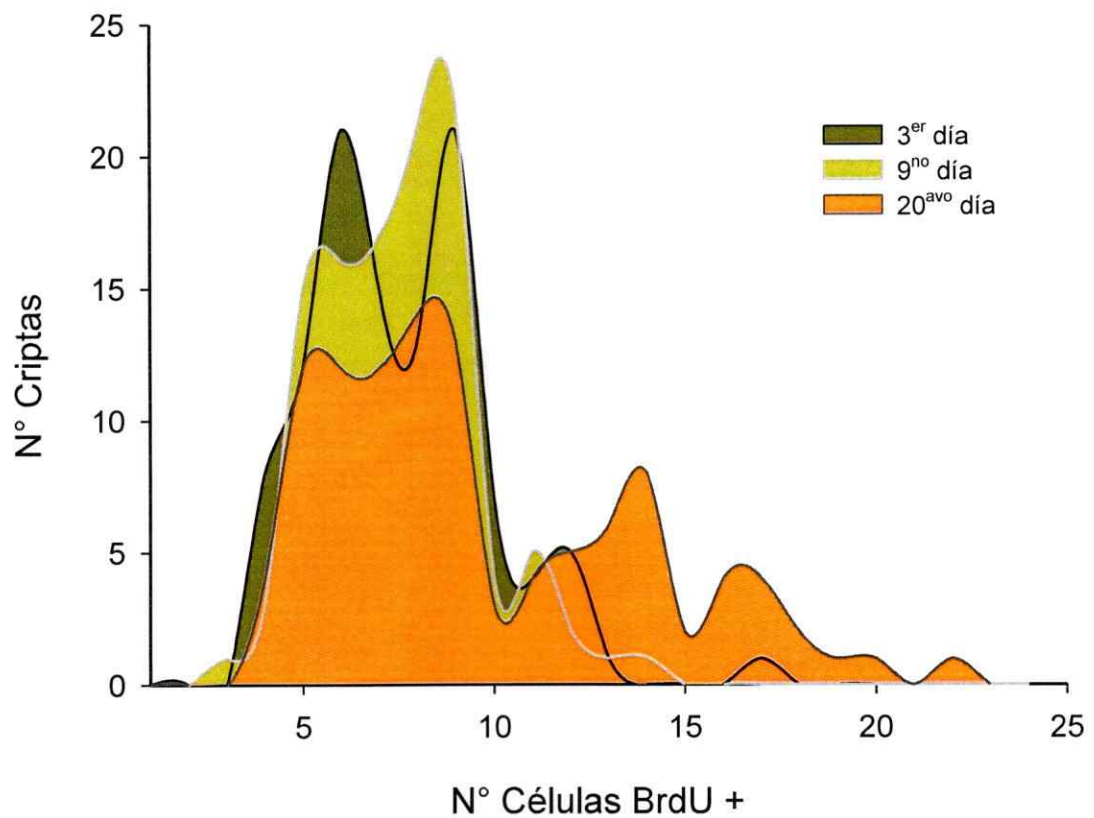


Figura 10. Histograma de frecuencias absolutas de criptas intestinales con diferentes números de células BrdU +, de machos adultos de *Mus musculus* (Balb/c) aclimatados en diferentes momentos a un régimen de alimentación continua de restricción calórica al 60%. Ver el texto para más detalles.

Asociaciones entre cambios intestinales y energéticos

Respecto a la relación entre el tamaño del intestino y variables de mantención, se encontró una relación inversa entre los residuos de la tasa metabólica basal y los residuos de la masa del intestino ($r^2 = 0,110$; $r = -0,327$; $p = 0,03$, Figura 11). Además individuos con mayores tamaños intestinales presentaron menores contenidos calóricos en sus heces ($r^2 = 0,124$; $r = -0,35$; $p = 0,033$).

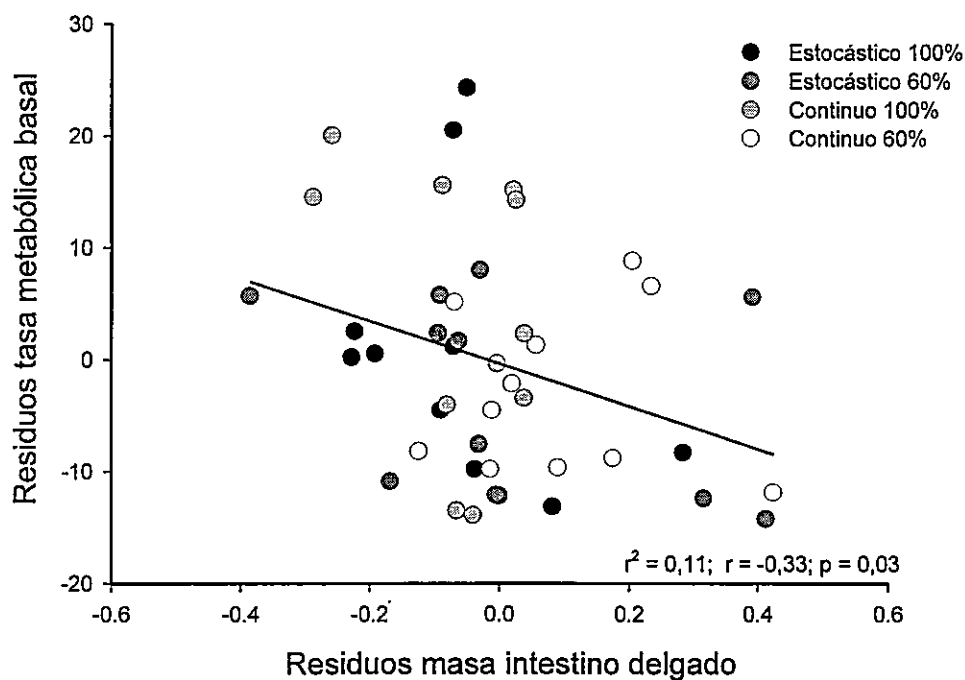


Figura 11. Relación entre tasas de gastos de energía y masa del intestino delgado en individuos de *Mus musculus*, tras estar bajo cuatro tratamientos alimentarios durante 20 días.

Además del efecto del metabolismo basal y la extensión del intestino, se pudo determinar que la temperatura promedio de los animales en los días de inanición se relacionó negativamente con el cociente BrdU/Histona fosforilada, de células marcadas por cripta intestinal ($r^2 = 0,349$; $r = -0,591$; $p = 0,043$). Así también, se encontró que la temperatura máxima y mínima de la superficie corporal se correlacionaron negativamente con el residuo del coeficiente de estabilización de histona fosforilada ($r^2 = 0,695$; $r = -0,834$; $p = 0,039$ y $r^2 = 0,738$; $r = -0,859$; $p = 0,028$, respectivamente).

Además se encontró una relación negativa entre la tasa de recambio celular en el epitelio intestinal (N° células BrdU+/ N° células Caspasa +) y la tasa metabólica basal total ($r^2 = 0,324$; $r = -0,569$; $p = 0,043$).

Función intestinal

Se detectó a nivel de las capacidades digestivas, una relación inversa entre la temperatura máxima registrada en los individuos y la actividad de la sacarasa ($r^2 = 0,379$; $r = -0,616$; $p = 0,002$) y tanto entre temperaturas máximas y mínimas con la actividad de n-aminopeptidasas intestinales ($r^2 = 0,343$; $r = -0,586$; $p = 0,058$ y $r^2 = 0,448$; $r = -0,669$; $p = 0,024$, respectivamente, Figura 12). Además se encontró una relación inversa entre los residuos de la masas del hígado y las calorías por gramo de heces ($r^2 = 0,096$; $r = -0,309$; $p = 0,039$).

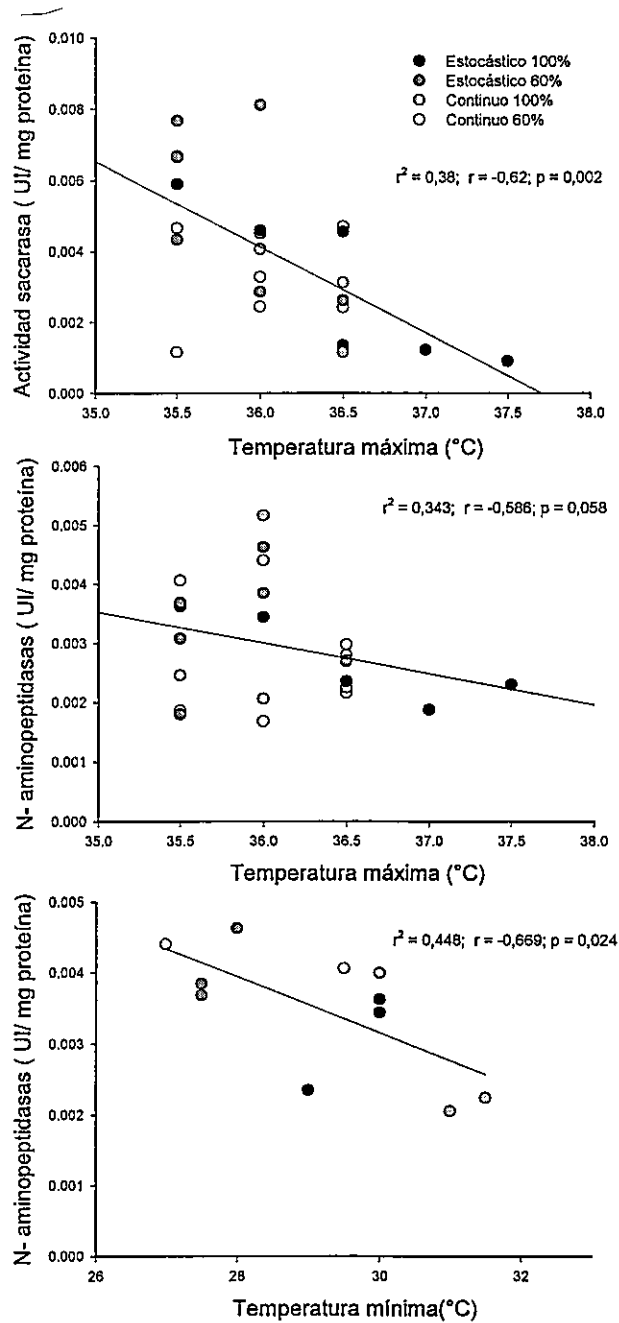


Figura 12. Relaciones entre temperatura superficial del dorso de individuos de *Mus musculus* y la actividad de enzimas intestinales, tras 20 días de aclimatación a cuatro tratamientos alimentarios diferentes.

Efectos de la variabilidad alimentaria a nivel conductual

Asociaciones entre cambios conductuales y energéticos

Se observó que los individuos aclimatados a estocasticidad alimentaria presentaron mayores trayectorias durante la prueba de exploración (~12 metros en promedio), en comparación con los roedores alimentados continuamente (ANOVA factorial $F_{(1, 39)}=0,098$, factor periodicidad $p=0,010$, Figura 13). Además, se encontró una tendencia a formar una relación negativa entre la ingesta calórica de los roedores y la cantidad de cuadros atravesados en la arena (20 x 20 cm) ($r^2 = 0,1600$; $r = -0,400$; $p = 0,072$). No obstante, se observó una relación inversa significativa entre la tasa metabólica total y la trayectoria realizada en el test de campo abierto ($r^2 = 0,219$; $r = -0,468$; $p = 0,033$, Figura 14). Además se identificó una relación negativa, aunque débil, entre esta variable conductual y la masa del hígado ($r^2 = 0,086$; $r = -0,293$; $p = 0,048$) y la masa del bazo ($r^2 = 0,096$; $r = -0,309$; $p = 0,041$). También se encontró una relación positiva entre el desplazamiento de los individuos en la prueba de exploración y las actividades enzimáticas de CS y COX en sus apéndices locomotores posteriores ($r^2 = 0,439$; $r = 0,662$; $p < 0,001$ y $r^2 = 0,338$; $r = 0,582$; $p = 0,003$, respectivamente).

