

11261

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**Mapeo cerebral de c-fos inducido por diferentes  
condiciones durante la vigilia**

**T E S I S**

**Que para obtener el grado de:  
Maestro en Ciencias Biomédicas  
(Área Fisiología )**

**QUE PRESENTA EL BIÓLOGO:  
LUIS BELTRAN PARRAZAL**

**Director de Tesis: Dr. Réne Raúl Drucker Colín**

**México, D.F.**

**Agosto de 1997**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

## **ABSTRACT**

There are several neurotransmitters such as acetylcholine, serotonin and noradrenaline as well as several peptides referred to as sleep factors (SF), which play an important role in sleep regulation. Due to the existence of this great variety of substances of diverse biochemical nature and mechanisms of action affecting sleep, we propose a hypothesis which seeks to conciliate the role of these substances on sleep modulation. This hypothesis that as of the influence of different behavioral experiences during wakefulness, neuronal groups specifically related to a given experience are activated. These neurons will activate different SFs consequently inducing different "Kinds" of sleep.

In this study, we have determined whether diverse conditions such as forced wakefulness by gentle handling, added to stress by immobilization or food intake could produce changes in the c-fos expression. Our results indicate that different experimental condition induced activation of different neuronal system as revealed through c-fos expression patterns. This suggests that the state of brain's physiology during sleep, depends upon events which occur during the prior waking period and that this determines the patterns of sleep and possibly the sleep factors involved in its regulation.

## ***Resumen***

Algunos neurotransmisores como la acetilcolina, serotonina, noradrenalina y algunos neuropeptidos, también se les conoce como factores inductores de sueño (FIS). Estas sustancias tienen la capacidad de inducir un estado de quietud semejante al sueño. Actualmente se desconoce por que existe tan amplia variedad de FIS. Para tratar de explicar esto, nosotros hemos propuesto una nueva hipótesis, la cual sugiere, que como resultado de la influencia de las diferentes experiencias conductuales a las que se enfrenta el individuo durante el periodo de vigilia, diferentes grupos neuronales relacionados con el control de estas conductas son activados. Estos grupos neuronales son capaces de sintetizar y liberar algunos FIS, lo que da como resultado una diferente inducción a la fase de sueño. Por otra parte, se ha demostrado que después de una vigilia, una ingesta de alimento abundante o una situación de estrés agudo, se facilita la entrada a un periodo de sueño.

En el presente estudio se determinó como la vigilia forzada, la ingesta de comida y el estrés, producen cambios en el patrón de expresión de la proteína Fos en el cerebro. Los datos obtenidos sugieren que los diferentes estados metabólicos que ocurren en el cerebro después de un evento realizado en la vigilia, podrían estar repercutiendo en los mecanismos de generación del sueño que le sucede a dichas actividades. Es posible también, que los FIS que son sintetizados en las estructuras activadas durante la vigilia, estén regulando el proceso de inducción de sueño.

## Abreviaturas

3v	tercer ventrículo	Qo	quiasma óptico
4v	cuarto ventrículo	RD	rafe dorsal
5-HT	serotonina	Sl	septum lateral
A1	neuronas adrenérgicas	SO	núcleo supraóptico
Acb	núcleo acumbens	SP	sustancia P
ACTH	adrenocorticotripina	SRIF	somatostatina
Am	amígdala	SRRA	sistema reticular activador ascendente
APL	área preóptica lateral	TNF	factor de necrosis tumoral
AVT	arginina vacitocina	VIP	péptido vasoactivo intestinal
CG	área central gris	VMH	hipotálamo ventro medial
CRF	factor liberador de corticotropinas		
Cx pir	corteza piriforme		
CxF	corteza frontal		
DISP	factor inductor del sueño delta		
DM	hipotálamo dorso medial		
ENK	encefalina		
EST	estriado		
FIS	factor inductor de sueño		
GAL	galanina		
GH	hormona del crecimiento		
GHRF	hormona liberadora de la hormona del crecimiento		
HD	hipotálamo dorsal		
HL	hipotálamo lateral		
HPA	eje hipotálamo hipofisis adrenal		
IFN	interferon		
IL-1	interleucina 1		
LC	locus coeruleus		
LDTF	área lateral dorsal tegmental		
LH	hipotálamo lateral		
MOR	movimientos oculares rápidos		
MPs	muramyl péptidos		
NA	noradrenalina		
NPY	neuropéptido Y		
NTS	núcleo del tracto solitario		
OT	oxitocina		
PB	núcleo parabraquial		
PBL	núcleo parabraquial lateral		
Pn	pedunculo pontino		
POMC	proopiomelancortina		
PPTg	núcleo del pedunculo pontino tegmental		
PVN	núcleo paraventricular lateral		

# **INTRODUCCION**

Las investigaciones acerca de la generación y regulación del sueño, se han enfocado principalmente a la identificación del substrato anatómico y los neurotransmisores que regulan estos fenómenos. El impacto que ejercen las conductas ejecutadas durante el estado de vigilia sobre estos mecanismos, ha sido poco estudiado.

La primera explicación de cómo se generaba el sueño fue aportada por Aristóteles, quien sugirió que los vapores producidos en el estómago durante la digestión de la comida, eran transportados a través de los humores, los cuales alcanzaban el resto del cuerpo para producir sueño. De ésta hipótesis es fundamentalmente de donde surge el concepto de factor inductor de sueño (FIS).

En la actualidad se piensa que los cambios en las concentraciones de algunas sustancias en respuesta a uno o varios procesos fisiológicos que se realizan en la fase de vigilia, actúan para generar el sueño. Sobre este punto surgen varias preguntas como: ¿qué tipo de cambios sufren estas sustancias?, ¿qué induce estos cambios? y ¿en dónde suceden?. Estos son algunos de los temas que los investigadores de esta área han tratado de responder en el presente siglo.

En la época moderna, los primeros estudios sobre las causas que provocan el sueño fueron realizados en 1913 por Legendre y Pieron. Sus experimentos apoyaron la idea de que las sustancias que inducían sueño eran producidas en el período de vigilia. Para comprobar esta hipótesis, ellos extrajeron líquido cerebro espinal de perros privados de sueño, para posteriormente inyectarlo a perros no privados. El resultado obtenido fue la inducción de un estado de quietud semejante al sueño en los animales inyectados, por lo que concluyeron, que posiblemente en el líquido

cefaloraquídeo del animal privado, se encontraba una elevada concentración de alguna substancia inductora de sueño a la cual denominaron "hipnotoxina" (revisado por Krueger y Obal, 1994).

Hacia 1920, la teoría neural empezó a tomar fuerza en el estudio del sueño. Esta proponía, que el patrón eléctrico presente en las neuronas, jugaba un papel importante en la regulación de este fenómeno. Pero no fue sino hasta la década de los 60's, que la teoría neural de la regulación del sueño tuvo más aceptación, cuando von Economo correlacionó las lesiones producidas por la encefalitis letárgicas en el hipotálamo, con el insomnio que se presentaba en estos pacientes.

von Economo utilizó estos datos para sustentar la idea de que el hipotálamo anterior, era el responsable de la regulación del sueño (revisado por Krueger y Obal, 1994). Después de este descubrimiento, la teoría neurofisiológica de la regulación del sueño rápidamente fue apoyada por técnicas electrofisiológicas sofisticadas.

Paralelamente, el desarrollo y aplicación de técnicas bioquímicas, contribuyó a la obtención de información acerca de cómo las substancias inductoras de sueño son sintetizadas, transportadas, almacenadas y liberadas por las neuronas y las células gliales, así como también, cuál es su organización y distribución en el cerebro. Como resultado de estos descubrimientos, la teoría de la hipnotoxina y la neural, han resultado ser complementarias.

Por otra parte, en la identificación de los FIS se han utilizados tres paradigmas. El primero se basa en la hipótesis de que algunas substancias, aumentan en concentración cuando se experimenta una vigilia forzada o durante una enfermedad infecciosa (Borbély y Tobler, 1980). Algunos FIS que han logrado ser descubiertos con este paradigma son la glutathion oxidasa (GSSG), los muramil péptidos y la interleucina-1 (Krueger et al,

1982, 1987,1984; Shoham et al, 1987). El segundo paradigma utilizado, se sustenta en la idea de que las sustancias que son liberadas durante la fase de sueño, son importantes para su regulación. Esta aproximación dio como resultado el descubrimiento del péptido inductor de sueño delta (DISP) (Schenenberger et al, 1984). El tercer paradigma, se basa en el estudio de las sustancias que potencialmente pueden estar regulando la síntesis y/o liberación de otras proteínas relacionadas con el ciclo sueño-vigilia. Ejemplo de ello es el factor liberador de la hormona del crecimiento (GRF); el cual fue estudiado ya que es liberado durante la fase de sueño de ondas lentas, (también llamado sueño noMOR), en asociación con la liberación de la hormona del crecimiento (GH) (Drucker-Colín et al, 1975). En la tabla 1 se muestra la lista de algunas sustancias propuestas como FIS. Es importante destacar, que algunos de estos FIS ya se les conocía con anterioridad y se sabía que tenían otro tipo de actividad biológica, no relacionada con la inducción de sueño.