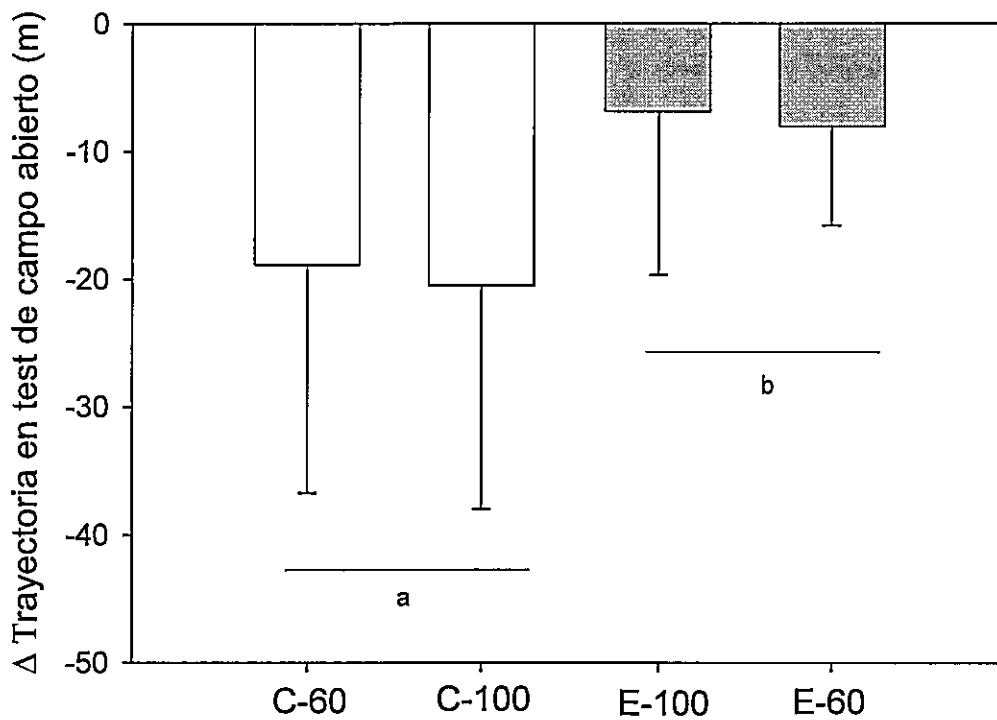


Figura 13. Efecto de diferentes tratamientos alimentarios sobre la distancia recorrida en un test de campo abierto (trayectoria final experimento- trayectoria inicio experimento) por machos adultos de *Mus musculus* (Balb/c) aclimatados durante 20 días a cuatro tratamientos con dos factores. Abreviaciones C-100: alimentación continua y *ad libitum* (100%); C-60: alimentación continua y al 60% del consumo *ad libitum*; E-100: alimentación estocástica con oferta equivalente al 100%; E-60: alimentación estocástica con oferta equivalente al 60%.

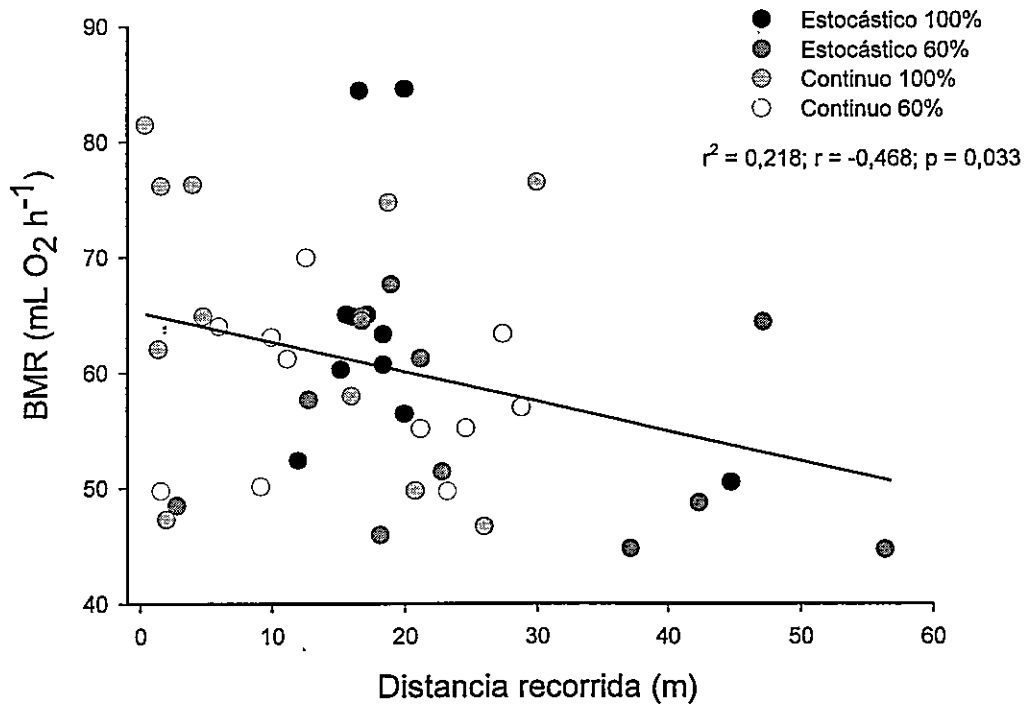


Figura 14. Relación entre las tasas de gasto de energía y la trayectoria recorrida, en un test de campo abierto por individuos machos de *Mus musculus* (Balb/c), sometidos a diferentes tratamientos alimentarios con dos factores: regímenes calóricos (*ad libitum* y 60%) y dos regímenes periódicos (continuos y estocásticos).

Conducta en ambiente conocido

Se observó que los individuos que destinaron un alto porcentaje del tiempo a descansar durante la fase de actividad, presentaron tanto mayores residuos de tasas metabólicas, como tasas metabólicas masa específicas más altas ($r^2 = 0,233$; $r = 0,483$; $p = 0,001$ y $r^2 = 0,275$; $r = 0,524$; $p < 0,001$, respectivamente, Figura 15). En esta misma línea, se halló una relación positiva entre el porcentaje de tiempo destinado a descanso y los residuos de la masa del hígado ($r^2 = 0,116$; $r = 0,341$; $p = 0,025$) y una negativa entre el porcentaje de tiempo en que los animales se encontraron activos en escotofase y la actividad hepática de COX estandarizado por masa ($r^2 = 0,214$; $r = -0,462$; $p = 0,026$, Figura 16). Para la enzima CS en el hígado, solo se observó una tendencia en la relación negativa con el porcentaje de tiempo en actividad ($r^2 = 0,163$; $r = -0,404$; $p = 0,056$).

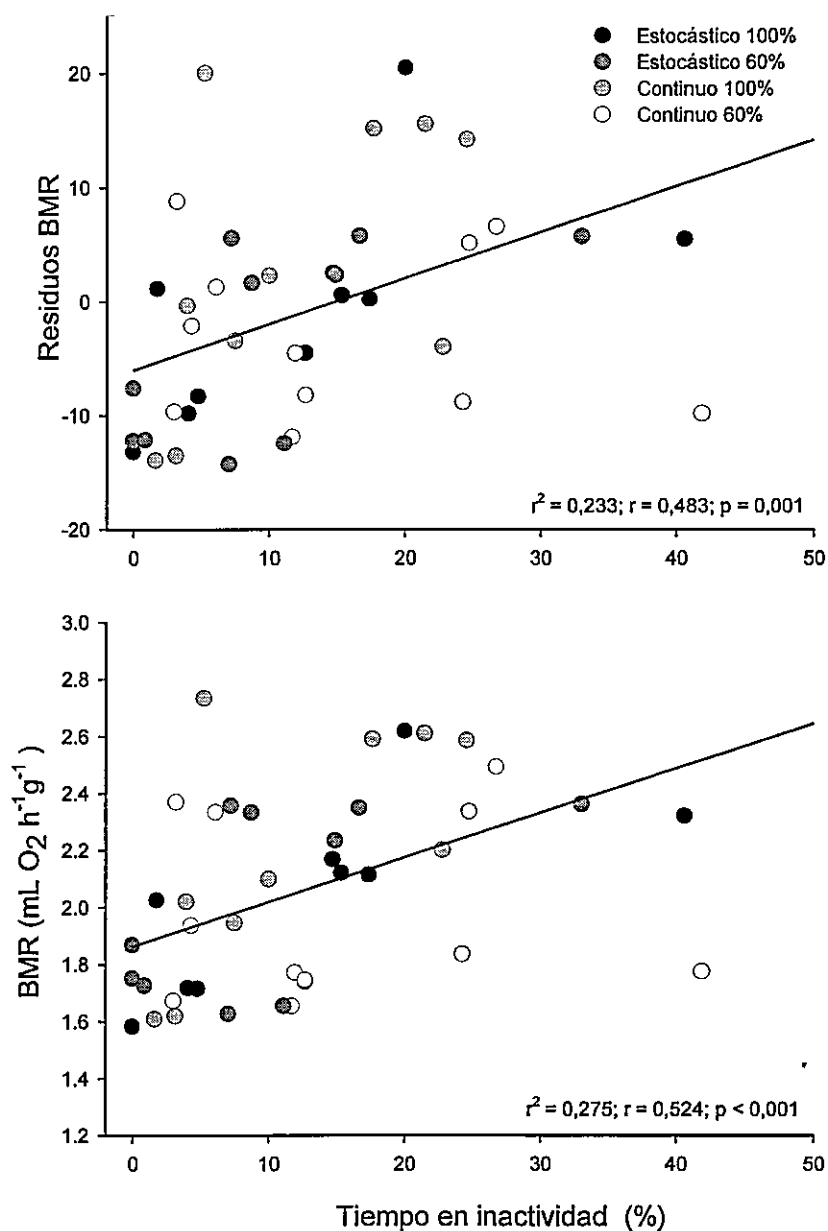


Figura 15. Relaciones entre tasas de gasto de energía corregidas por masa corporal y el porcentaje de tiempo de descanso o inactividad de individuos de *Mus musculus*, sometidos a diferentes tratamientos alimentarios durante 20 días. La actividad fue analizada en sus jaulas durante la escotofase.

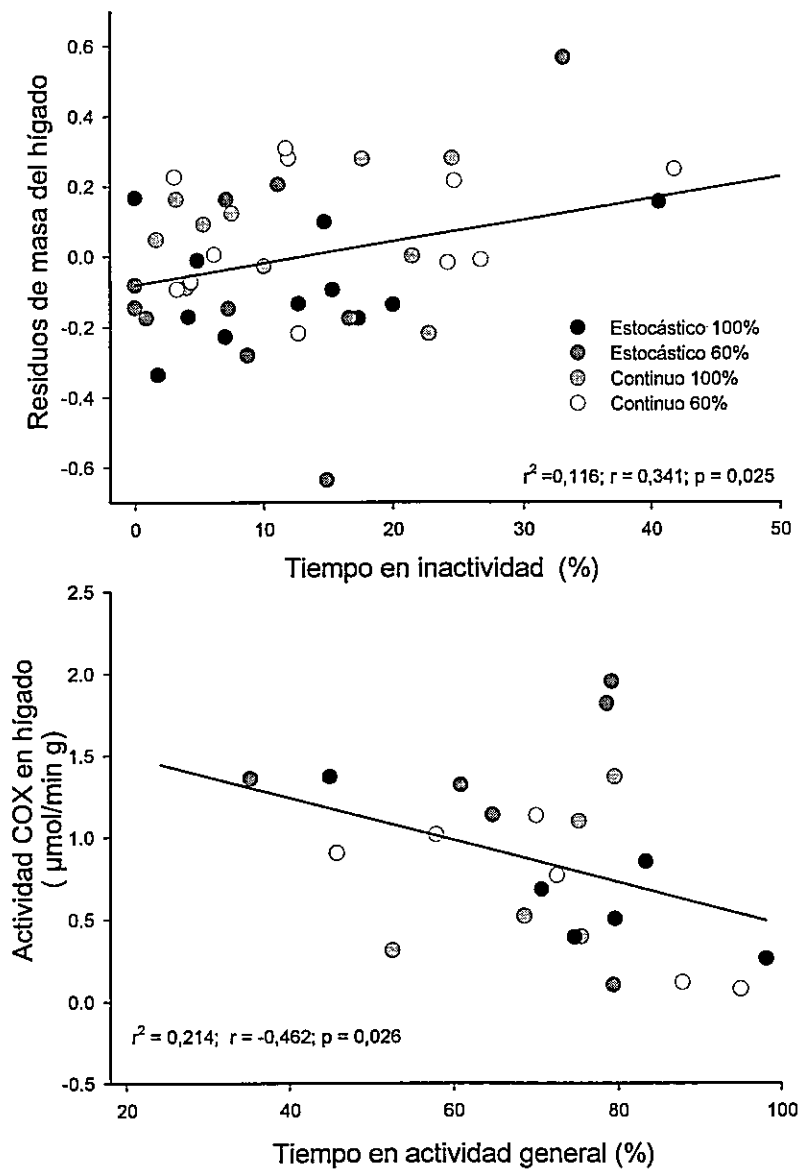


Figura 16. Relaciones entre el tamaño de hígado corregido por masa corporal y la actividad catabólica de este órgano y la conducta de individuos de *Mus musculus*, sometidos a diferentes tratamientos alimentarios durante 20 días. La actividad fue analizada en sus jaulas durante la escotofase.

Respecto a la temperatura corporal y la actividad de los roedores, se encontró que los individuos con mayores temperaturas superficiales, tanto mínima como promedio, destinaron mayor parte del tiempo a descansar ($r^2 = 0,202$; $r = 0,450$; $p = 0,003$ y $r^2 = 0,100$; $r = 0,316$; $p = 0,039$, respectivamente, Figura 17).

Termogénesis y temperatura corporal

No se encontró diferencias significativas entre tratamientos de la termogénesis no tiritante (TNT) inducida por norepinefrina, ni considerando el metabolismo masa específico, ni los residuos ($F_{(3, 20)}=1,486$, $p=0,249$ y $F_{(3, 20)}=1,299$, $p=0,302$, respectivamente). No obstante, la TNT se correlacionó positivamente con las temperaturas mínimas registradas en la superficie dorsal de los individuos ($r^2 = 0,120$; $r = 0,447$; $p = 0,037$) y además presentó una tendencia positiva con los residuos de la masa del hígado ($r^2 = 0,334$; $r = 0,578$; $p = 0,063$).

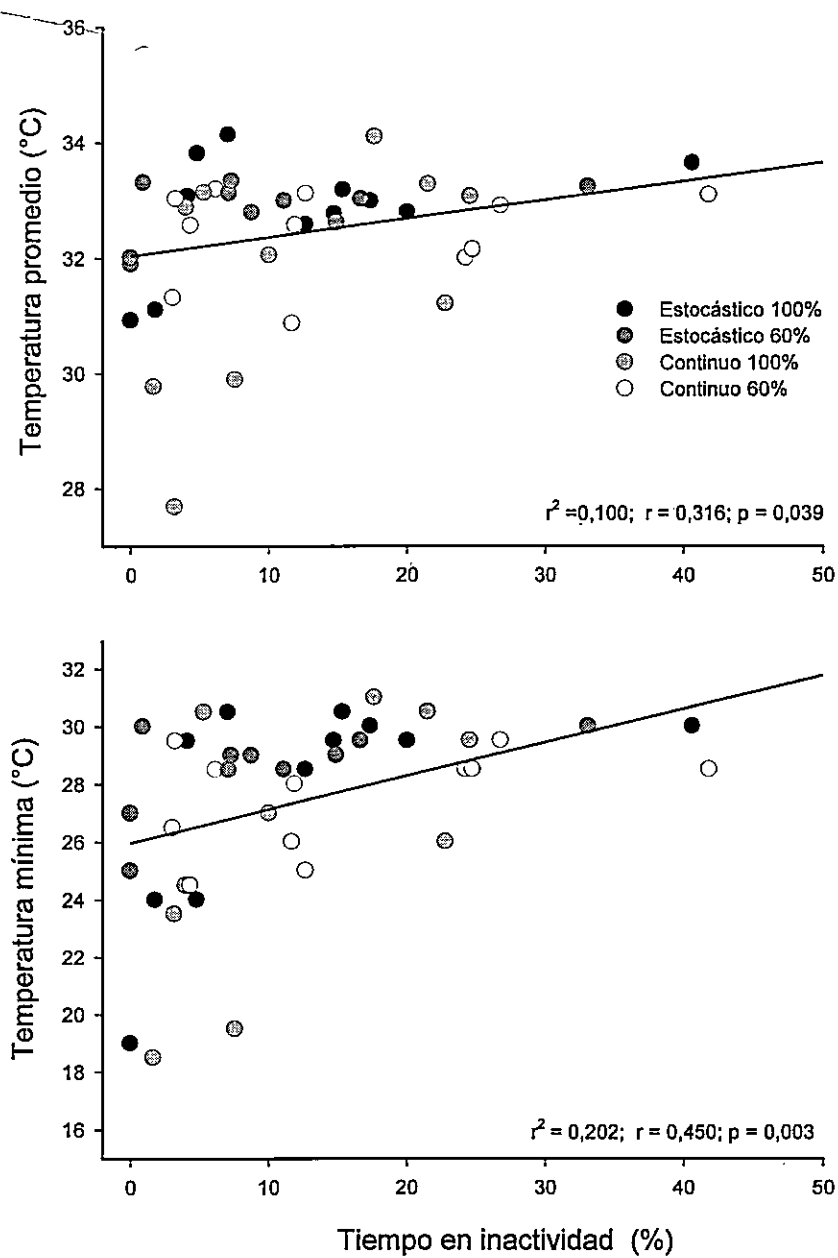


Figura 17. Relaciones entre temperaturas superficiales y el porcentaje de tiempo de descanso o inactividad de individuos de *Mus musculus*, sometidos a diferentes tratamientos alimentarios durante 20 días. La actividad fue analizada en sus jaulas durante la escotofase.

Se observó una relación negativa entre la temperatura mínima registrada en la superficie de los individuos y el porcentaje de tiempo que se encontraron activos ($r^2 = 0,095$; $r = -0,308$; $p = 0,045$ en ajuste lineal, y $r^2 = 0,166$; $r = 0,407$; $p = 0,027$ en ajuste cuadrático, Figura 18).

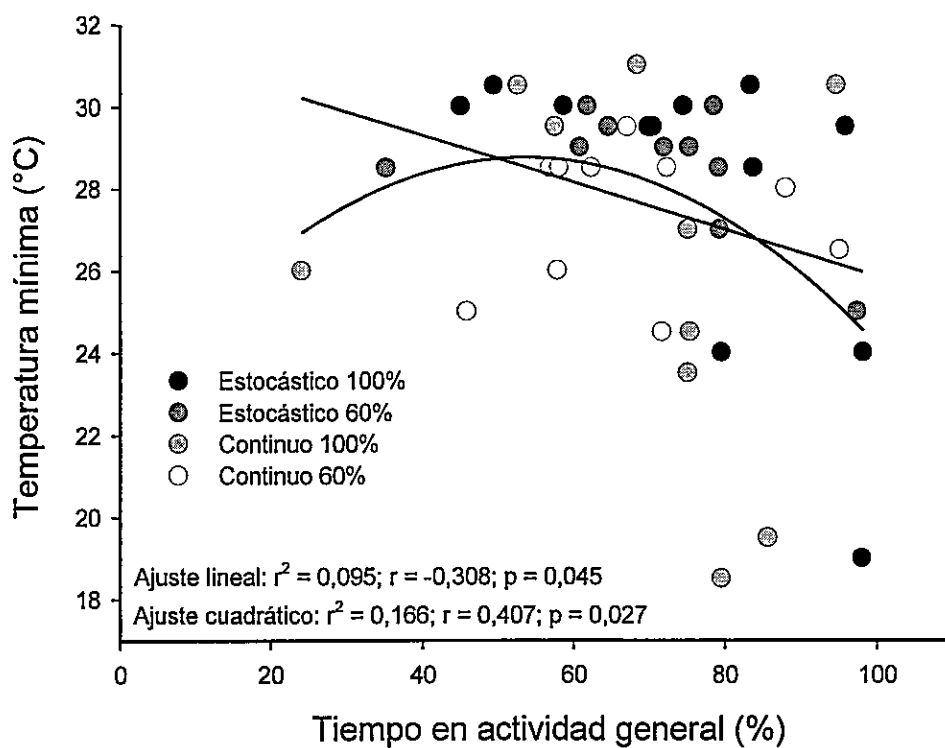


Figura 18. Relación observada en individuos de *Mus musculus* entre temperatura mínima superficial dorsal y tiempo asignado a actividad general en sus jaulas (ambiente conocido), tras estar sometidos a cuatro tratamientos alimentarios durante 20 días.

Correlaciones funcionales entre procesos de adquisición de energía

Conducta y capacidades fisiológicas locomotoras

Se encontró una relación positiva entre el porcentaje de tiempo destinado a la alimentación y la actividad catabólica (CS masa específica) de las extremidades posteriores ($r^2 = 0,600$; $r = 0,775$; $p < 0,001$). Así también, se observó que los individuos que presentaron una alta actividad de CS y COX, estandarizada por proteínas de las extremidades posteriores, a su vez mostraron mayores desplazamientos sobre la superficie del test de campo abierto (en cuadrados atravesados de 20 x 20 cm) ($r^2 = 0,439$; $r = 0,662$; $p < 0,001$ y $r^2 = 0,338$; $r = 0,582$; $p = 0,003$, respectivamente). En esta misma línea, se encontró una relación positiva entre la actividad de COX estandarizada por proteína en las extremidades inferiores y la trayectoria recorrida ($r^2 = 0,338$; $r = 0,582$; $p = 0,003$).

Conducta y capacidades intestinales

Se encontró una tendencia a que los animales más exploradores o activos presentaron mayores capacidades digestivas, revelada por una asociación positiva entre el porcentaje de tiempo destinado a actividad general y el residuo del coeficiente de estabilización de histona fosforilada ($r^2 = 0,276$; $r = 0,526$; $p = 0,079$). No obstante, se observó una relación positiva y significativa entre la actividad de las n-aminopeptidasas intestinales y el tiempo

empleado por los roedores en permanecer al centro de la arena de exploración ($r^2 = 0,215$; $r = 0,464$; $p = 0,023$). En relación a variables relacionadas con la capacidad del sistema digestivo completo, se observó una relación inversa entre el porcentaje de tiempo destinado a descansar durante la escotofase y el contenido calórico total de las heces ($r^2 = 0,204$; $r = -0,452$; $p = 0,040$).

Enzimas digestivas y células intestinales

Se observó una relación positiva entre la actividad de las n-aminopeptidasas intestinales y el coeficiente de estabilización de células BrdU+ ($r^2 = 0,514$; $r = 0,717$; $p = 0,009$, véase figura 6). No obstante no se encontró ninguna correlación significativa del coeficiente de estabilización de células BrdU+ con las actividades de disacaridasas intestinales (maltasa: $p = 0,845$; sacarasa: $p = 0,627$).

Modelos de vías, análisis de SEMPLS

Efectos directos

Se elaboraron 30 modelos mecanicistas utilizando variables morfológicas y conductuales a través de variables latentes (constructos elaborados a partir de una o varias variables cuantitativas), constituidas por variables reflexivas (efectos) y formativas (causas), con el objetivo de explorar las relaciones causales entre procesos de mantención y adquisición. Se optó por el modelo con mayor significancia estadística en los coeficientes de vías. Este modelo se presenta en la Figura 19, y en ella las flechas indican el grado de correlación existente entre las variables (coeficientes de vía) y el grado de significancia estadística.

En relación a las capacidades digestivas, se encontró una relación positiva entre la ingesta (contenido calórico ingerido) y las tasas de gasto energético (Residuos de BMR), la temperatura corporal (temperaturas mínimas, máximas y promedio) y la generación de reservas (residuos hígado y residuos de tejido adiposo inguinal + tejido adiposo epididimal + grasa parda supra escapular). Luego, la capacidad digestiva (constructo que incorpora masa, longitud y las calorías por g de heces), se relacionó de manera inversa con las tasas de gasto de energético.

En relación a la conducta, la actividad desarrollada por los roedores en un ambiente conocido (actividad cotidiana) se relacionó negativamente con la temperatura corporal de los individuos. Por otra parte, el incremento de la actividad exploratoria es congruente con

una mayor cantidad de reservas grasas al mismo tiempo que presentaría compromisos con las capacidades digestivas. Además, se aprecia una relación inversa entre las tasas de gasto de energía y la acumulación de reservas lipídicas.

Efectos indirectos

A través del análisis de vías se determinó la presencia de efectos indirectos negativos entre la ingesta calórica y la actividad cotidiana y entre la ingesta y la capacidad digestiva. En la tabla 5, se presentan los efectos indirectos entre todas las variables latentes del modelo.

Tabla 5. Efectos indirectos entre variables latentes del modelo propuesto.