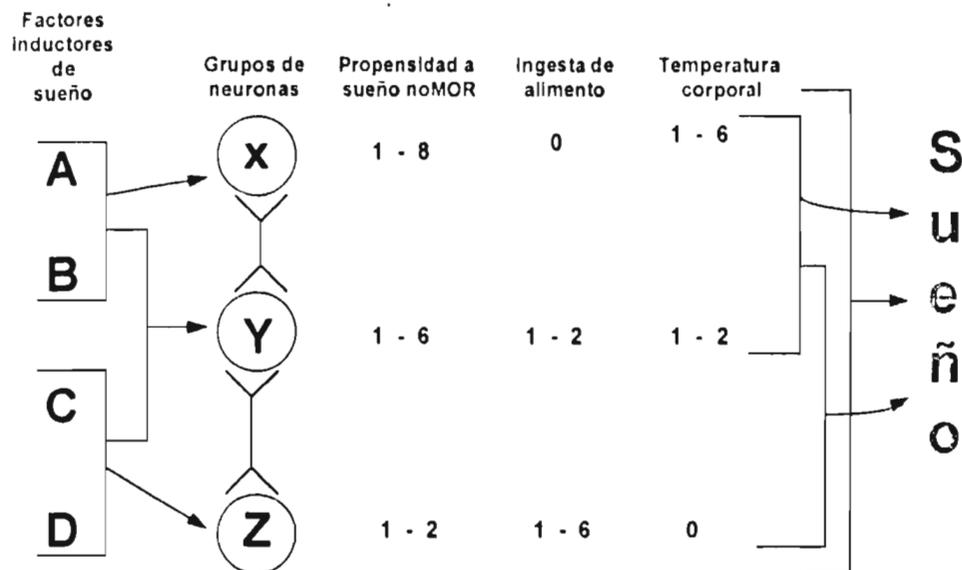
### **Factores inductores de sueño**

Factor inductor del sueño Delta (DISP)	Schornnberg, 1984
Arginina vasotocina (AVT)	Pavel, 1979
Péptido Vasoactivo (VIP)	Drucker-Colin et al. 1984
Factor liberador de la hormona de crecimiento(GRF)	Obel, 1986
Somatostatina (SRIF)	Danguir, 1986
Hormona del crecimiento (GH)	Drucker-Colin et al. 1975
Colectilocinina (CCK)	Mansbech y Lorenz, 1993
Insulina	Danguir y Nicolaidis, 1984
Péptido del lóbulo intermedio semejante a la corticotropina(CLIP).	Chastrette y Cespuglio, 1985
Neuropeptido Y	Zini et al 1984
Interleucina 1(IL-1)	Krueger et al. 1984
Interferon alfa-2 (IFN)	Shoham et al 1987
Factor de Necrosis Tumoral (TNF)	Krueger et al. 1987
Muramíl péptidos(MPs)	Krueger et al. 1982
Cortistatina	Lecea et al. 1995
Cis-9,10-octadecenoamida	Crevatt et al. 1995

**Tabla 1.** Lista de sustancias inductoras de sueño identificadas con los 3 paradigmas que se describen en el texto.

A la existencia de tan amplia variedad de FIS, aún no se le ha dado una explicación concluyente. Sin embargo, se cree que la interacción de dos

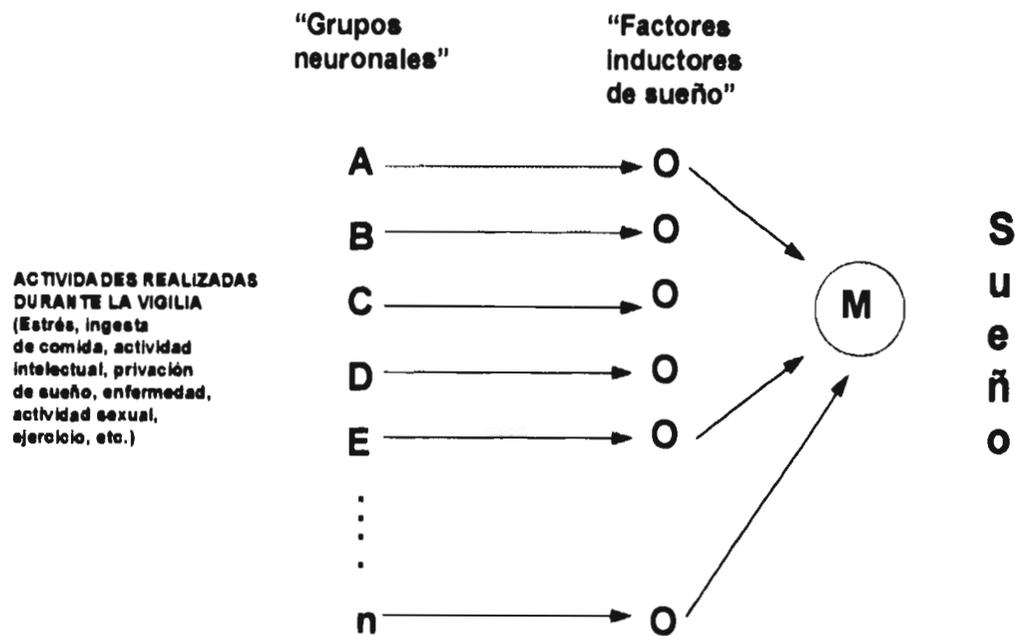
o más de estos FIS liberados en situaciones o conductas realizadas por el individuo durante la vigilia, promueven a diferentes niveles la propensión hacia el sueño (ver figura 1) (Krueger y Obal, 1994). Pero, esta propuesta no explica ¿cómo es que se induce la síntesis y liberación de los FIS?, ni ¿cuál es el papel que juegan las diferentes actividades realizadas durante la vigilia, sobre el proceso de inducción de sueño?



**Figura 1.** Este diagrama representa gráficamente la posible interacción de varios factores inductores de sueño con algunos grupos neuronales. Un factor inductor de sueño está definido como una substancia capaz de incrementar la propensión a la fase de sueño. Un grupo celular se define como una colección de neuronas que responden a uno o varios factores inductores (FIS) de sueño (X,Y,Z). Estos grupos celulares pueden estar asociados a un neurotransmisor. Algunos FIS estimulan la secreción de otras substancias (por ejemplo, GH), las cuales también puede provocar la inducción de sueño. Los rangos de salida (números) se representan como valores hipotéticos y muestran que no todos los grupos tienen la misma importancia en la inducción de sueño. Además la salida de un grupo de neuronas es variable y un solo grupo neuronal no es suficiente para inducir la fase de sueño (tomado de Krueger y Obal, 1994).

Recientemente en nuestro laboratorio hemos propuesto una nueva hipótesis, la cual trata de dar una explicación a estas interrogantes. Nuestra hipótesis plantea que las actividades que se realizan durante la vigilia como lo son el ejercicio, la ingesta de alimento, situaciones estresantes etc; son

capaces de accionar diferentes circuitos neuronales, que su vez inducen la síntesis y liberación de los FIS que en concentraciones y combinaciones adecuadas activan los circuitos involucrados en la generación de sueño (Drucker-Colín, 1995) (ver figura 2). Sin embargo, aún no se cuenta con las evidencias experimentales que apoyen dicha hipótesis.



**Figura 2.** El esquema muestra como las actividades que se realizan durante la vigilia, provocan la activación de ciertos grupos neuronales (A, B, C...etc.), los cuales liberan FIS (O). En concentraciones y combinaciones adecuadas estos FIS activan diferentes circuitos neuronales, que a su vez activan los mecanismos de generación de sueño (M).

Para poder correlacionar los eventos realizados durante la vigilia con los posibles mecanismos de generación de sueño, es necesario revisar los siguientes aspectos: ¿qué es lo que se conoce acerca de la regulación neuronal de la fase de vigilia?, ¿cómo es la regulación neuroquímica de algunas actividades realizadas durante esta fase? y ¿cómo estas actividades son capaces de asociarse con los mecanismos de regulación e inducción del sueño que se conocen hasta ahora?

### ***La fase de vigilia***

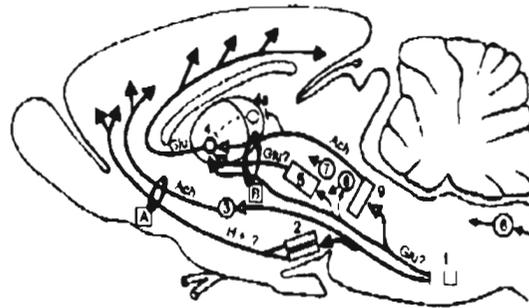
El estudio de los mecanismos involucrados en el mantenimiento de la fase de vigilia, comenzó con los experimentos de Bremer (1929), en los cuales él observó que al separar el bulbo raquídeo de la médula espinal, inducía un estado permanente de ondas lentas en el electroencefalograma (EEG) (citado Jouvet y Moruzzi, 1972). Kleitman en 1939, sugirió entonces que la vigilia se mantenía y era regulada por la entrada continua de estímulos sensoriales (citado en Jones, 1989). Posteriormente, Moruzzi y Magoun (1949), demostraron que la estimulación eléctrica de la formación reticular del tallo cerebral, pero no de las vías sensoriales, producía un estado de vigilia en los animales que se encontraban dormidos, a este fenómeno se le denominó despertar electroencefalográfico. De este modo, se postuló que el Sistema Reticular Activador Ascendente (SRAA), tiene la función principal de activar la corteza cerebral durante la vigilia, la cual entonces no depende de una entrada sensorial continua (Moruzzi y Magoun, 1949).

Posteriormente, Jones y Beaudet (1987), demostraron la existencia de tres vías de inervación principales, las cuales mandan proyecciones difusas a la corteza cerebral y los núcleos medial e intralaminar del tálamo. Estas vías mantiene la activación tónica cortical y por lo tanto la fase de vigilia. La ruta ventral está constituida por fibras noradrenérgicas y serotoninérgicas que activan el EEG a través de sus proyecciones tanto al hipotálamo, subtálamo y al cerebro basal, como directamente a la corteza y al hipocampo (Jones y Yang, 1985; Steinbush, 1984). Las fibras de la ruta dorsal se originan en los núcleos colinérgicos del pedúnculo pontino (PPT) y lateral dorsal tegmental (LDTF) (El Mansari et al, 1989). Estos núcleos modulan la actividad sincrónica espontánea de las células gabaérgicas del núcleo reticular talámico (RT). Como se observa en la figura 3, las fibras de

la ruta ventral parecen tener una influencia extratalámica, en la activación del EEG y la vigilia, más importante que en el caso de la ruta dorsal, ya que presenta un gran número de proyecciones difusas al hipotálamo, el cerebro basal y la corteza (Jones, 1989).

Por otra parte, los núcleos Locus coeruleus (LC) y Rafé dorsal (RD), uno noradrenérgico y el otro serotoninérgico respectivamente, presentan una frecuencia de disparo máxima durante el sueño de movimientos oculares rápidos (MOR), por lo que se sugiere también juegan un papel activador selectivo de la vigilia (Hobson et al, 1975).

### Vigilia



**Figura 3.** Esquema de un corte parasagital del cerebro de la rata. En este se muestran las principales vías y neurotransmisores que participan en la generación y mantenimiento de la vigilia (Tomado de Gonzalez et al, 1994).

- A : Vía reticulo-hipotálamo-corticales
- B : Vía reticulo-tálamo-cortical.
- 1 : Núcleo retículo bulbar magnocefalular.
- 2 :Hipotálamo posterior con el sistema histaminérgico y otro sistema aún no identificado.
- 3 : Núcleo basal de Meynert (sistema del telencéfalo basal).
- 4 : Núcleo intralaminar del tálamo que se extiende hacia la corteza.
- 4a : Núcleo reticular del Tálamo(sistema responsable de la activación de sueño de ondas lentas(esteste sistema se encuentra inhibido durante la vigilia).
- 5 : Formación reticular mesencefálica.
- 6 : Complejo del tracto solitario, el cual recibe las aferentes del sistema vegetativo.
- 7 : Núcleo del rafé dorsal (5-HT).
- 8 : Complejo del Locus coeruleus (Sistema noradrenérgico).
- 9 : Núcleos mesopontino colinérgicos.