Relación entre variables latentes	Muestra original	Media de la muestra	Desviación estándar	Estadísticos t	P Valores
Ingesta -> Actividad cotidiana	-0,217	-0,233	0,066	3,298	0,001
Ingesta -> Exploración	0,089	0,103	0,057	1,559	0,055
Ingesta -> Capacidad digestiva	-0,146	-0,146	0,085	1,727	0,042
Ingesta -> Reservas	-0,169	-0,168	0,114	1,491	0,068
BMR -> Exploración	-0,031	-0,033	0,116	0,267	0,395

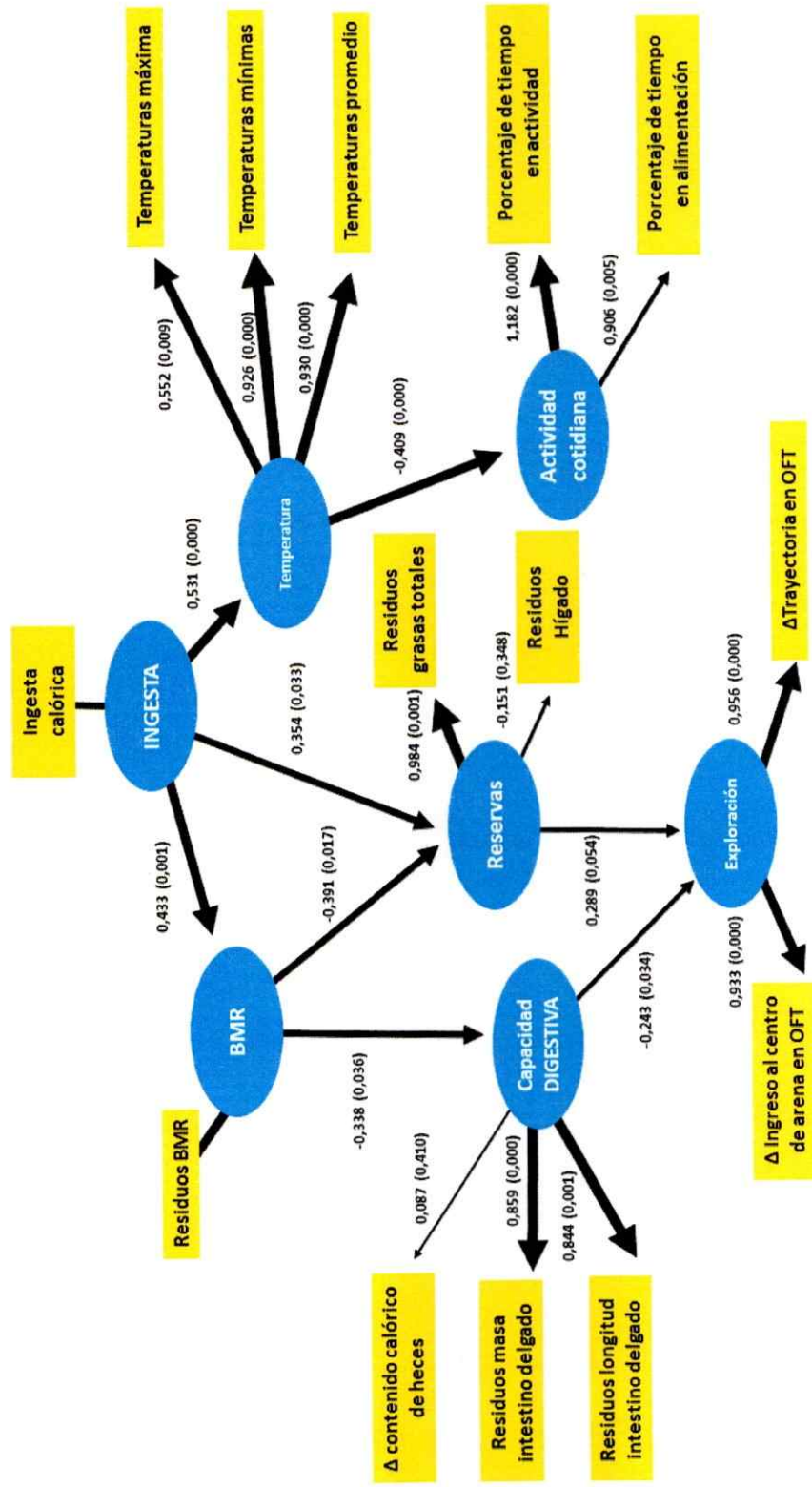


Figura 19. Modelo de vías que ilustra los efectos directos e indirectos en variables morfológicas, fisiológicas y conductuales. Ver texto para más detalle.

Comparación entre tratamientos (PLS Multigroup Analysis)

En base al modelo mostrado anteriormente, se compararon los coeficientes de vías para los cuatro tratamientos alimentarios. De este modo, mediante un análisis de *bootstrapping* se encontró en la mayoría de los tratamientos (excepto en el tratamiento E-60, $p=0,388$), una relación positiva entre la ingesta y las tasas de gasto de energía. Además, solamente en el grupo C-60 se encontró una relación negativa y significativa ($p=0,009$) entre tasas de gasto de energía y acumulación de reservas lipídicas y al mismo tiempo positiva entre ingesta y reservas ($p=0,003$). Por otra parte, considerando efectos directos e indirectos, se determinó que sólo en los individuos sometidos a regímenes estocásticos presentan compromisos entre exploración y capacidades digestivas (véase Tablas 6 y 7).

Al comparar por pares de tratamientos (a través de una aproximación no paramétrica), se determinó que entre tratamientos de alimentación continua *ad libitum* y al 60%, hubo diferencias en la relación *Ingesta -> Temperatura* e *Ingesta ->BMR*, siendo positivos y mayores en condiciones *ad libitum*. Del mismo modo se encontró diferencias en la relación entre *Capacidades digestivas -> Exploración*, generadas por la periodicidad, siendo positiva en el tratamiento C-100 y negativa en E-100. Las comparaciones se presentan en la tabla 8.

Tabla 6. Coeficientes de vía y su validez estadística mediante bootstrapping, para cuatro tratamientos de regímenes alimentarios. Las comparaciones se realizaron considerando el modelo (ver texto). Abreviaciones C-100: alimentación continua y *ad libitum* (100%); C-60: alimentación continua y al 60% del consumo *ad libitum*; E-100: alimentación estocástica con oferta equivalente al 100%; E-60: alimentación estocástica con oferta equivalente al 60%.

Variables latentes	Coeficientes (C-100)	Coeficientes (C-60)	Coeficientes (E-100)	Coeficientes (E-60)	p-valores (C-100)	p-valores (C-60)	p-valores (E-100)	p-valores (E-60)
Temperatura -> Actividad cotidiana	-0,560	-0,325	-0,726	-0,775	0,003	0,296	0,161	0,022
Ingesta -> Temperatura	0,829	-0,632	0,638	0,246	0,000	0,129	0,167	0,215
Ingesta -> BMR	0,881	0,319	0,596	0,087	0,000	0,036	0,007	0,388
Ingesta -> Reservas	-0,782	0,810	0,289	0,317	0,322	0,003	0,321	0,243
Capacidad digestiva -> Exploración	0,576	-0,550	-0,645	-0,600	0,174	0,146	0,021	0,068
BMR -> Capacidad digestiva	0,441	-0,431	-0,341	-0,378	0,205	0,207	0,143	0,153
BMR -> Reservas	0,220	-0,625	-0,313	-0,090	0,446	0,009	0,324	0,425
Reservas -> Exploración	0,343	0,306	0,116	0,093	0,221	0,238	0,377	0,425

Tabla 7. Efectos indirectos y su validez estadística mediante bootstrapping, para cuatro tratamientos de regímenes alimentarios en *M. musculus*. Abreviaciones C-100: alimentación continua y *ad libitum* (100%); C-60: alimentación continua y al 60% del consumo *ad libitum*; E-100: alimentación estocástica con oferta equivalente al 100%; E-60: alimentación estocástica con oferta equivalente al 60%.

Variables latentes	Efectos (C-100)	Efectos (C-60)	Efectos (E-100)	Efectos (E-60)	p-valores (C-100)	p-valores (C-60)	p-valores (E-100)	p-valores (E-60)
Ingesta -> Actividad cotidiana	-0,464	0,206	-0,463	-0,190	0,005	0,267	0,105	0,231
Ingesta -> Exploración	0,022	0,263	0,143	0,049	0,474	0,189	0,182	0,425
Ingesta -> Capacidad digestiva	0,388	-0,138	-0,203	-0,033	0,208	0,267	0,157	0,427
Ingesta -> Reservas	0,194	-0,200	-0,187	-0,008	0,451	0,131	0,357	0,483
BMR -> Exploración	0,330	0,046	0,183	0,218	0,375	0,443	0,252	0,258

Tabla 8. Comparación de coeficientes de vías entre tratamientos, para el modelo propuesto.

Variables latentes	Diferencias entre coeficientes de vías						p-valor					
	(C-100 - C-60)	(C-100 - E-100)	(C-100 - E-60)	(C-60 - E-100)	(C-60 - E-60)	(E-100 - E-60)	(C-100 vs C-60)	(C-100 vs E-100)	(C-100 vs E-60)	(C-60 vs E-100)	(C-60 vs E-60)	(E-100 vs E-60)
Temperatura -> Actividad cotidiana	0,235	0,165	0,215	0,400	0,450	0,049	0,522	0,362	0,127	0,266	0,264	0,649
Ingesta -> Temperatura	1,461	0,191	0,583	1,271	0,878	0,393	0,000	0,542	0,018	0,907	0,875	0,372
Ingesta -> BMR	0,562	0,285	0,794	0,277	0,232	0,509	0,001	0,083	0,003	0,826	0,249	0,104
Ingesta -> Reservas	1,592	1,071	1,099	0,521	0,493	0,028	0,925	0,820	0,843	0,197	0,149	0,536
Capacidades digestivas -> Exploración	1,126	1,221	1,176	0,095	0,050	0,045	0,098	0,032	0,049	0,486	0,510	0,554
BMR -> Capacidades digestivas	0,871	0,782	0,818	0,090	0,053	0,037	0,125	0,118	0,125	0,635	0,580	0,476
BMR -> Reservas	0,845	0,534	0,310	0,311	0,535	0,223	0,223	0,338	0,396	0,663	0,828	0,592
Reservas -> Exploración	0,037	0,227	0,250	0,190	0,213	0,023	0,464	0,305	0,322	0,357	0,364	0,487

IV
DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

*Efectos funcionales y estructurales de la restricción calórica y estocasticidad alimentaria en el intestino de *Mus musculus**

Cambios morfológicos

A la fecha, estudios de proliferación celular y el desarrollo y crecimiento del intestino han focalizado sus esfuerzos en el contexto de los cambios que ocurren a lo largo de la ontogenia. Así, es conocido que el desarrollo de las criptas intestinales de los roedores múridos se inicia durante la primera semana de vida post natal (Dehmer et al. 2011) y que tanto la fisión e hiperplasia de las criptas contribuyen al crecimiento del tejido del intestino delgado. Posteriormente, la lactancia es el período en el cual ocurre el máximo número de fisiones de criptas, mientras que la hiperplasia ocurre durante el destete (Cummins et al. 2006). A pesar de los estudios respecto al desarrollo y crecimiento del intestino, el conocimiento acerca de la dinámica celular ante una restricción calórica en la adultez, se ha focalizado principalmente en la comprensión de los procesos de señalización que ocurren a nivel de las criptas (Yilmaz et al. 2012; Igarashi & Guarente 2016), ignorando los efectos fisiológicos en la mayoría de ellos salvo excepciones (e.g., Casirola et al. 1997) y la relación con los cambios en el tamaño del órgano.

En el presente intento por abordar esta situación, los resultados indican un incremento de la longitud y masa del intestino, en roedores del grupo C-60 aclimatados a 20 días de restricción calórica, pero no así en condiciones de alimentación estocástica. Estos fenómenos fueron similares a los resultados descritos por Zhao & Cao (2009) en *Mus musculus* y *Cricetulus barabensis* en tratamientos de privación de alimentos. Sin embargo, no concuerdan con Cao et al. (2009) y con Zhu et al. (2014), dado que ellos mencionan un aumento en la longitud de los intestinos en la privación estocástica de alimentos en *Mus musculus* y *Eothenomys miletus*, respectivamente.

Respecto al aumento de la masa o longitud de los intestinos, se encontró una relación de estas variables con el coeficiente de estabilización (CoE) en las células BrdU+. Eso significa que un intestino de mayor tamaño tiene una menor variabilidad en toda su extensión, en los eventos proliferativos que ocurren en sus criptas. En otras palabras, cuando un intestino aumenta su longitud, sus criptas actúan de manera más similar en el primer tercio del órgano. De hecho, basándose en nuestros resultados, el CoE de las células BrdU+ es mejor predictor de la longitud del intestino que la masa de este órgano, dado que logra explicar un 75% de la variabilidad observada.

Respecto a la actividad proliferativa en las criptas intestinales, se ha señalado que la restricción calórica puede producir un aumento en la actividad proliferativa las criptas (Yilmaz et al. 2012). Sin embargo, en nuestro estudio no se encontraron diferencias significativas en la incorporación de BrdU (por comparación mediante ANOVA) entre tratamientos. A pesar de ello, desarrollamos un análisis comparativo de la distribución de las presencias de las células BrdU+ en las criptas (ver Figura 5), en que el grupo del

intestino de mayor longitud (60% continuo) presentó una distribución diferente. En relación a este análisis, la principal observación en los histogramas, es la presencia de cinco máximos conservados en todos los grupos, con una reducción en el primer máximo en el grupo continuo 60% respecto a todos los demás, y una mayor frecuencia entre: 7-10, 12 -14 y 15 a 20 células BrdU+. La presencia de estos picos pueden interpretarse en términos de la dinámica de los tejidos, considerando que el crecimiento normal y el mantenimiento del tejido intestinal ocurre a través de la fisión de las criptas por bifurcación y trifurcación de las criptas parentales (ver Langlands et al. 2016). Así, el primer máximo cercano a siete células por cripta, representaría el proceso proliferativo normal u homeostático. Luego, los máximos alrededor de 14 y 20 representan criptas en fisión por bifurcación y trifurcación, respectivamente. Considerando todo lo anterior, los resultados indicarían que la variación macroscópica en la morfología producida por la restricción calórica, se generaría a través de una reducción de la variabilidad de la proliferación entre criptas (coordinación) y un incremento en los procesos de bifurcación y trifurcación. Este incremento, tanto en la coordinación proliferativa y en la muerte celular, podría permitir mayor recambio celular y la extensión del intestino a una velocidad aproximada de 0,2 cm por día, permitiendo una rápida respuesta a los cambios ambientales en la disponibilidad de alimento, que se manifiesta en pocos días.

En cuanto a los órganos restantes, se encontró que el grupo C-100, muestra una reducción en el tejido adiposo epididimal e inguinal, junto con poseer una mayor masa de los órganos reproductores y el bazo (tabla 3). Esta mayor masa del sistema reproductor respecto al

grupo E-60, indicaría que ante la existencia de recursos *ad libitum* y continuos, se generaría diferencialmente un incremento del *fitness* en el componente reproductivo.

Sin embargo, nuestros resultados no concuerdan con todos los estudios reportados a la fecha. Por ejemplo Bertrand et al. (1980) indican que la pérdida de tejido adiposo blanco (del inglés WAT) es desproporcionadamente grande en la restricción calórica. Creemos que en nuestras condiciones experimentales, los animales aclimatados a tratamientos estocásticos o de restricción calórica desarrollaron respuestas compensatorias, que promovieron la acumulación de reservas durante las oportunidades de alimentación (e.g., el incremento del intestino y el aumento en la eficiencia digestiva).

Respecto a las diferencias en el estómago y el bazo, se encontró que el grupo de ratones alimentado *ad libitum* y continuamente C-100, presentaron una menor masa que el grupo C-60. Esta diferencia es coincidente con otros estudios en que el desarrollo de la hipertrofia en el estómago y el bazo se observaron bajo restricción calórica (Yang et al. 2007). Además, este incremento en la masa del estómago se ha observado principalmente en ratones bajo restricción calórica cuando se les presenta alimento cada día (i.e., alimentación continua) (Hambly et al. 2007). En efecto, se ha propuesto que la restricción calórica crónica conduce a una sorprendente hipertrofia de la lámina propia, el estrato basal, el estrato córneo y el epitelio escamoso estratificado del estómago (Yang et al. 2007), probablemente mediada por la hormona grelina (véase Speakman & Mitchell 2011).

Además, cabe destacar que en los análisis de regresión lineal realizados en esta tesis, existe un gran porcentaje de la varianza (en algunos casos hasta el 80%) no explicada por las

variables predictoras. De este modo, la limitada capacidad explicativa de los modelos (regresiones), es consistente con la existencia de factores desconocidos que influyen de manera no controlada ni predecible en la respuesta medida (e.g., variabilidad intraespecífica en personalidad, capacidades fisiológicas, etc.).

Efectos digestivos

Nuestros resultados indican una reducción en el contenido calórico de las heces en el grupo C-60 respecto al grupo E-100, lo que podría explicarse por cambios en la eficiencia en la digestión y/o absorción, mediante la elongación del órgano total. Respecto al ajuste digestivo, no encontramos diferencias en las actividades de las disacaridasas intestinales, resultados coincidentes con otros estudios (Ihara et al. 2000). Por lo tanto, considerando lo descrito en la literatura y nuestros resultados, se concluye que la restricción calórica puede aumentar la eficiencia en la absorción de nutrientes y reducir el contenido calórico de las heces, a pesar que sólo algunas actividades enzimáticas se incrementan en este régimen calórico (Noriega et al. 1981, Casirola et al. 1997, Ihara et al. 2000).

Respecto a las capacidades bioquímicas modificadas por efecto de la restricción calórica, se encontró una fuerte relación positiva en el CoE en las células BrdU+ y la actividad de las n-aminopeptidasas por gramo de proteína intestinal, lo que sugiere que la reducción de la variabilidad entre las criptas se producen en paralelo a un aumento en la capacidad de digestión de proteínas (véase la Figura 7). En este sentido, algunos estudios, indican que

la actividad de ~~n~~-aminopeptidasas muestra un aumento a los dos días de inanición en *Rattus* sp., lo que sugiere que las n-aminopeptidasas pueden tener durante los primeros días de inanición un papel conservador al prevenir una importante pérdida de proteína tisular (Noriega et al. 1981). Luego, si la restricción energética incrementa, se ha encontrado que tras 5 días de inanición en *Rattus*, la actividad n-aminopeptidasa y dipeptidil peptidasa IV se eleva significativamente a 177% y 166%, respectivamente, de los valores de control (Ihara et al. 2000). Dado lo anterior, el incremento en paralelo de la capacidad de aumentar el tamaño del intestino (alto CoE para células BrdU+) se relacionaría proporcionalmente a un esfuerzo de optimizar la obtención de aminoácidos y promover el crecimiento del órgano.

En resumen, nuestros resultados indican por primera vez que la restricción calórica induce cambios a nivel de la dinámica de proliferación celular (i.e., coordinación de criptas e incremento en su fisión), que permiten explicar los cambios morfológicos y funcionales del intestino en *Mus musculus*. Además, se determinó que este fenómeno de plasticidad en roedores, presenta una respuesta rápida, con consecuencias positivas en las capacidades de procesamiento de alimento. Por lo cual, constituiría un mecanismo que incrementaría el *fitness* ante un contexto ambiental desfavorable.

Relación entre tasas de gasto de energía y conducta exploratoria en roedores ante variabilidad alimentaria.

Actividad exploratoria

Se ha sugerido que una mayor actividad y capacidad de exploración incrementarían la sobrevivencia de los organismos (Smith & Blumstein 2008). En ese sentido se ha propuesto que organismos que habitan ambientes impredecibles o improductivos, son beneficiados por alta exploración dado que incrementaría la probabilidad de encontrar recursos escasos, mientras que bajas tasas de gasto de energía, mejorarían la supervivencia durante la escases frecuente de recursos (Careau 2009). En este estudio se identificó que a nivel de la actividad exploratoria-- determinada como la distancia recorrida en una arena desconocida-- no existirían efectos de la restricción calórica, sino que de la periodicidad. De este modo, los grupos aclimatados a una alimentación estocástica, presentaron un mayor delta de trayectoria (i.e., trayectoria ante de la aclimatación - trayectoria después de la aclimatación) en el test de exploración.

Nuestro estudio reveló que los individuos que recorrieron las mayores distancias, presentaron en conjunto, reducciones de la tasa metabólica total (ver Figura 14). Estos resultados apoyarían la hipótesis de asignación de energía (Véase Careau et al. 2008, Careau & Garland 2012), presentándose un compromiso entre las tasas de gasto de energía y la actividad locomotora desarrollada por los individuos.

En relación a la exploración en especies domesticadas, como *Mus musculus* (Balb/c), se ha estudiado previamente que los individuos de laboratorio son menos cautelosos que especies e individuos silvestres, ante la posibilidad de entrar a zonas potencialmente peligrosas. No obstante, de igual manera tienden a evitar áreas de riesgo, tales como zonas iluminadas, abiertas y áreas elevadas (Augustsson & Meyerson 2004).

Actividad cotidiana

El análisis de la actividad cotidiana de los roedores permitió obtener conclusiones similares a las que provienen de las pruebas de exploración. En ese sentido, se encontró que los individuos que disponen de una mayor parte del tiempo en conducta de descanso (i.e., sin desplazamiento en sus jaulas), presentaron mayores tasas metabólicas masa específica y residuos de BMR, indicando una vez más que la condición energética generada por el acceso a los recursos determinaría la asignación de energía entre BMR y la actividad locomotora. Dado esto, nuestros resultados apoyan el modelo de asignación de energía. Respecto a esta alta actividad locomotora, diversos estudios indican que no es posible sostener altos niveles de actividad en condiciones de restricción calórica, y que existirían respuestas bifásicas, que involucrarían un incremento de actividad locomotora, seguido por un decrecimiento crónico (Speakman & Mitchell 2011). Efectivamente, individuos de la cepa de LS x SS (cepa consanguínea recombinante de un cruce inicial de *sueño largo* [LS] y de *sueño corto* [SS]) reducen su actividad física (en rueda de ejercicios)

aproximadamente en un 50% cuando son expuestos a una prolongada restricción calórica (Rikke et al. 2003).

Respecto a las bases mecanicistas del aumento de actividad en roedores con acceso limitado al alimento, se ha propuesto que podría estar mediada por aumentos de hormonas como la ghrelina la cual tras ser secretada por el estómago, induce vía sistema nervioso la conducta de alimentación (Jensen 2013). Además, se ha encontrado que tras 48 horas de restricción de alimento, se incrementa significativamente la expresión génica de esta hormona (Asakawa et al. 2001). Bajo una lógica similar se ha propuesto que el incremento paradójico en la actividad locomotora también podría estar mediada por la disminución de los niveles plasmáticos de leptina (Exner et al. 2000, Hebebrand et al. 2003, Holtkamp et al. 2004).

Mecanismos de compromiso: rol del hígado

Una vez establecido que nuestros resultados apoyan el modelo de asignación, es relevante comprender la base fisiológica que subyace a los procesos de reasignación de energía en el contexto en estudio. En este sentido, se ha documentado que los roedores son primariamente nocturnos, y que durante la escotofase consumen dos tercios del alimento que ingieren en 24 horas (Jensen et al. 2013). De este modo, el tiempo que disponen estos organismos para diversas actividades durante la noche, permite obtener una clara perspectiva de sus necesidades intrínsecas. En ese sentido, se observó que el hígado,

órgano que reduce su metabolismo mitocondrial ante la restricción de la ingesta de alimento (Brown & Staples, 2010), podría ser una estructura clave en la generación de los compromisos descritos entre metabolismo y actividad locomotora, dado que los residuos de la masa de este órgano son mayores en individuos con alto porcentaje de descanso nocturno ($r^2 = 0,116$; $r = 0,341$; $p = 0,025$). Además, el considerar al hígado como estructura clave en la hipótesis de asignación, se respalda al reconocer que los individuos más activos en la escotofase, poseen menores actividades de citocromo c oxidasa (COX) en sus hepatocitos (véase Figura 16). Esta última observación, respecto a las capacidades catabólicas, es valiosa en el contexto de la comprensión de los efectos metabólicos, por cuanto la COX es una enzima que participa directamente en la reducción de oxígeno al interior de las mitocondrias (Brunori et al. 2005). Además, este hallazgo es relevante, considerando que a la fecha se ha puesto énfasis en el cambio de las masas de órganos, por sobre los ajustes a nivel bioquímico, al explicar las relaciones entre metabolismo y conducta (Mitchell et al. 2017).

Mecanismos de compromiso: rol de la temperatura

Desde una perspectiva bioenergética, los ajustes fisiológicos desarrollados ante restricción calórica involucrarían un desafío energético alostático, donde se alterarían múltiples funciones a expensas de otras de carácter homeostático (Hambly & Speakman 2005, Golightly et al. 2012). En ese sentido, de manera contraintuitiva se encontró que

individuos que se mantienen un mayor porcentaje de tiempo en inactividad, presentan una mayor temperatura corporal (véase Figura 17). Este resultado ha sido encontrado en múltiples estudios que abordan la estocasticidad alimentaria y restricción calórica en roedores (Weindruch et al. 1979, Cheney et al. 1983, Duffy et al. 1990 a, b, Weindruch et al. 2002, Ferguson et al. 2007, Overton & Williams 2004, Carrillo & Flouris 2011, Lusseau et al. 2015). Esto es en parte posible, dado que los roedores son un grupo de homeotermos capaces de disminuir su temperatura corporal bajo los 31°C (Overton & Williams 2004) y que incluso prefieren temperaturas más frías que sus zonas termoneutrales (Gordon, 1993). Esta característica que presentan los roedores, conlleva la capacidad de desarrollar ajustes termorregulatorios y suprimir las tasas de gasto de energía (véase Swan 1974). Además, se ha propuesto que ésta podría ser una estrategia que permite sobrellevar condiciones adversas, maximizando la adecuación biológica (Lusseau et al. 2015).