Adicionalmente, se ha reportado que la lesión del hipotálamo posterior produce somnolencia continua (Nauta, 1946). En estudios recientes se ha demostrado que el hipotálamo posterior manda fibras histaminérgicas

difusas a la corteza y al tálamo, las cuales forman parte del sistema regulador de la vigilia (Lin et al, 1988).

Por otra parte, la región tubero-infundibular del hipotálamo contiene una gran cantidad de neuronas histaminérgicas, que presentan una actividad neuronal parecida a la del LC y RD, es decir que son REM off (Sakai y et al, 1990). Es probable que estas células histaminérgicas tengan un papel semejante a las neuronas noradrenérgicas (NA) y serotoninérgicas (5-HT). Sin embargo, aún no se cuenta con evidencias experimentales que demuestren la capacidad moduladora de la histamina en la corteza y el tálamo (Sakai et al, 1990).

Por último, la estimulación eléctrica del núcleo de Meynert y la sustancia innominata (núcleos colinérgicos del cerebro basal que proyectan directamente a la corteza del tálamo), inducen una activación cortical y alertamiento, por lo que estos núcleos también son incluidos en el sistema regulador de la vigilia (Saper, 1985).

En resumen, el mecanismo neuronal que regula la vigilia presenta varios sistemas interdependientes que actúan a nivel talámico y extratalámico, para modular la actividad cortical de esta fase.

Por otro lado, en el período de vigilia se llevan a cabo una serie de actividades que se piensa pudieran influir sobre los mecanismo de generación de sueño. Una de las primeras actividades realizadas por el individuo durante la vigilia y asociada con la inducción de la fase de sueño, es la ingesta de alimento (Danguir et al, 1979). Otra actividad con este poder de influencia es el estrés, el cual al ser inducido por inmovilización en la rata provoca un aumento en la cantidad de sueño total que le precede al período de estrés (Rampin et al, 1991).

En los siguientes apartados se describe de manera breve, los mecanismos neuronales por los cuales son reguladas la conducta de ingesta

de alimento y la respuesta al estrés. Esto con el objetivo de tratar de entender cuál sería la posible relación anatómica o neuroquímica, entre los circuitos que regulan estas actividades y la inducción de sueño.

### ***Ingesta de alimento***

Los pioneros en el estudio del control cerebral del proceso de la ingesta de alimento, fueron Hetherington y Ranson (1942), quienes reportaron que la lesión en la región del núcleo hipotálmico ventromedial y del tejido que le subyace producía hiperfagia, la cual resultaba en una obesidad severa. En contraste, Anand y Brobeck (1951), encontraron que la lesión bilateral del hipotálamo lateral producía el efecto opuesto al cual denominaron afagia, en donde los animales morían por falta de ingesta de alimento y deshidratación. Además, la estimulación eléctrica produce el efecto opuesto: la estimulación lateral produce apetito, mientras que la estimulación medial lo suprime. Estas evidencias llevaron a la conclusión, de que el centro del apetito se encontraba en el hipotálamo lateral y que el centro de la saciedad se localizaba en el hipotálamo medial.

Esta conclusión es errónea, ya que el cerebro no está organizado en núcleos discretos que controlen funciones específicas de manera aislada. En realidad las funciones cerebrales se desarrollan a través de complicados circuitos neuronales, que implican más de un núcleo en el cerebro.

Los efectos obtenidos sobre la ingesta de alimento con las estimulaciones y lesiones del hipotálamo medial y lateral, pueden ser atribuidas a varios factores, por ejemplo: 1) alteración de la vía sensorial, 2) alteración del equilibrio hormonal y 3) el efecto sobre las fibras que pasan por esta zona sin realmente pertenecer a este núcleo. Las lesiones en el hipotálamo lateral, algunas veces van acompañadas también de lesión de las fibras del sistema trigémino, lo que da como resultado una baja en la

percepción sensorial, que contribuye a la afagia. Al seccionar las entradas periféricas del nervio trigémino también se observan cambios en la conducta de ingesta de alimento (Kissilef y Van Itallie, 1982). Las respuestas sensoriales alteradas son comúnmente observadas en animales que presentan hiperfagia provocada por la lesión de la región ventromedial del hipotálamo (Rolls, 1981).

Además, la conducta de ingesta de alimento también se ve alterada por la acción de algunas hormonas, como las esteroideas, el glucagon, la insulina y la hormona del crecimiento (Plata-Salaman, 1989). De tal manera, que las lesiones en el hipotálamo afectan invariablemente algunos de los sistemas de control de la conducta de la ingesta de alimento. Por ejemplo, la lesión del hipotálamo medial da como resultado, un aumento en la liberación de insulina cuando los animales comen. Esta respuesta explica en parte la hiperfagia y la ganancia de peso del animal después de la lesión medial del hipotálamo (Rolls, 1981).

Por otra parte, las lesiones hechas en el hipotálamo lateral provocan daños sobre el haz de fibras que emerge del núcleo de la sustancia negra y que proyecta al estriado, así como también de fibras dopaminérgicas que emergen del área ventro tegmental y que proyectan a diversos núcleos del sistema límbico, corteza prefrontal y núcleo accumbens, los cuales al ser lesionados provocan afagia similar a la observada cuando es lesionado el hipotálamo (Olds y Milner, 1951).

Es por ello que la utilización de ensayos farmacológicos se ha hecho mas común en el estudio de la conducta de ingesta de alimento.

Olson y colaboradores (1993), demostraron que los tratamientos farmacológicos que inhiben la ingesta de alimento y la motilidad gástrica, están estrechamente asociados con la activación neuronal de áreas sensoriales vágales y del tallo cerebral; ejemplo de ellas son el núcleo del

tracto solitario y el área postrema. En contraste, los tratamientos que potencian la ingesta de alimento y la motilidad gástrica, presentan poca activación neuronal en estos núcleos. Los patrones de activación en el cerebro anterior también difieren en estos casos. Por otra parte, los tratamientos farmacológicos que inhiben la ingesta de alimento y la motilidad gástrica, afectan preferencialmente a las áreas del núcleo paraventricular (PVN) y la cama de la estría terminal (BNST). Sin embargo, la inhibición de la ingesta de alimento que se lleva a cabo de manera espontánea, no parece estar asociada con la activación significativa de estas áreas. Además, se ha observado que los tratamientos de alteración de ingesta de alimento, no provocan cambios significativos en la actividad del área ventromedial hipotalámica (VMH) (Olson et al, 1993).

Por otra parte, el estudio de la conducta de ingesta de alimento y saciedad también está correlacionado con la secreción de algunos péptidos. Por ejemplo, la colisitocinina (CCK) ha sido propuesta como un potente estimulador de la saciedad, ya que la administración sistémica de esta sustancia, provoca de manera dosis dependiente la inhibición de la ingesta de alimento (Stacher, 1985).

Otros péptidos como la bombesina (BO), glucagon, somatostatina (SOM) y el factor liberador de la hormona del crecimiento (GHRF), también están involucrados en la regulación de la saciedad (Gibbs y Bourne, 1985; Imaki et al, 1985).

Otras sustancias relacionadas con el control de la ingesta de alimento, son los opioides endógenos. Los efectos anoréxicos de los agonistas opioides, están asociados a la activación del receptor de tipo  $\mu$ . (Yim y Lowy, 1984). Sin embargo, existen otros péptidos como la dinorfina (DYN), cuyo receptor a opioides del tipo  $\kappa$  al ser activado provoca apetito (Levine y Morley, 1984).

Por otra parte, el sueño es una de las características conductuales que se percibe claramente después de que el animal ha saciado su apetito (sueño posprandial). Danguir y colaboradores (1979), demostraron que el sueño posprandial se ve afectado por la composición y la cantidad de comida que el animal ingiere. La relación entre la comida y el sueño, también se ve afectada por la acción de algunos neuropéptidos que regulan el fenómeno de saciedad (De Saint, et al, 1989). En estudios recientes se ha observado, que después de una ingesta de alimento inducida por la inyección intracerebroventricular de noradrenalina, se provoca la entrada a un período de sueño intenso semejante al posprandial (Denbow et al, 1983).

Estas evidencias sugieren que los fenómenos de saciedad y sueño posprandial, están relacionadas anatómicamente u hormonalmente. Sin embargo, aún no existen evidencias experimentales suficientes que apoyen esta posible relación.

### ***Estrés***

Selye en 1936 describió el síndrome general de adaptación. Este síndrome abarca el conjunto de cambios orgánicos que se dan en el organismo como respuesta a toda una gran variedad de estímulos nocivos. La palabra estrés la introdujo el propio Selye para indicar la respuesta del organismo y definió como estresante al estímulo o agente nocivo (Selye, 1973).

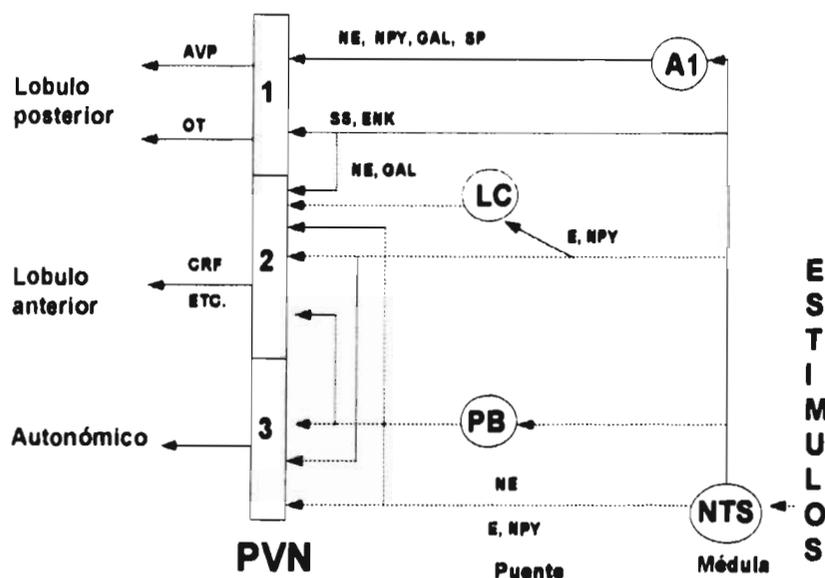
Los factores estresantes son aquellos estímulos ambientales cuya percepción por el sistema nervioso no coincide con la representación neuronal de experiencias previas. Los estímulos estresantes incluyen tanto los cambios del medio interno (lesión tisular, hemorragias, infección etc.), como del medio externo (frío, calor, agresión, etc.), alteraciones psicológicas

(miedo, rabia, ansiedad, sorpresa, etc.) o la combinación de estas (Axelrod y Reisine, 1984).

Los estímulos estresantes también pueden causar desequilibrios metabólicos, los cuales a su vez provocan daños tisulares, infecciones o baja de fluidos corporales, que repercuten sobre el comportamiento del animal. Los estudios hasta ahora realizados acerca del estrés han permitido conocer las modificaciones que sufre la frecuencia cardiaca, la termorregulación y el sistema endocrino ante el estímulo estresor (Chen et al, 1995). Los mecanismos neuronales que regulan la respuesta al estrés, aun no son del todo claros. Sin embargo, en las investigaciones realizadas hasta ahora, se ha sugerido que en el cerebro, el núcleo paraventricular hipotálamico (PVN), es el responsable de la regulación de la respuesta al estrés. Este núcleo controla la síntesis y liberación de las hormonas del lóbulo posterior y anterior de la glándula pituitaria. Además, influye directamente sobre las neuronas autonómicas preganglionares del tallo cerebral y la médula espinal (Swanson y Sawchenko, 1983; Swanson y Sawchenko, 1986).

Las neuronas del PVN reciben información del núcleo tracto solitario (NTS), el cual a su vez es inervado por el nervio vago y glosofaringio. Estos nervios transmiten la información de los cambios que se dan en el ambiente en donde se encuentra el individuo. En el NTS encontramos tres regiones, las cuales están constituidas por 1) neuronas adrenérgicas, 2) noradrenérgicos y 3) peptidérgicas. Estas poblaciones neuronales proyectan hacia el PVN de una manera isotópica sobre las células que contienen el factor liberador de corticotropinas (CRF) (Swanson y Sawchenko, 1986, Harbuz et al, 1995, Krishanan et al, 1991). Además, existen otros grupos adrenérgicos que provienen del núcleo parabraquial lateral (PBL). Por otra parte, las neuronas que sintetizan oxitocina (OT), también reciben una

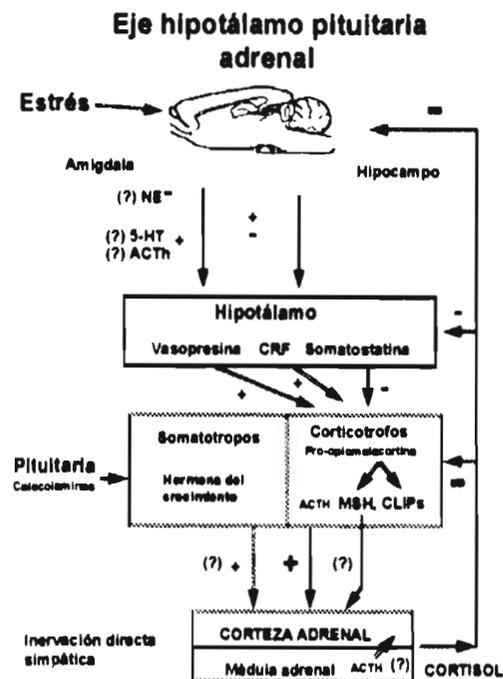
extensa inervación del NTS pero sólo de neuronas peptidérgicas de la parte caudal del núcleo. En contraste, las neuronas que sintetizan vasopresina (AVP), reciben inervación directa del NTS, pero están inervadas por células noradrenérgicas del área A1 de la médula ventrolateral que son inervadas a su vez por neuronas del NTS (Saper y Loewy, 1980, Cunningham y et al, 1990) (ver figura 4).



**Figura 4.** El esquema representa la organización anatómica y neuroquímica de las entradas sensoriales hacia el PVN. También se muestran los tres principales blancos de inervación de las células del PVN, así como las vías por las cuales el NTS (núcleo del tracto solitario) inerva a estas mismas. Nótese que existe un solapamiento de la inervación. Abreviaciones: PB, parabraquial; LC, Locus coeruleus; NE, norepinefrina; E, epinefrina; NPY, neuropéptido Y; GAL, Galanina; ENK, encefalinas; SP, substancia P; SS, Somatostatina; VAS, vasopresina; OT, oxitocina. (Sawchenko, 1991)

Por otra parte, la región parvocelular del PVN sintetiza y secreta el factor liberador de corticotropina (CRF), el cual regula la actividad secretoria de la glándula pituitaria la síntesis y liberación de la adenocorticotrópina (ACTH). El CRF también es expresado en neuronas del sistema límbico (por ejemplo, hipotálamo y amígdala), tallo cerebral (en el núcleo parabraquial, locus coeruleus y complejo vagal dorsal), y en algunas áreas de la corteza (Arnold et al, 1992).

En una situación de estrés agudo, se activa al eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (HPA). Cuando esto sucede se elevan las concentración plasmática de ACTH, así como también, aumentan los niveles de RNAm de CRF y pro-opiomelanocortina (POMC) en la región parvocelular del PVN y la pituitaria anterior respectivamente (Swanson y Sawchenko, 1986, Krishnan et al, 1991, (ver figura 5).



**Figura 5.** Eje hipotálamo hipofisario. En el hipotálamo se libera el CRF, el cual estimula los corticotropos para liberar la ACTH, la cual provoca la liberación del cortisol en la corteza de la glándula adrenal. El cortisol ejerce un feedback negativo sobre el eje a múltiples niveles, entre los que destacan el hipocampo, la pituitaria y hipotálamo (Tomado de Krishnan et al, 1991).

Por otra parte, durante los últimos cuatro años los investigadores en el área de sueño han prestado atención sobre la respuesta al estrés. Por ejemplo, en la rata el estrés inducido por inmovilización y en ausencia de la privación de sueño provoca un aumento en la cantidad de sueño total (Rampin et al, 1991).

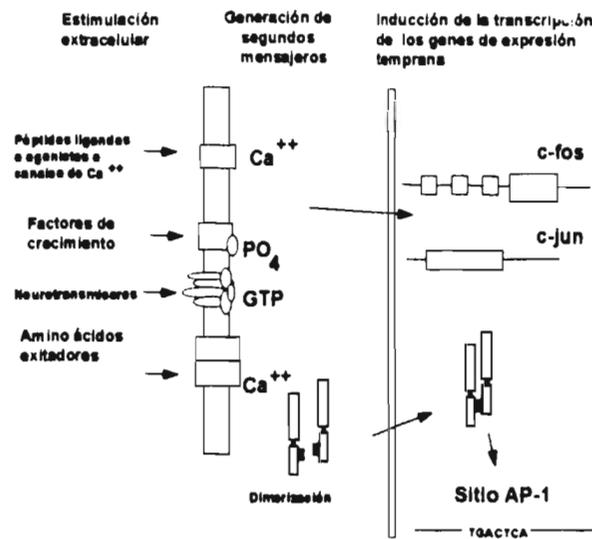
### ***El proto-oncogen c-fos***

El desarrollo celular se puede decir que está influenciado por dos principales tipos de señales. La primera está dada por mensajes de tipo externo, mientras que la segunda emana de fuentes intracelulares denominadas señales intrínsecas. Estos dos tipos de señales contribuyen a la regulación del metabolismo celular, la cual está supeditada a los patrones cualitativos y cuantitativos de la expresión de los genes de transcripción. En el caso de las señales extrínsecas las sustancias como las hormonas, factores tróficos y matriz extracelular, son necesarios para accionar los mecanismos de transducción, los cuales están acoplados a moléculas efectoras que activan la expresión de genes. Los detalles de cómo las células eucariontas son capaces de llevar a cabo la transducción de señales, no son conocidos todavía. En los últimos años el estudio de los genes de expresión temprana como el c-fos, ha permitido empezar a revelar la compleja naturaleza bioquímica de estas vías de transducción de señales.

El término fos se utilizó inicialmente para describir al oncogen codificado por el virus murino osteogénico del sarcoma de Finkel-Biskins-Jenkins (FBJ-MSV) (Curran y Teich, 1982). Como otros virus oncogénicos, el FBJ-MSV se derivó de la recombinación de secuencia retroviral, con la información génica normal de la célula. A la secuencia normal de donde se derivó el oncogen viral (v-fos), entonces se le llamó proto-oncogen c-fos (Curran y Verman, 1984).

Uno de los datos experimentales sobre c-fos que sugirió su función en los procesos de transducción de señales, fue el descubrimiento de que su expresión podía ser inducida de forma transitoria a niveles elevados (10 a 15 veces más sobre la basal) al ser estimulada la célula con suero o factores tróficos (Greenberg et al, 1986).

La proteína Fos es una fosfoproteína que forma complejos heterodiméricos con proteínas de la familia Jun, que se unen a secuencias específicas de DNA, como la on -TGACTCA- o también llamado sitio AP1, participando de esta forma en la regulación de la expresión de otros genes (ver figura 6) (Curran, 1988).



**Figura 6.** El acople del estímulo extracelular con la expresión del *c-fos* y *c-Jun* tiene repercusión sobre el desarrollo neuronal. El modelo sugiere que el estímulo activa la vía de segundos mensajeros lo cual provoca: primero que el mensaje active una respuesta a corto plazo que no requiere de la transcripción genica. Segundo que alguno de estos mensajeros evoque la transcripción de *c-fos* y *c-Jun*, elementos reguladores de transcripción de otros genes. El DNA que codifica para Fos y Jun es transcrito en el citoplasma y las proteínas son translocadas rápidamente de regreso al núcleo, para posteriormente ser modificadas post-transcripcionalmente y asociarse como heterodimeros o dimeros. El heterodimero Fos-Jun tiene un alta afinidad de unión, por la secuencia reguladora AP-1 en el DNA. Este dominio tiene influencia sobre la transcripción de otros genes. Este último efecto es el responsable de la respuesta de adaptación a largo plazo. (Tomada de Curran y Morgan, 1994).

La curva curso temporal de la expresión de *c-fos* ha sido caracterizada en células tumorales en cultivo. La inducción de la transcripción sucede desde los 5 min, después de haber iniciado la estimulación celular y esta continua por 15 min. mas. El RNAm se acumula llegando a su valor máximo a los 45 min. después de la estimulación, para posteriormente ser degradado (Muller et al, 1984). La proteína Fos es acumulada y transportada al núcleo celular una hora después de ser aplicado el estímulo. La

concentración de Fos se mantiene en estos valores por una hora más y después empieza a ser degradada (Muller et al, 1984). En experimentos realizados con neuronas cultivadas, se ha observado que al ser estimuladas con neurotransmisores o pulsos despolarizantes de corriente también se provoca la inducción de la expresión del c-fos. (Greenberg et al, 1986; Morgan y Curran, 1986).