En relación a los mecanismos termogénicos, se encontró una correlación positiva entre temperaturas mínimas y termogénesis no tiritante. Paralelamente, se observó que individuos más activos presentaron menores temperaturas, sugiriendo la existencia de una reasignación de energía desde procesos de desacoplamiento mitocondrial e hidrólisis de ATP, hacia el desarrollo de actividad locomotora. Este fenómeno podría estar presente en un variado número de roedores. Efectivamente Cao et al. (2009), han reportado que ante un ambiente de alimentación impredecible, individuos de *Mus musculus* presentan una reducción en sus tasas de gasto de energía y de termogénesis no tiritante. Del mismo modo

se ha descrito que dietas de bajas calorías, producirían reducciones en la TNT en *Microtus brandtii* y *Meriones unguiculatus* (Zhang & Wang 2008, Zhao & Wang 2007).

Integración de evidencia: una propuesta explicativa

Finalmente, es posible relacionar la función hepática con la temperatura, el metabolismo y la conducta, con el objetivo de comprender la fisiología que subyace al modelo de asignación. Como ya se mencionó, se ha identificado que el hígado es un órgano del alto gasto energético, que responde ante la restricción calórica reduciendo su actividad oxidativa mitocondrial (Brown & Staples 2010), que contribuye con la producción postprandial de calor (i.e., después de la alimentación) (Adachi et al. 1991), y que se ha encontrado una temprana activación de termogénesis tiritante (i.e., activación de grasa parda) durante la alimentación en roedores, ocurre al mismo tiempo que se produce un incremento en la circulación sanguínea (i.e., lo que aumenta la disipación de calor) (Blessing et al. 2012). Luego, una reducción de la ingesta de alimento, produciría una disminución de las fuentes de calor y de disipación, reflejándose en una disminución de la temperatura superficial, la capacidad termogénica tiritante y la actividad de COX en el hígado. Considerando, que el hígado representa un alto porcentaje del consumo de oxígeno en roedores (Field et al. 1939, Krebs 1950), esto produciría una disminución de las tasas de gasto energético. Finalmente, ocurrirían cambios conductuales inducidos por la reducción en la ingesta de alimento, los cuales estarían mediados por hormonas tales

como ghrelina, leptina e insulina (Exner et al. 2000, Asakawa et al, 2001, Hebebrand et al. 2003, Holtkamp et al. 2004, Jensen 2013) y facilitados por la energía que provendría de la reducción de la hidrólisis de ATP y desacoplamiento mitocondrial en estructuras termogénicas (i.e., hígado y grasa parda).

Finalmente, en este estudio reportamos la existencia de una clara relación negativa entre la actividad locomotora de roedores sometidos a diferentes condiciones alimentarias y la magnitud de procesos metabólicos. De esta manera, se presenta evidencia que permitiría sostener el modelo de asignación ante diversos escenarios de variabilidad ambiental.

Compromisos y reasignaciones de energía generados ante variación en la disponibilidad de alimento en roedores

A la fecha diversos estudios han observado el desarrollo de hipotermia y reducciones en las tasas de gasto de energía ante la experimentación de restricción calórica. Además, se ha determinado el incremento paradójico en la actividad exploratoria junto al aumento del tamaño intestinal o proliferación celular intestinal, ante la privación de alimento. A pesar de ello, no existen a la fecha estudios que integren todas estas respuestas en un marco de asignación del presupuesto energético, considerando que el sistema digestivo es uno de los sistemas fisiológicos más reactivos a los cambios en las condiciones ambientales, como resultado de un equilibrio entre los beneficios funcionales y los costos de mantenimiento (Naya et al. 2014). En este estudio encontramos que la regulación de la actividad termogénica, mediada por la ingesta de alimento, estaría relacionada con el incremento de la actividad conductual y las capacidades intestinales.

Desarrollo de ajustes paradójicos

Tamaño y función intestinal

Mediante la modelación a través del análisis de vías se puso en evidencia la existencia de un efecto modulador de la ingesta calórica semanal, el cual consistiría en modificar la relación entre ingesta-metabolismo e ingesta-temperatura. Así, individuos con alta ingesta

calórica, presentan altos metabolismo masa específico y temperaturas corporales. Posteriormente se encontró que a expensas de estas variables, se desarrollaron los cambios morfológicos y conductuales descritos.

En síntesis, se encontró que los cambios intestinales, tanto en los aspectos morfológicos como funcionales, se asociaron a modificaciones de las tasas de gasto energético y de la temperatura corporal. En particular, se determinó que tanto el tamaño del intestino así como el cociente de células en proliferación/ células en apoptosis (N° células BrdU+/ N° células Caspasa+) se relacionaron negativamente con las tasas de gasto de energía. Además, respecto a las capacidades intestinales, estas mostraron una relación inversa con la temperatura corporal (véase Figura 12), la cual se ha demostrado que disminuye ante una restricción calórica (Weindruch et al. 1979, Cheney et al. 1983, Duffy et al. 1990 a, b, Weindruch et al. 2002, Carrillo & Flouris 2011, Ferguson et al. 2007, Lusseau et al. 2015). Todo esto, indicaría por primera vez que los roedores incrementan el tamaño del intestino y la actividad digestiva a expensas del consumo de oxígeno y la producción de calor.

En térmicos mecanicistas, la reducción en las tasa de gasto de energía observadas, inducidas por la reducción en la ingesta de alimento, producirían disminuciones en las tasas de frecuencias cardiacas y en los niveles de T3 y T4 (triyodotironina y tiroxina) plasmáticos (Overton & Williams 2004, Speakman & Mitchell 2011), explicando la variación del BMR. Además, se ha propuesto que la reducción en la actividad termogénica, resultante tras la restricción calórica, es consecuencia de una disminución de los niveles de T3 en músculos (De Andrade et al. 2015). En relación a la variación en

la capacidad termogénica, también se ha identificado que el hígado contribuye a la producción postprandial de calor (Adachi et al. 1991) y se ha encontrado en roedores que durante la alimentación ocurre una temprana activación de termogénesis tiritante (i.e., activación de grasa parda) al mismo tiempo que ocurre un incremento en la circulación sanguínea (i.e., disipación de calor) (Blessing et al. 2012). Luego, esta reducción en la actividad termogénica tiritante y no tiritante, podrían proveer del ATP necesario para el desarrollo de la actividad anabólica en el tejido intestinal. En este sentido, los resultados sugieren que el hígado estaría relacionado con el incremento de la capacidad funcional del intestino, considerando la relación inversa encontrada entre los residuos de la masa de hígado y el contenido calórico por gramo de heces.

Por otro lado, la condición energética del organismo, ante restricción alimentaria, sería detectada a través de sirtuína-1 deacetilasa dependiente de NAD (SIRT1) y/o mTOR (*Mammalian Target of Rapamycin*), las cuales son proteínas cuya activación o desactivación, ocurren por medio de la variación de niveles de glucosa, insulina u oxígeno. Luego, estas proteínas afectarían desde la regulación de las vías glicolíticas/gluconeogénicas en el hígado, hasta la proliferación celular intestinal en las criptas intestinales (véase, Speakman & Mitchell 2011, Yilmaz et al. 2012, Takashima et al. 2013, Igarashi & Guarente 2016).

Incrementos en actividad locomotora

Ha sido documentado que algunas especies de roedores incrementan su actividad conductual ante una restricción calórica (Harrison & Archer 1987, McCarter 1998, Duffy et al. 1990 a, b, Speakman & Mitchell 2011). En este estudio se encontró una relación inversa entre la trayectoria recorrida por los roedores y sus tasas de gasto de energía, en donde además, los individuos de los tratamientos estocásticos manifestaron mayores actividades exploratorias. En este sentido, Speakman & Mitchell (2011), han propuesto que los animales que se enfrentan a una ingesta restringida en la naturaleza podrían sobrevivir más si se vuelven más activos para buscar nuevas fuentes de alimento, en lugar de permanecer en un área donde su ingesta es menor que sus requerimientos.

Considerando el análisis de vías, se identificó que la exploración en un ambiente novedoso y la actividad en un ambiente conocido estarían relacionadas inversamente con diferentes procesos fisiológicos. Por una parte, respecto a la actividad desarrollada por los roedores en el ambiente conocido, se encontró que los individuos más activos presentaron menores temperaturas corporales, y una reducida actividad catabólica del hígado. Esto indicaría, que la actividad locomotora aumentada bajo una condición de restricción calórica se desarrollaría a expensas de reducciones en la actividad termogénica. Por otra parte, la actividad exploratoria en un ambiente novedoso, presentaría compromisos con el desarrollo de intestinos de mayor tamaño y requeriría del desarrollo de reservas en tejido adiposo, lo cual establecería un límite al tamaño del intestino en esa condición ambiental.

Concatenación de cambios plásticos

El análisis de correlaciones entre procesos de adquisición de energía, nos permite evaluar la existencia de pasos limitantes al desarrollo de capacidades de adquisición de nutrientes. Este análisis reveló que los roedores presentaron capacidades musculares acordes al grado de exploración en el test de capo abierto y al tiempo asignado al forrajeo. Así, individuos más activos o audaces, mostraron mayores actividades de n-aminopeptidasas intestinales que aquellos menos activos. No obstante las disacaridasas intestinales no mostraron ninguna relación con las restantes modificaciones fisiológicas experimentadas. Así, es posible observar que no todos los procesos se incrementan en tándem, dado que las actividades de disacaridasas no son afectadas por los tratamientos por gramo de proteína intestinal. Esta rigidez en la actividad de disacaridasas, se ha documentado en estudios previos en roedores (véase Ihara et al. 2000).

A pesar de ello, se ha documentado que la absorción de hidratos de carbono es significativamente mayor ante una restricción calórica que en roedores controles consumiendo alimento *ad libitum* (Casirola et al. 1997), por lo que si se considera la existencia de una mayor superficie de interacción entre enzimas y sustratos, entonces la digestión de disacaridasas no debería ser calificado como un paso limitante. Por otra parte, el incremento en n-aminopeptidasas observado, sugiere que la mayor expresión de esta enzima podría tener un papel conservador al prevenir una importante pérdida de proteína tisular y favorecer los procesos anabólicos del intestino (véase Noriega et al. 1981, Ihara et al. 2000).

Luego, es posible señalar que ante alta variabilidad ambiental (e.g., estocasticidad en la disponibilidad de recursos), no se desarrollaría un incremento en tándem de todas las capacidades de obtención de recursos. De esta forma, sólo el tratamiento de restricción calórica C-60, mostró reducciones significativas en el contenido calórico de las heces, gracias a un incremento significativo del tamaño del intestino.

Este conflicto, en donde no hay cambios digestivos favorables en condiciones estocásticas así como se presentan ante restricción calórica, se podría generar debido al presumiblemente mayor incentivo por encontrar alimento, si se considera que este grupo presenta las mayores distancias recorridas en la prueba exploración (véase Figura 13, Boakes & Dwyer 1997, Sherwin 1998, Alvarenga et al. 2005, Hambly & Speakman 2005, Cao et al. 2009). Finalmente, en este estudio se reporta por primera vez que ante variabilidad estocástica en la disponibilidad de alimento se desarrollan compromisos complejos en los roedores, en donde la asignación de recursos compromete a diferentes capacidades de adquisición de energía (i.e., capacidades intestinales y exploración).

Por tanto, *Mus musculus* presentó variaciones fenotípicas desde el nivel celular a la conducta, las cuales se relacionaron a través de incrementos coordinados en el aumento de capacidades de adquisición o bien a través de cambios en la asignación de energía. Además, los cambios descritos, presentaron diferencias (en magnitud y sentido) en función de la periodicidad e ingesta calórica. Por ello, la plasticidad observada sería generada ante determinados escenarios ambientales y no constituiría una respuesta generalizada. Así, la plasticidad fenotípica en este roedor, pone de manifiesto diversas estrategias fisiológicas que le confieren la capacidad de tolerar ambientes altamente

variables y períodos de escasas de alimento. Trasladando nuestros resultados a un plano ecológico-evolutivo, estas complejas asignaciones de energía, podrían explicar en parte el éxito invasor de algunas especies de roedores.

Perspectivas futuras

La estrategia a partir de la cual se abordó el análisis de plasticidad fenotípica observada ante restricción calórica y estocasticidad, podría emplearse en otros casos de plasticidad intestinal mencionados en la literatura, principalmente por estudios ecológicos (para revisiones, véase Karasov & Diamond 1983, McWilliams & Karasov 2001, Naya & Bozinovic 2004, 2008). En ellos, se ha propuesto que los animales ajustan sus atributos digestivos (por ejemplo, masa y/o longitud intestinal) cuando se ven enfrentados a cambios en la disponibilidad o calidad de los alimentos para maximizar el retorno total de energía, o a períodos de alto gasto energético como la lactancia (Naya et al. 2008). Además, las observaciones que se desprenden de este estudio (i.e., dinámica intestinal, asignaciones entre metabolismo y conducta, compromisos entre procesos de adquisición) podrían estar relacionadas con otros fenómenos fisiológicos, observados en contexto de restricción alimentaria, como lo son los cambios metabólicos y la extensión de la esperanza de vida en roedores (Sohal & Forster 2015, Mitchell et al. 2016). Además, futuros estudios podrían explorar la modulación de las respuestas ante variabilidad

ambiental, generadas por efectos programadores metabólicos, como lo son los efectos maternos o la restricción alimentaria en estados tempranos de la ontogenia.