La misma cinética de acumulación de la proteína Fos en el núcleo celular después de la estimulación, ha sido observada *in vivo* en neuronas del sistema nervioso central. Por ejemplo, la estimulación táctil o nociceptiva provoca un aumento en el número de células inmunorreactivas a Fos, en la médula espinal (Hunt et al, 1987). También se ha demostrado, que los estímulos fóticos elevan la reactivada a Fos en la retina y el núcleo supraquiasmático (Earnest et al, 1990; Sagar y Sharp, 1990).

El hecho de que los estímulos aplicados a animales de experimentación provoquen un aumento en la expresión de c-fos, permite que la inmunohistoquímica contra la proteína Fos pueda ser útil para la construcción de mapas de los núcleos neuronales en el cerebro, que son activadas como respuesta a un evento fisiológico específico.

El mapeo de la expresión de este gene no sólo se ha utilizado para estudiar el efecto de fármacos o lesiones en el sistema nervioso, sino también para tratar de explicar fenómenos fisiológicos complejos como el sueño (Merchant et al, 1992). Trabajos como el antes citado, han contribuido a identificar cuáles son los posibles grupos neuronales involucrados en el mantenimiento del sueño MOR en la rata.

La técnica de inmunohistoquímica contra la proteína Fos tiene ventajas sobre el mapeo cerebral hecho con 2-Desoxiglucosa (2-DG) radioactiva en los siguientes aspectos: a diferencia de la 2-DG en donde el muestreo de la actividad metabólica sólo permite la visualización de grandes

---

regiones, la técnica de inmunohistoquímica contra la proteína Fos es capaz de dar una resolución a nivel celular, ya que permite el inmunomarcaje de los núcleos celulares y por lo tanto es posible identificar grupos de neuronas activas. Además, también es posible identificar por medio del doble inmunomarcaje, las células que están activas, así como también conocer el tipo de neurotransmisor que son capaces de sintetizar. Lo cual no puede ser llevado a cabo con la técnica de 2-DG.

Sin embargo, también presenta desventajas, entre las cuales se encuentran las siguientes: La expresión inespecífica de Fos por estrés inducido durante la manipulación experimental del animal. Además de que no todas las células expresan la proteína, aún cuando hayan sido expuesto previamente a un estímulo.

Es importante destacar que estos últimos rubros, no han sido un impedimento para que esta metodología se utilice en estrictas condiciones experimentales, en la construcción del mapeo de las regiones cerebrales que intervienen en un cierto fenómeno fisiológico.

## **Planteamiento del problema**

Las manipulaciones experimentales como lesiones cerebrales, registros electrofisiológicos y la inyección de fármacos, han ayudado a identificar regiones hipotálamicas y pontobulbares responsables del control del ciclo sueño-vigilia. Sin embargo, aún se desconocen muchas de las regiones cerebrales que están implicadas en el control y mantenimiento de este proceso fisiológico. El problema se vuelve aún más complicado al saber que algunas estructuras solo participan de manera específica en el periodo de sueño. Técnicas como el registro electrofisiológico unitario, permiten determinar la participación de neuronas específicas en un fenómeno fisiológico, sin embargo, solo se puede aplicar a unas cuantas células de toda una región cerebral. Recientemente, algunos grupos de investigación han propuesto como un marcador de actividad neuronal al gene de expresión temprana C-fos, ya que su expresión es rápidamente inducida por estimulación extracelular (Morgan y Curran, 1986,1990 ) y es capaz de regular la transcripción de otros genes (Kerppola y Curran, 1991 Curran, 1988, Fritschy et al, 1991). El RNAm de C-fos muestra un aumento en su concentración después de 5 minutos de estimulación y la concentración máxima de proteína Fos en el núcleo celular se presenta 2 hrs. después del estímulo (Sheng y Greenberg, 1990; Muller et al, 1984). De este modo, con la inmunohistoquímica a Fos es posible construir mapas cerebrales que ayudan a identificar los grupos neuronales que son activados después aplicar un estímulo. Por ejemplo el c-fos se ha muestreado en el cerebro después de la aplicación de estímulos nociceptivos (Hunt et al, 1987); auditivos, (Ehret y Fischer, 1991); cuando se aplican anestésicos (Marota et al, 1992); después de la inyección de drogas (Sallaz y Jourdan,

1993); cuando se someten al animal a un estrés agudo (Chen y Herbert, 1995) o se hacen manipulaciones conductuales (Swank y Brenstein, 1994).

Los estudios de c-fos en relación con el ciclo sueño-vigilia son recientes. En la rata, la expresión de c-fos se ha estudiado después de la privación de sueño y en la vigilia espontánea (Pompeiano et al, 1992, 1994) o con la estimulación auditiva asociada a un aumento de la fase de sueño MOR (Merchant et al, 1994). El estudio de las poblaciones neuronales responsables de la generación de sueño, se ha estudiado con la técnica de c-fos en animales privados de sueño total por 24 hrs (Pompeiano et al, 1992). La privación de sueño se ha escogido como manipulación experimental, por que en previos estudios se ha observado que ésta aumenta la propensión a sueño (Borbély y Tobler, 1989).

Por otra parte, recientes estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio, muestran que las experiencias previas que se presentan durante la vigilia como: el estrés, la ingesta de comida y la misma vigilia forzada, generan cambios en la arquitectura del sueño que le sucede (ver figura 7). (García, 1997). El impacto que tienen estas experiencias sobre la arquitectura del sueño, nos ha llevado a preguntar cuáles son los posibles mecanismos que provocan estos cambios. Nosotros hemos sugerido que durante el estrés, la vigilia forzada y la ingesta de alimento, son activadas diferentes regiones en el cerebro, que podrían estar participando en la generación del sueño que le sucede a dichas experiencias (Drucker, 1995).

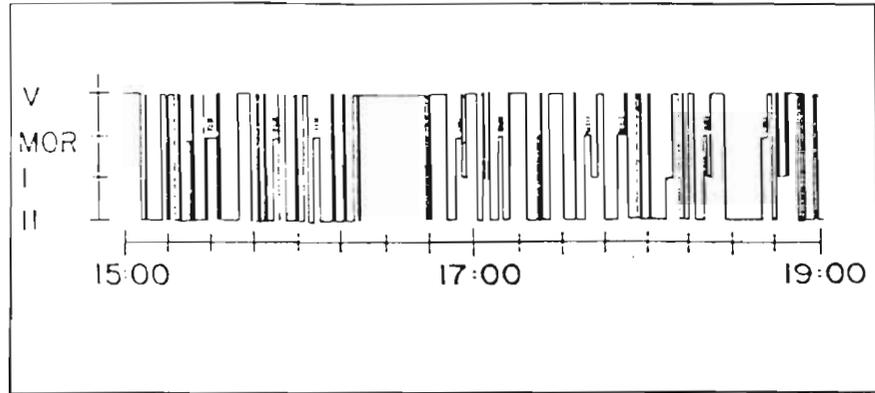
Como se ha expuesto anteriormente, los trabajos realizados para tratar de correlacionar al estrés y la ingesta de alimento, con el proceso de sueño, solo se limitan a describen el efecto que tienen estas experiencias sobre la actividad del EEG en el periodo de sueño que le sucede (Danguir, 1986, Rampin et al, 1991, Garcia, 1997). Además, no existen trabajos que muestren la situación metabólica cerebral que se presenta después de

metabólica cerebral de animales que se encuentren en dichas situación. Es importante aclarar que el objetivo del presente estudio, no es el de conocer cuáles son las regiones cerebrales que participan en la conducta de ingesta de alimento, vigilia forzada o estrés. Si no más bien, saber cuál es la situación metabólica en la que se encuentra el cerebro después haber tenido alguna de estas experiencias y antes de entrar a un periodo de sueño, que en trabajos previos se ha demostrado se encuentran asociado a la conducta de ingesta de alimento y estrés inducido por inmovilización (Danguir, 1986; Rampin et al, 1991; Garcia, 1997)

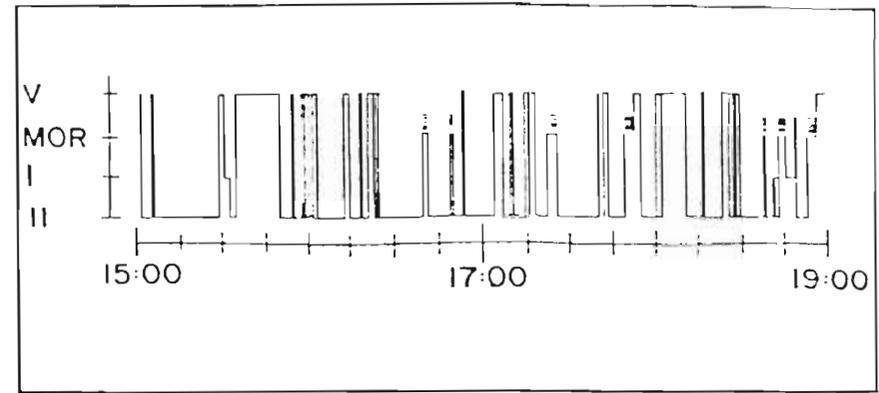
Figura 7 Representación gráfica de cuatro hipnogramas de animales sometidos a diferentes experiencias durante la vigilia. En el eje de las abscisas V, se refiere a vigilia; MOR movimientos oculares rápidos; I y II, Sueño lento 1 y 2. El eje de las ordenadas corresponde al tiempo en minutos. Nótese que el grupo de estrés presenta un aumento en la frecuencia de los periodos de sueño MOR. En el caso de ingesta de alimento se observa una reducción en el tiempo de entrada a sueño MOR (latencia) (Tomado de Garcia ,1997)

haber tenido alguna de estas experiencias y antes de presentares el periodo de sueño que se ve asociado a ellas. Es por ello que el presente estudio tienen como objetivo principal, la construcción de un mapa de la actividad