Finalmente, se propone abordar la activación de proteínas con roles de reguladores energéticos, tales como Sirt1 y mTOR para comprender los mecanismos a través de los cuales la variabilidad ambiental induce el desarrollo de ajustes fisiológicos, tanto ante restricción calórica, así como fenómenos de alta demanda energética.

V

REFERENCIAS

REFERENCIAS

Adachi, A., Funahashi, M., & Ohga, J. 1991. Hepatic thermogenesis relation to food intake in the conscious rat. *Brain research bulletin*, 27(3), 529-533.

Alvarenga, T.A.F., Andersen, M.L., Papale, L.A., Antunes, I.B., Tufik, S., 2005. Influence of long-term food restriction on sleep pattern in male rats. *Brain Res.* 1057, 49–56.

Alyan, S. & Jander, R. 1997. Exploration Is Sufficient but Not Necessary for Navigation with Landmarks in the House Mouse (*Mus musculus*). *Learning and Motivation*, 28, 558–576.

Asakawa A, Inui A, Kaga T, et al. 2001. Ghrelin is an appetite- stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology*. 120: 337–345.

Augustsson H & BJ Meyerson. 2004. Exploration and risk assessment: a comparative study of male house Mice (*Mus musculus musculus*) and two laboratory strains. *Physiology & Behavior* 81:685–698.

Bartheld, JL, Gaitán-Espitia JD, Artacho P, Salgado-Luarte C, E Gianoli, and RF Nespolo. 2015. Energy expenditure and body size are targets of natural selection across a wide geographic range, in a terrestrial invertebrate *Functional Ecology*, doi: 10.1111/1365-2435.12451.

Bertrand, H. A., Lynd, F. T., Masoro, E. J., & Byung, P. Y. 1980. Changes in adipose mass and cellularity through the adult life of rats fed ad libitum or a life-prolonging restricted diet. *Journal of Gerontology*, 35(6), 827-835.

Biro, P.A. & Stamps, J.A. 2008. Are animal personality traits linked to life-history productivity? *Trends in Ecology & Evolution*, 23, 361–368.

Biro, Peter A, and Judy A Stamps. 2010. Do consistent individual differences in metabolic rate promote consistent individual differences in behavior? *Trends in Ecology & Evolution* 25 (11). doi:10.1016/j.tree.2010.08.003.

Blessing, W., Mohammed, M., & Ootsuka, Y. 2012. Heating and eating: brown adipose tissue thermogenesis precedes food ingestion as part of the ultradian basic rest–activity cycle in rats. *Physiology & behavior*, 105(4), 966-974.

Boakes, R.A., Dwyer, D.M., 1997. Weight loss in rats produced by running: effects of prior experience and individual housing. *J. Exp. Psychol.* 50, B129–B148.

Boily G, Seifert EL, Bevilacqua L, He XH, Sabourin G, et al. 2008. SirT1 Regulates Energy Metabolism and Response to Caloric Restriction in Mice. *PLOS ONE* 3(3): e1759. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001759>

Bozinovic F, JLP Muñoz, DE Naya & AP Cruz-Neto. 2007. Adjusting energy expenditures to energy supply: food availability regulates torpor use and organ size in the chilean mouse-opossum *Thylamys elegans*. *Journal of Comparative Physiology. B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 177 (4): 393–400.
Doi:10.1007/s00360-006-0137-0.

Bozinovic F, Méndez MA .1997. Role of dietary fatty acids on energetics and torpor in the chilean mouse-opossum *Thylamys elegans*. *Comp Biochem Physiol* 116A:101–104.

Bozinovic F, Ruiz G, Rosenmann M. 2005. Energetics, thermoregulation and torpor in the chilean mouse-opossum *Thylamys elegans* (Didelphidae). *Rev Chil Hist Nat* 78:199–206.

Brown, J.C.L. & Staples, J.F. 2010. Mitochondrial metabolism during fasting-induced daily torpor in mice. *BBA - Bioenergetics*, 1797, 476–486.

Brunori, M., Giuffre, A., & Sarti, P. 2005. Cytochrome c oxidase, ligands and electrons. *Journal of inorganic biochemistry*, 99(1), 324-336.

Calder WA. 1994. When do hummingbirds use torpor in nature? *Physiol. Zool.* 67:1051–76.

Careau, V., Thomas, D., Humphries, M.M. & Re' ale, D. 2008. Energy metabolism and animal personality. *Oikos*, 117, 641–653.

Careau, V., Bininda-Emonds, O.R.P., Thomas, D.W., Re' ale, D. & Humphries, M.M. 2009. Exploration strategies map along fast–slow metabolic and life-history continua in muroid rodents. *Functional Ecology*, 23, 150 –156

Careau, Vincent and Garland Jr., Theodore. 2012. Performance, personality, and energetics: correlation, causation, and mechanism, *Physiological and biochemical zoology*, vol. 85, no. 6: 543-571.

Carey HV. 2005. Gastrointestinal responses to fasting in mammals: lessons from hibernators. In: Starck JM, Wang T (eds) *Physiological and ecological adaptations to feeding in vertebrates*. Science Publishers, New Hampshire, USA

Carrillo, A.E., Flouris, A.D., 2011. Caloric restriction and longevity: effects of reduced body temperature. *Ageing Research Reviews* 10, 153–162.

Casirola, D. M., Lan, Y., & Ferraris, R. P. 1997. Effects of changes in calorie intake on intestinal nutrient uptake and transporter mRNA levels in aged mice. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 52(6), B300-B310.

Cao, J., Zhang, L. & Zhao, Z. 2009. Trade-off between energy budget, thermogenesis and behavior in Swiss mice under stochastic food deprivation. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 154: 84–91.

Cao, J., Zhang, L. & Zhao, Z. 2009. Trade-off between energy budget, thermogenesis and behavior in Swiss mice under stochastic food deprivation. *Journal of Thermal Biology* 34: 290–298.

Cheney, K.E., Liu, R.K., Smith, G.S., Meredith, P.J., Mickey, M.R., Walford, R.L., 1983. The effect of dietary restriction of varying duration on survival, tumor patterns, immune function, and body-temperature in B10C3F1 female mice. *Journals of Gerontology* 38, 420–430.

Clément, Y., Calatayud, F. & Belzung, C. 2002. Genetic basis of anxiety-like behaviour: a critical review. *Brain research bulletin*.

Cote, J., Clobert, J., Brodin, T., Fogarty, S. & Sih, A. 2010. Personality- dependent dispersal: characterization, ontogeny and consequences for spatially structured populations. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 365, 4065–4076.

Cummins, A. G., Jones, B. J., & Thompson, F. M. 2006. Postnatal epithelial growth of the small intestine in the rat occurs by both crypt fission and crypt hyperplasia. *Digestive diseases and sciences*, 51(4), 718-723.

De Andrade, P.B.M., Neff, L. a., Strosova, M.K., Arsenijevic, D., Patthey-Vuadens, O., Scapozza, L., Montani, J.P., Ruegg, U.T., Dulloo, A.G. & Dorchies, O.M. 2015. Caloric restriction induces energy-sparing alterations in skeletal muscle contraction, fiber

composition and local thyroid hormone metabolism that persist during catch-up fat upon refeeding. *Frontiers in Physiology*, 6, 1–14.

Dehmer, J. J., Garrison, A. P., Speck, K. E., Dekaney, C. M., Van Landeghem, L., Sun, X., Henning A.J. & Helmrath, M. A. 2011. Expansion of intestinal epithelial stem cells during murine development. *PloS one*, 6(11), e27070.

Dingemanse, Niels J, Christiaan Both, Piet J Drent, and Joost M Tinbergen. 2004. Fitness consequences of avian personalities in a fluctuating environment. *Proc. R. Soc. Lond. B* 271: 847–52. doi:10.1098/rspb.2004.2680.

Duffy, P.H., Feuers, R., Nakamura, K.D., Leakey, J., Hart, R.W., 1990a. Effect of chronic caloric restriction on the synchronization of various physiological measures in old female Fischer-344 rats. *Chronobiology International* 7, 113–124.

Duffy, P.H., Feuers, R.J., Hart, R.W., 1990b. Effect of chronic caloric restriction on the circadian regulation of physiological and behavioral variables in old male B6C3F1 mice. *Chronobiology International* 7, 291–303.

Exner, C., Hebebrand, J., Remschmidt, H., Wewetzer, C., Ziegler, A., Herpertz, S., Schweiger, U., Blum, W., Preibisch, G., Heldmaier, G. & Klingenspor, M. 2000. Leptin suppresses semi-starvation induced hyperactivity in rats: implications for anorexia nervosa. *Molecular Psychiatry*, 5, 476–481.

Ferguson, M., Sohal, B.H., Forster, M.J., Sohal, R.S., 2007. Effect of long-term caloric restriction on oxygen consumption and body temperature in two different strains of mice. *Mechanisms of Ageing and Development* 128, 539–545

Field, J., Belding, H. S. and Martin, A. W. 1939. An analysis of the relation between basal metabolism and summated tissue respiration in the rat. I. The post-pubertal albino rat. *J. Cell. Comp. Physiol.* 14, 143–157.

Forda H. A, Geoffrey W Barrettb, Denis A Saundersc, Harry F. 2001. Why have birds in the woodlands of Southern Australia declined? *Recherd Biological Conservation* Volume 97, Issue 1: 71–88.

Geiser, F. 1988. Reduction of metabolism during hibernation and daily torpor in mammals and birds: temperature effect or physiological inhibition?. *Journal of Comparative Physiology B*, 158(1), 25-37.

Golightly, A., Boys, R. J., Cameron, K. M. & Zglinicki, T. V. 2012. The effect of late onset, short-term caloric restriction on the core temperature and physical activity in mice. *Journal of the Royal Statistical Society: Series C (Applied Statistics)* 61, 733–751.

Gordon CJ. 1993. *Temperature regulation in laboratory rodents*. New York: Cambridge Univ. Press.

Hambly, C., Simpson, C.A., McIntosh, S., Duncan, J.S., Dalglish, G.D., Speakman, J.R., 2007. Calorie-restricted mice that gorge show less ability to compensate for reduced energy intake. *Physiology and Behavior* 92, 985–992.

Hambly, C. & Speakman, J. R. 2005. Contribution of Different Mechanisms to Compensation for Energy Restriction in the Mouse. *Obes. Res.* 13, 1548–1557.

Harrison, D.E., Archer, J.R., 1987. Genetic-differences in effects of food restriction on aging in mice. *Journal of Nutrition* 117, 376–382.

Hebebrand J, Exner C, Hebebrand K, Holtkamp C, Casper RC, Remschmidt H, et al. 2003. Hyperactivity in patients with anorexia nervosa and in semistarved rats: evidence for a pivotal role of hypoleptinemia. *Physiol Behav*: 79:25–37.

Heldmaier, G., 1971. Nonshivering thermogenesis and body size in mammals. *J. Comp. Physiol.* 73, 222–248.

Hofmann, R R. 1989. Evolutionary steps of ecophysiological adaptation and diversification of ruminants: a comparative view of their digestive system. *Oecologia.* 78: 443–57.

Holmes, M.M. & R.E. Mistlberger. 2000. Food anticipatory activity and photic entrainment in food-restricted BALB/c mice. *Physiology & Behavior* 68: 655–666.

Holtkamp, K., Hebebrand, J., Herpertz-Dahlmann, B., 2004. The contribution of anxiety and food restriction on physical activity levels in acute anorexia nervosa. *International Journal of Eating Disorders* 36, 163–171

Houston, Alasdair I. 2010. Evolutionary models of metabolism, behaviour and personality. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 365 (1560): 3969–75. doi:10.1098/rstb.2010.0161.

Ihara, T., Tsujikawa, T., Fujiyama, Y., Ueyama, H., Ohkubo, I., & Bamba, T. 2000. Enhancement of brush border membrane peptidase activity in rat jejunum induced by starvation. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 440(1), 75-83.

Igarashi, M., & Guarente, L. 2016. mTORC1 and SIRT1 cooperate to foster expansion of gut adult stem cells during calorie restriction. *Cell*, 166(2), 436-450.