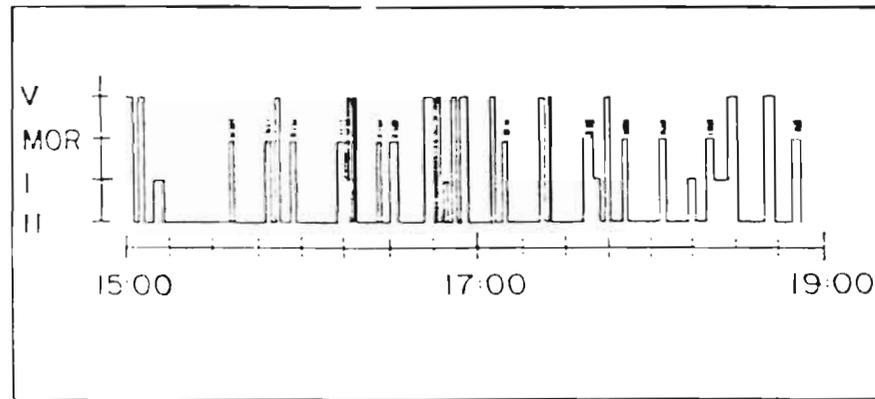
CONTROL



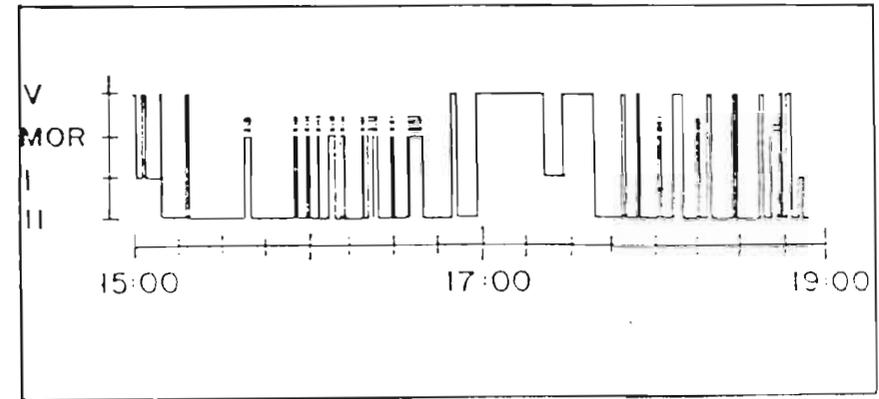
VIGILIA FORZADA



ESTRES



INGESTA DE COMIDA



### ***Hipótesis***

Si actividades como el estrés inducido por inmovilización, la ingesta de alimento y la vigilia forzada, provocan cambios en el metabolismo cerebral, entonces estos cambios se verán reflejados en la distribución y número de células inmunorreactivas a la proteína Fos en el cerebro.

### **Objetivos**

Determinar el número y distribución de células inmunoreactivas a la proteína Fos en el cerebro de la rata, después de un período de vigilia forzada, estrés por inmovilización o ingesta de alimento.

Determinar si existe una relación entre los núcleos cerebrales activos y los núcleos que se conoce participan en la generación y/o modulación del sueño.

## **Materia y Métodos**

Cincuenta y dos ratas de la especie Wistar con un peso promedio de 280gr. fueron aleatoriamente divididas en los siguientes grupos experimentales:

Grupo 1 Control (n=10)

Grupo 2 Estrés por inmovilización (n=6)

Grupo 3 Ingesta de comida (n=6)

Grupo 4 Vigilia forzada (n=10)

Grupo 5 Vigilia forzada asociada a estrés por inmovilización (n=10)

Grupo 6 Vigilia forzada asociada a la ingesta de comida (n=10)

Al grupo 1, se le mantuvo en una cámara sonoamortiguada durante 5 hrs., período en el cual el animal durmió libremente. La influencia de la vigilia forzada por 4 hrs., fue analizada en el grupo 2. La manipulación consistió en evitar que el animal se durmiera, para lo cual se utilizó la técnica llamada "gentle handling", en donde se tocaba al animal con la mano para evitar que se durmiera (ver figura 8).

El efecto del estrés inducido por inmovilización fue estudiado en el grupo 3. Para inducir el estrés se colocó a la rata en un túnel de acrílico con un diámetro de 5.5 cm, el cual tenía múltiples orificios en las paredes para dejar entrar aire fresco y que el animal pudiera transpirar. El periodo que se mantuvo al animal en el túnel fue de 2 hrs.

La influencia de ingesta de alimento fue estudiada con el grupo 4. A estos animales se les impuso un régimen de alimentación. La dieta consistió en una mezcla de cubos de purina chow y leche condensada la cual se le ofreció al animal de 12:00 hrs. a 14:00 hrs. y de 16:00 hrs. a 18:00 hrs, durante dos semanas, con el fin de que el animal tuviese la sensación de hambre el día del experimento.

## GRUPOS EXPERIMENTALES

### 1) CONTROL (n=10)



### 2) ESTRÉS POR INMOVILIZACIÓN (n=6)



### 3) INGESTA DE COMIDA (n=6)



### 4) VIGILIA FORZADA (n=10)



### 5) VIGILIA FORZADA MAS ESTRÉS (n=10)



### 6) VIGILIA FORZADA MAS INGESTA DE COMIDA (n=10)



Figura 8. El esquema muestra los 6 diferentes tratamientos a los que fueron sometido los animales

Por otra parte, también se evaluó el efecto de la vigilia forzada por 4 hrs. en asociación con los estímulos de estrés e ingesta de alimento en los grupos 5 y 6 respectivamente.

Los seis grupos fueron mantenidos a una temperatura de 25°C, humedad y luz constante durante de un mes. El mantener a los animales en luz constante se hizo con el fin, de evitar que algún ritmo circadico interviniera sobre la expresión de la proteína Fos (Deprés-Brummer et al, 1995).

Los animales siempre tuvieron acceso libre a comida y agua, con excepción del los grupo 3 y 6.

Además, todos los animales fueron manipulados una semana antes de realizar el experimento. La manipulación consistió, en trasladar a los animales del bioterio a las cámaras de registro conductual (con temperatura constante, luz continua y acceso a comida y agua), en donde se llevarían a cabo los experimentos y se les dejó en este lugar durante 5 hrs. con el propósito de evitar reacciones de estrés inespecífico provocadas por la expectación de encontrarse en un nuevo sitio.

Una hora después de haber sido sometidos los animales al estímulo, estos fueron sacrificados con una sobre dosis de anestésico (3 ml pentobarbital). Esta manipulación no interfiere con la concentración de la proteína Fos que se cuantifico, ya que la muerte del animal se da a los 2 minutos de que el animal es inyectado y la traducción de la proteína se da aproximadamente de una a dos horas después de que es aplicado el estímulo (Marota et al, 1992). Los animales fueron entonces inmediatamente perfundidos intracardicamente con 100 ml de buffer fosfato 0.01M mas NaCl 0.9 % (PBS) pH 7.4 a través de la aorta ascendente, seguido de este, se administró 200 ml de paraformaldehido al 4% en PBS pH 7.4 (fijador). Los cerebros fueron disectados y puestos en fijador por 2 hrs. más.

Posteriormente se cambió el fijador por una solución de sacarosa al 20% y fueron mantenidos en ésta solución por una noche. Al día siguiente todo el cerebro fue seccionado en un criostato a  $-20^{\circ}\text{C}$ , obteniendo cortes corónales de un espesor de  $30\mu$ . Después las secciones fueron procesadas con la técnica de avidina-biotina peroxidasa (Elite-ABC; kit Vector Labs), contra la proteína Fos, en donde las secciones fueron lavadas 2 veces con PBS pH 7.4 + 0.1% de peróxido de hidrógeno + suero fetal de cabra, para inhibir las peroxidases endógenas y el pegado inespecífico del anticuerpo primario respectivamente. Después fueron lavadas las secciones 2 veces con PBS e incubadas con el anticuerpo primario en PBS pH 7.4 + Albúmina de bovino 0.1% + .3% de Tritón X-100 y el anticuerpo primario c-fos (4) (Santa cruz Biotechnology) en una concentración 1:2000 durante 72 hrs. Seguido de este procedimiento, las secciones fueron lavadas 2 veces por 10 minutos en PBS pH 7.4 y después el tejido fue incubado con el anticuerpo secundario IgG biotinilado contra conejo, lavado 2 veces por 10 minutos e incubado ahora con el complejo avidin-biotina por 2 hrs. en una dilución 1:200. Por último, las secciones fueron lavadas 2 veces con PBS pH 7.4 e incubadas por 3 minutos con diaminobencidina tetrahidrocloradada + 2% de peróxido de hidrógeno por 3 minutos. Las secciones fueron montadas sobre porta objetos gelatinizados previamente, dejados secar durante toda una noche, deshidratados en alcoholes graduales y cubiertos para su posterior análisis.

El anticuerpo c-fos(4) de santa cruz biotechnology fue utilizado para la inmunohistoquímica. El c-fos(4) es un anticuerpo policlonal de conejo contra la secuencia de amino ácidos del 3 al 16 de la parte amino terminal de la proteína p62 c-fos de humano (la cual es idéntica a la de rata). Este anticuerpo no cruza inmunológicamente con proteínas homologas a c-fos como lo son Fos-B, Fra-1 o Fra-2 (hoja técnica santa cruz biotechnology 1995). Para determinar la especificidad de la inmunoreactividad, algunas de

las secciones fueron incubadas con el anticuerpo contra Fos preabsorbido con la proteína Fos (Cambridg Biotechnology). La preabsorción del anticuerpo elimina la inmunorreactividad a Fos. Además, también fueron incubadas secciones en ausencia del anticuerpo contra Fos, para ser incluidas como control negativo.

Los núcleos celulares positivos a Fos fueron contados con la ayuda de un sistema digitalizador de imágenes. Brevemente el sistema de digitalización consistió en un microscopio (Olympus BHS) el cual contaba una cámara CCD, que a su vez estaba conectada a una computadora equipada con una tarjeta digitalizadora marca Matrox. Una vez digitalizada la imagen, la región cerebral a cuantificar fue delimitada dibujando su contorno (plantilla) sobre la imagen digitalizada. Posteriormente, al procesador de imágenes se le proporcionaron los criterios de exclusión para la cuantificación del número de núcleos inmunoreactivos (intensidad mínima, máxima y dimensión de los núcleos celulares). El área cuantificada para cada región cerebral siempre fue la misma para todos los grupos experimentales, ya que se utilizó la misma plantilla. Los planos en los cuales fueron cuantificadas las diferentes estructuras se pueden observar en la figura 9 (1, -0.26, -1.3, - 1.8, -5.86, -7.6, -9.8, -9.8, y -13.68. con respecto a bregma según Paxinos 1986)

Los datos se analizaron por medio la prueba estadística de ANOVA de una vía, seguida de una prueba de Tukey con  $p < 0.005$ .

Las fotomicrografías fueron tomadas en un microscopio Olympus BHS con la técnica óptica de Nomamski.

## **Resultados**

### **Características de la inmunoreactividad a Fos**

La inmunoreactividad a Fos fue observada con mayor intensidad en el núcleo celular (ver figura 10 y 11 e). La intensidad también tuvo variaciones en los núcleos marcados entre los diferentes cortes de cada individuo. Así como también, entre núcleos de células vecinas. Sin embargo, se puede observar claramente la diferencia entre una célula inmunoreactiva y otra que no lo es.

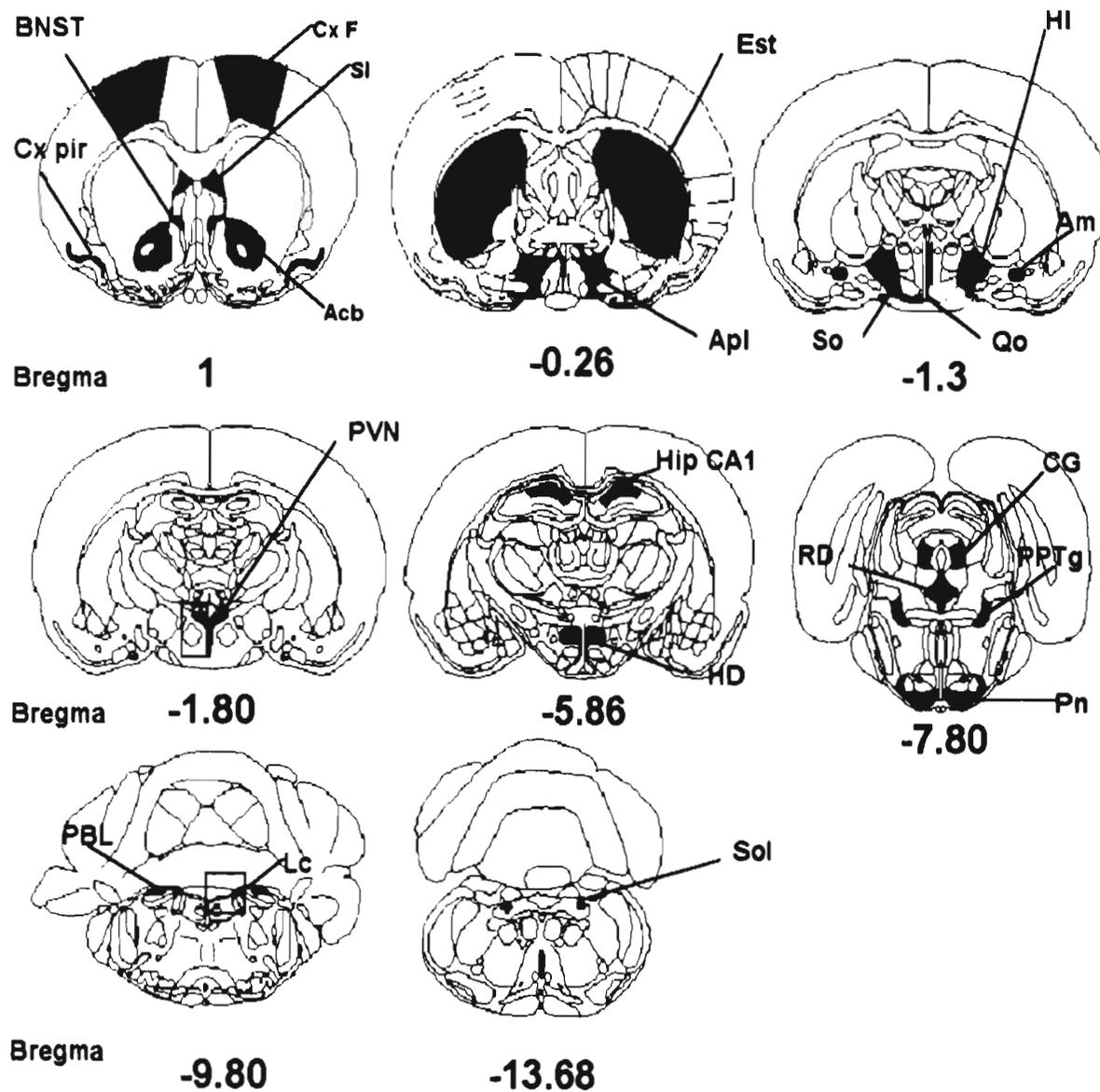
### **Distribución de la Inmunoreactividad a Fos**

El conteo de células fue hecho en 21 estructuras cerebrales. El nivel coronal en donde fue muestreada la inmunoreactividad se puede observar en los esquemas de los cortes corónales de la figura 9. Los datos de la tabla 3, muestran la comparación de las medias del número de neuronas inmunoreactivas a Fos en cada estructura entre el grupo control y los diferentes grupos experimentales. La media ( $\pm$  la desviación estándar) del total de células positivas a Fos de los animales controles *versus* los grupos experimentales, presentaron diferencias estadísticamente significativas (ver tabla 2). Esto implica que las diferencias que se encontraron entre estructuras no se deben a un efecto azaroso.

**Tabla 2.** En esta se muestra la media( $\pm$  DE) del número de células totales cuantificadas para cada grupo experimental

<b>Grupo</b>	<b>Media (<math>\pm</math> DE)</b>
<b>Control</b>	204.8 $\pm$ 5.1
<b>E</b>	413 $\pm$ 9.2*
<b>C</b>	296 $\pm$ 8.4*
<b>VF</b>	299.5 $\pm$ 4.8*
<b>VFE</b>	400.7 $\pm$ 5.2*
<b>VFC</b>	309.4 $\pm$ 4.04*

p<0.001 según la prueba de Tukey.



**Figura 9.** Cortes coronales de cerebro de rata que muestran las estructuras cuantificadas en el presente estudio. Los rectángulos indican las áreas de donde fueron tomadas las micrografías de las figuras 9 y 10. Las coordenadas estereotaxicas corresponden al atlas de Paxinos (1986). Abreviaciones: BNST, núcleo de la cama de las terminales estriatales; Cx F, corteza frontal; SI, septum lateral; Acb, núcleo accumbens; Cx pir, corteza piriforme; Est, estriado; Apl, área preóptica lateral; HI, hipotálamo lateral; So, núcleo supraóptico; Qo, Quiasma óptico; Am, Núcleo central de la amígdala; PVN, núcleo paraventricular; Hip CA1, Hipocampo área CA1; HD, Núcleo Dorsomedial talámico; CG, Núcleo central gris; PPTg, Núcleo del pedunculo pontino tegmental; RD, Rafe dorsal; LPB, Núcleo parabraquial lateral; Pn, Núcleo pontino; Lc, locus coeruleus; Sol, núcleo del tracto solitario.

Estructura	Control (n=10)	VF (n=10)	VFE (n=10)	VFC (n=10)	E (n=6)	C (n=6)
<i>Telencéfalo</i>						
Corteza piriforme	3.1 ± 1.2	<b>30.1 ± 3.3*</b>	<b>40.4 ± 3.6*</b>	<b>28.7 ± 4*</b>	<b>38.4 ± 5.7*</b>	2.7 ± 3.8
Corteza frontal	30 ± 2	30.6 ± 2.8	31.6 ± 3.2	33.3 ± 3.8	27.6 ± 3.8	36.3 ± 5.8
Septum lateral	24.7 ± 1.6	<b>45.3 ± 2.4*</b>	<b>54.2 ± 2.8*</b>	23.5 ± 2.4	<b>51.2 ± 6.3*</b>	20.5 ± 3.9
Núcleo basal de las terminales estriales	23.4 ± 1.7	<b>36.1 ± 2.6*</b>	<b>43.5 ± 2.5*</b>	23.7 ± 2.9	<b>49.5 ± 6.8*</b>	20.7 ± 1.7
Estriado	18.5 ± 1.6	20.1 ± 3.2	17.6 ± 3.6	19.3 ± 2.9	18.7 ± 1.2	21.3 ± 4.5
Núcleo central de la amígdala	21.2 ± 2.6	20 ± 0.9	<b>35.7 ± 3.4*</b>	20.1 ± 2.6	<b>38 ± 4.4*</b>	17.8 ± 3.6
Núcleo Accumbens	3.7 ± 1.3	4.5 ± 1.7	<b>7.6 ± 1.3*</b>	<b>8.2 ± 1.8*</b>	<b>7.8 ± 2.3*</b>	<b>9.0 ± 3.8*</b>
<i>Diencefalo</i>						
Núcleo talámico paraventricular	7 ± 1.3	<b>23 ± 4.1*</b>	<b>43.4 ± 4*</b>	<b>24.2 ± 1.9*</b>	<b>40.4 ± 5*</b>	<b>28.2 ± 3.9*</b>
Area preoptica lateral	12.5 ± 1.3	13.3 ± 2.6	<b>25.5 ± 2*</b>	10.6 ± 2.3	<b>23.5 ± 3.9*</b>	8.6 ± 3.3
Núcleo supraquiasmático	11.8 ± 1.6	10.5 ± 2.9	12.2 ± 1.2	8.2 ± 4.1	9 ± 1.4	12.5 ± 3.1
Núcleo supraóptico	10.2 ± 1.1	9.8 ± 3.1	<b>22.3 ± 2.1*</b>	11.4 ± 1.2	<b>20.3 ± 4.5.1*</b>	9.4 ± 3.2
Núcleo talámico dorsomedial	9.8 ± 1.7	<b>15.4 ± 1.4*</b>	<b>13.5 ± 1.5*</b>	<b>25.7 ± 4.7*</b>	<b>15.5 ± 2.5*</b>	<b>29.7 ± 2.8*</b>
Núcleo hipotalámico lateral	5.2 ± 2.9	<b>11 ± 1.3*</b>	<b>12.7 ± 2.5*</b>	<b>12.1 ± 2.7*</b>	<b>14.7 ± 3.6*</b>	<b>15.1 ± 3.7*</b>
Hipocampo área CA1	3.2 ± 1.6	4.5 ± 3.1	3.1 ± 1.4	5.1 ± 3.3	3.1 ± 1.4	2.8 ± 2.2
<i>Puente y médula</i>						
Area gris central	2.1 ± 0.7	<b>15.4 ± 1.6*</b>	<b>11.8 ± 3.2*</b>	<b>12.2 ± 2.4*</b>	4.8 ± 2.2	<b>11.2 ± 3.9*</b>
Núcleo del pedunculo pontino tegmental	5.2 ± 1.7	7.1 ± 1.7	<b>9.5 ± 2.3*</b>	5.6 ± 1.4	<b>11.6 ± 3.3*</b>	6.6 ± 2.6
Núcleo parabraquial lateral	1.3 ± 0.7	<b>4.2 ± 0.9*</b>	<b>4.6 ± 2*</b>	<b>7.5 ± 2.2*</b>	<b>5.1 ± 2.6*</b>	<b>5.5 ± 3.4*</b>
Locus coeruleus	2.3 ± 1.3	3.1 ± 1.1	<b>11.1 ± 3.8*</b>	<b>10.5 ± 0.9*</b>	<b>13.1 ± 2.8*</b>	<b>9.4 ± 0.4*</b>
Rafé dorsal	7.6 ± 1	4.6 ± 2.7	4.5 ± 2.9	3.3 ± 2.5	2.5 ± 3.7	3.8 ± 4.5
Núcleo pontino	5 ± 1.5	3.5 ± 2.3	<b>17.4 ± 3.6*</b>	<b>15.7 ± 1.9*</b>	<b>19.4 ± 4.6*</b>	<b>18.7 ± 0.9*</b>
Núcleo del tracto solitario	11.5 ± 3	13 ± 1.2	10.3 ± 2.4	<b>18.8 ± 4.3*</b>	7.3 ± 2.4	<b>20 ± 3.1*</b>