Jensen, T. L., Kiersgaard, M. K., Sørensen, D. B., & Mikkelsen, L. F. 2013. Fasting of mice: a review. *Laboratory Animals*, 47(4), 225-240.

Karasov, W. H. & J. M. Diamond. 1983. Adaptive regulation of sugar and amino acids transport by vertebrate intestine. *American Journal of Physiology* 245: G443-G462.

Krebs, H. A. 1950. Body size and tissue respiration. *Biochim. Biophys. Acta* 4, 249–269.

Langlands, A. J., Almet, A. A., Appleton, P. L., Newton, I. P., Osborne, J. M., & Nāthke, I. S. 2016. Paneth Cell-Rich Regions Separated by a Cluster of Lgr5+ Cells Initiate Crypt Fission in the Intestinal Stem Cell Niche. *PLoS Biology*, 14(6), e1002491.

Le Galliard, J.F., Paquet, M., Cisel, M. & Montes-Poloni, L. 2013. Personality and the pace-of-life syndrome: Variation and selection on exploration, metabolism and locomotor performances. *Functional Ecology*, 27, 136–144.

López-Calleja MV, Bozinovic F, 2003. Dynamic energy and time budget in hummingbirds: A study in *Sephanooides sephanioides*. *Comp. Biochem. Phys.* 134: 283–295.

Lusseau, D., Mitchell, S. E., Barros, C., Deros, D., Green, C., Chen, L., ... & Speakman, J. R. 2015. The effects of graded levels of calorie restriction: IV. Non-linear change in behavioural phenotype of mice in response to short-term calorie restriction. *Scientific reports*, 5, 13198.

Maldonado, K. WFD. van Dongen, RA. Vásquez & P Sabat. 2012. Geographic Variation in the Association between Exploratory Behavior and Physiology in Rufous-Collared Sparrows. 85(6): 618-624.

Mitchell, W. A., Abramsky, Z., Kotler, B. P., Pinshow, B., & Brown, J. S. 1990. The effect of competition on foraging activity in desert rodents: theory and experiments. Ecology, 844-854.

Morse AD, Russell JC, Hunt TW, Wood GO, Epling WF, Pierce WD. 1995. Diurnal variation of intensive running in food-deprived rats. Can J Physiol Pharmacol. 73: 1519-1523.

McCarter, R.J.M., 1998. Energy metabolism, nutrition and ageing. Australasian Journal on Ageing 17, 56-59.

McWilliams, S. R., & Karasov, W. H. 2001. Phenotypic flexibility in digestive system structure and function in migratory birds and its ecological significance. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 128(3), 577-591.

Naya, D. E., & Bozinovic, F. 2004. Digestive phenotypic flexibility in post-metamorphic amphibians: studies on a model organism. *Biological Research*, 37(3), 365-370.

Naya, D. E. 2008. Gut size flexibility in rodents: what we know, and don't know, after a century of research. *Revista Chilena de Historia Natural*, 81(4), 599-612.

Naya DE & Bozinovic F. 2006. The role of ecological interactions on the physiological flexibility of lizards. *Funct Ecol* 20:601– 608.

Naya, D. E., Feijoo, M., Lessa, E. P., Pardiñas, U. F., Teta, P., Tomasco, I. H., ... & D'Elía, G. 2014. Digestive morphology of two species of *Abrothrix* (Rodentia, Cricetidae): comparison of populations from contrasting environments. *Journal of Mammalogy*, 95(6), 1222-1229.

Noriega, Raul, F., Doffoel, R., Grenier, M., J. F., & Haffen, K. 1981. Modifications of brush border enzyme activities during starvation in the jejunum and ileum of adult rats. *Enzyme*, 28(4), 328-335.

Øivind, Tøien, John Blake, Dale M Edgar, Dennis a Grahn, H Craig Heller, and Brian M Barnes. 2011. Hibernation in black bears: independence of metabolic suppression from body temperature. *Science*. 331 (6019): 906–9. doi:10.1126/science.1199435.

O’connor, M. I., Piehler, M. F., Leech, D. M., Anton, A., & Bruno, J. F. 2009. Warming and resource availability shift food web structure and metabolism. *PLoS Biol*. DOI: 10.1371/journal.pbio.1000178

Overton, J M, and T D Williams. 2004. Behavioral and physiologic responses to caloric restriction in mice. *Physiology & Behavior* 81 (5): 749–54. doi:10.1016/j.physbeh.2004.04.025.

Peña-Villalobos. I, Fibla P., JS Salazar, and M. Sallaberry A. 2012. Cambios temporales en la abundancia y composición del ensamble de aves acuáticas en tranques artificiales en Chile central. *Gayana* 76(2): 92-101.

Sabat P & F Bozinovic. 2000. Digestive plasticity and the cost of acclimation to dietary chemistry in the omnivorous leaf-eared mouse *Phyllotis Darwini*. *J Comp. Physiol* 140: 411–417.

Raul, F., Noriega, R., Doffoel, M., Grenier, J. F., & Haffen, K. 1981. Modifications of brush-border enzyme activities during starvation in the jejunum and ileum of adult rats. *Enzyme*, 28(4), 328-335.

Réale, D. et al. 2007. Integrating animal temperament within ecology and evolution. *Biol. Rev.* 82: 291-318.

Réale, D., Garant, D., Humphries, M.M., Bergeron, P., Careau, V. & Montiglio, P.O. 2010. Personality and the emergence of the pace-of-life syndrome concept at the population level. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 365, 4051–4063.

Rikke, B.A., Yerg, J.E., Battaglia, M.E., Nagy, T.R., Allison, D.B., Johnson, T.E., 2003. Strain variation in the response of body temperature to dietary restriction. *Mechanisms of Ageing and Development* 124, 663–678.

Ringle, C. M., Wende, S. y Becker, J. M. 2015 "SmartPLS 3." Boenningstedt: SmartPLS GmbH, <http://www.smartpls.com>.

Russell JC, Epling WF, Pierce D, Amy RM, Boer DP. Induction of voluntary prolonged running by rats. *J Appl Physiol* 1987; 63: 2549–2553.

Silva, J.P., Von Meyenn, F., Howell, J., Thorens, B., Wolfrum, C. & Stoffel, M. 2009. Regulation of adaptive behaviour during fasting by hypothalamic Foxa2. *Nature*, 462.

Schultz, R L, E L Kullman, R P Waters, H Huang, and J P Kirwan. 2013. Metabolic adaptations of skeletal muscle to voluntary wheel running exercise in hypertensive heart failure rats. *Physiol. Res.* 62: 361-369.

Secor SM, Stein ED, Diamond JM. 1994. Rapid upregulation of snake intestine in response to feeding: a new model of intestinal adaptation. *Am J Physiol* 266:G696–G705.

Severinsen, T. & Munch, I. C. 1999. Body core temperature during food restriction in rats. *Acta Physiol. Scand.* 165, 299–305. (doi:10.1046/j.1365-201x.1999.00488.x)

Silva, Jose P, Ferdinand von Meyenn, Jessica Howell, Bernard Thorens, Christian Wolfrum, and Markus Stoffel. 2009. Regulation of adaptive behaviour during fasting by hypothalamic Foxa2.” *Nature* 462 (7273): 646–50. doi:10.1038/nature08589.

Sherwin, C.M., 1998. Voluntary wheel running: a review and novel interpretation. *Anim. Behav.* 56, 11–27.

Sohal, R. S., & Forster, M. J. 2014. Caloric restriction and the aging process: a critique. *Free Radical Biology and Medicine*, 73, 366-382.

Speakman JR, Gidney A, Bett J, Mitchell IP, Johnson MS. 2001. Limits to sustained energy intake IV: Effect of variation in food quality on lactating mice *Mus musculus*. *The Journal of Experimental Biology*. 204:1957–1965.

Speakman, J. R., & Mitchell, S. E. 2011. Caloric restriction. *Molecular aspects of medicine*, 32(3), 159-221.

Stamps, J.A. 2007. Growth-mortality tradeoffs and ‘personality traits’ in animals. *Ecology Letters*, 10, 355–363.

Swan H. 1974. *Thermoregulation and bioenergetics*. New York: Elsevier;

Takashima, S., Gold, D., & Hartenstein, V. 2013. Stem cells and lineages of the intestine: a developmental and evolutionary perspective. *Development genes and evolution*, 223(1-2), 85-102.

Taylor, C. R., and E. R. Weibel. 1981. Design of the mammalian respiratory system. I. Problem and Strategy." *Respiration Physiology* 44 (1): 1–10.

Van Oers, K., Drent, P.J. & van Noordwijk, A.J. 2004. Realized heritability and repeatability of risk taking behaviour in relation to avian personalities. *Proc. R. Soc. Lond. B* 271: 65-73.

Vásquez, R. A. 1997. Vigilance and social foraging in *Octodon degus* (Rodentia: Octodontidae) in central Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*, 70, 557-563.

Wang, Tobias, Carrie C Y Hung, and David J Randall. 2005. The comparative physiology of food deprivation: From Feast to Famine. *Annu. Rev. Physiol.* 2006. 68:223–51 doi:10.1146/annurev.physiol.68.040104.105739.

Weindruch, R., Kirstie, J.A., Cheney, K.E., Walford, R.L., 1979. Influence of controlled dietary restriction on immunologic function and aging. *Federation proceedings* 38, 2007–2016.

Weindruch, R., Kayo, T., Lee, C.K., Prolla, T.A., 2002. Gene expression profiling of aging using DNA microarrays. *Mechanisms of Ageing and Development* 123, 177–193.

Weiner, J. 1992. Physiological limits to sustainable energy budgets in birds and mammals: ecological implications. *Trends Ecol. Evol.* 7: 384–388.

Wilson, D.S., Clark, A.B., Coleman, K. & Dearstyne, T. 1994. Shyness and boldness in humans and other animals.-*Trends Ecol. Evol.* 9: 442-445

Yang, H., Youm, Y. H., Nakata, C., & Dixit, V. D. 2007. Chronic caloric restriction induces forestomach hypertrophy with enhanced ghrelin levels during aging. *Peptides*, 28(10), 1931-1936.

Yen, C. L. E., Cheong, M. L., Grueter, C., Zhou, P., Moriwaki, J., Wong, J. S., ... & Farese, R. V. 2009. Deficiency of the intestinal enzyme acyl CoA: monoacylglycerol

acyltransferase-2 protects mice from metabolic disorders induced by high-fat feeding.
Nature medicine, 15(4), 442-446.

Yilmaz, H., Katajisto, P., Lamming, D.W., Gültekin, Y., Bauer-Rowe, K.E., Sengupta, S., Birsoy, K., Dursun, A., Onur Yilmaz, V., Selig, M., Petur Nielsen, G., Mino-Kenudson, M., Zukerberg, L.R., Bhan, A.K., Deshpande, V. & Sabatini, D.M .2012.
mTORC1 in the Paneth cell niche couples intestinal stem-cell function to calorie intake.
Nature.

Zera, Anthony J., and Lawrence G. Harshman. 2001. The physiology of life history trade-offs in animals. Annual Review of Ecology and Systematics 32 (1): 95–126.
doi:10.1146/annurev.ecolsys.32.081501.114006.

Zeng, Ling-Qing, Li, Feng-Jie, Fu, Shi-Jian, Cao, Zhen-Dong, Zhang, Yao-Guang. 2012.
Effect of feeding on the function and structure of the digestive system in juvenile southern catfish (*Silurus meridionalis* Chen) of the digestive system in juvenile southern catfish. Doi:10.1007/s10695-012-9634-0.

Zhang, L.N., Wang, D.H., 2008. Effects of food restriction and refeeding on energy balance regulation in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). BFDG Abstracts/Appetite 51, 751–764.

Zhang, Li-na, Sharon E Mitchell, Catherine Hambly, David G Morgan, John C Clapham, and John R Speakman. 2012. Physiology & behavior physiological and behavioral responses to intermittent starvation in C57BL / 6J Mice. *Physiology & Behavior*. 105 (2): 376–387.

Zhao, Zhi-jun, and Jing Cao. 2009. Plasticity in energy budget and behavior in swiss mice and striped hamsters under stochastic food deprivation and refeeding. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 154: 84–91.

Zhao, Z.J., Wang, D.H., 2007. Effects of diet quality on energy budgets and thermogenesis in Brandt's voles. *Comp. Biochem. Physiol.* 148, A168–A177

Zhu, W. L. Y. Mu, H. Zhang, W. R. Gao, L. Zhang & Z. K. Wang. 2014. Effects of random food deprivation on body mass, behavior and serum leptin levels in *Eothenomys miletus* (Mammalia: Rodentia: Cricetidae), *Italian Journal of Zoology*. 227-234, DOI: 10.1080/11250003.2014.902511