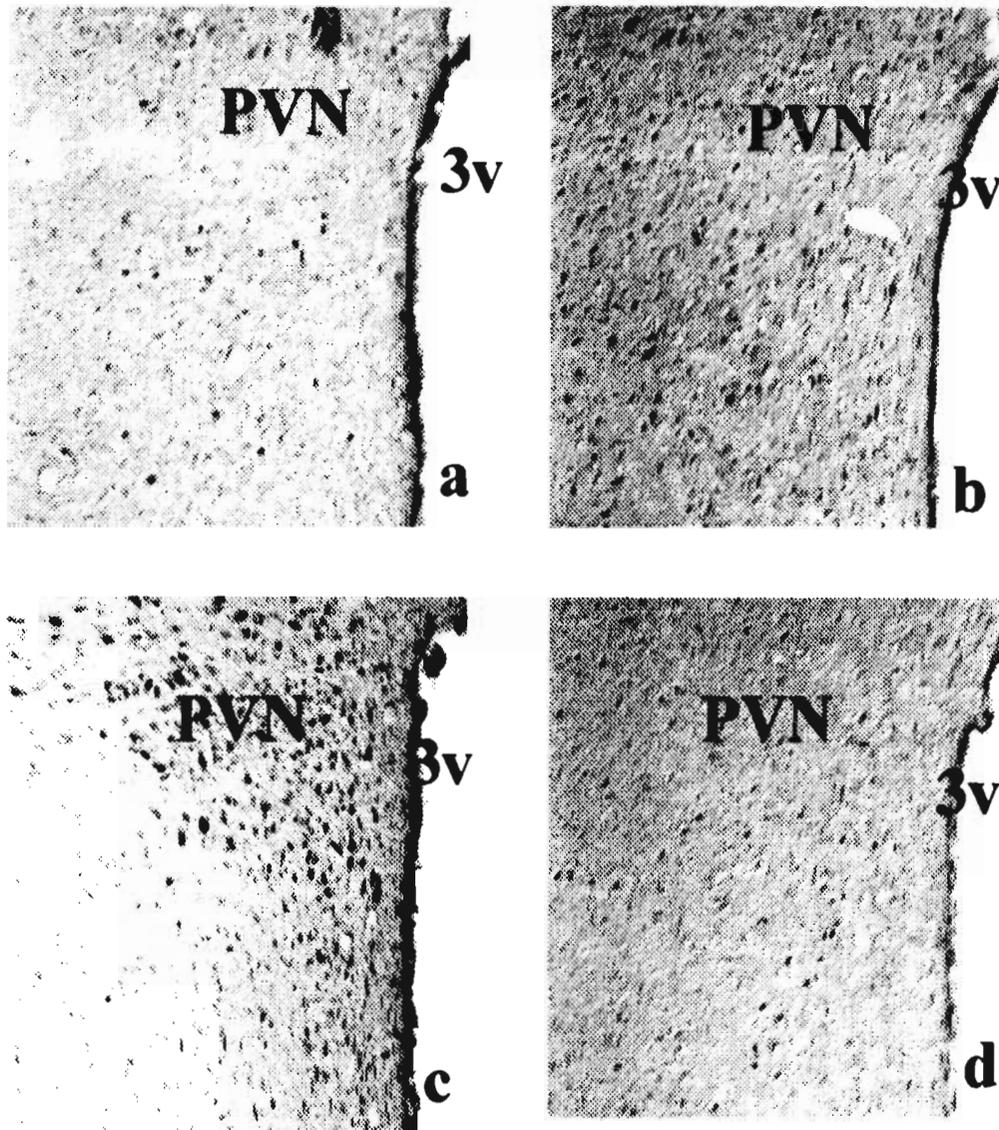
Tabla 3. Media del número de células inmunorreactivas a Fos ( $\pm$ DE) en estructuras del telencéfalo, diencefalo, puente y médula, de las diferentes actividades (VF), Vigilia forzada más estrés (VFE), vigilia forzada más ingesta de comida (VFC), estrés (E) y comida (C), sobre la expresión de la proteína Fos. Los datos son significativamente diferentes al control en \* $p < 0.01$  según la prueba de Tukey.

En el grupo de ratas sometidas a vigilia forzada se observó un aumento en el número de células inmunoreactivas a Fos con respecto al grupo control (ver figuras 10,11 b y a), este último mostró una expresión basal de Fos en todos los niveles muestreados (ver tabla 3). El grupo de ratas sometidas a estrés, así como el sometido a vigilia forzada y estrés, mostraron un aumento en el número de células inmunoreactivas en la Cx pir, SL, BTS y PVN con respecto al grupo de vigilia forzada (ver ejemplo figura 10,11 b y c).

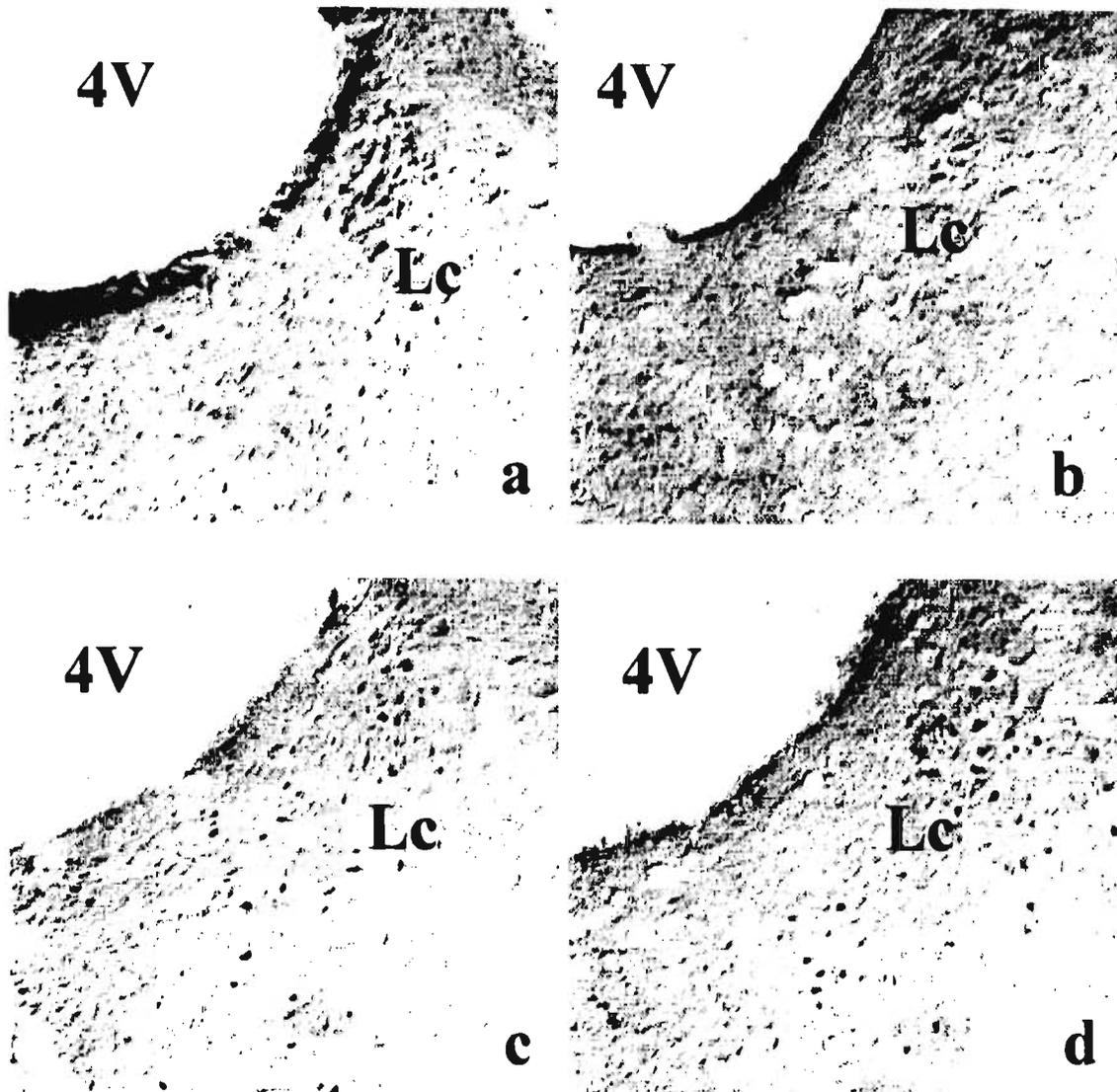
Adicionalmente estos grupos presentaron inmunoreactividad en otros núcleos como: Am, LPO, SO, PPTg, Pn y LC. Es interesante observar que en el grupo de ratas estresadas, el núcleo DM no muestra diferencias significativas con respecto al grupo control. En contraste el grupo de vigilia forzada y estrés sí muestra diferencias significativas con respecto al grupo control.

Por lo que respecto a los grupos de ingesta de alimento y vigilia forzada más ingesta de alimento, no se observaron diferencias significativas entre ellos, ni en el patrón de distribución, ni en el número de células inmunoreactivas a Fos (ver tabla 3). Estos grupos mostraron un aumento significativo en el número de células inmunoreactivas en el núcleo DM con respecto al grupo de la vigilia forzada. Adicionalmente, se observan otros núcleos inmunoreactivos como el Pn, LC y Sol (ver ejemplo figura 11b y d).

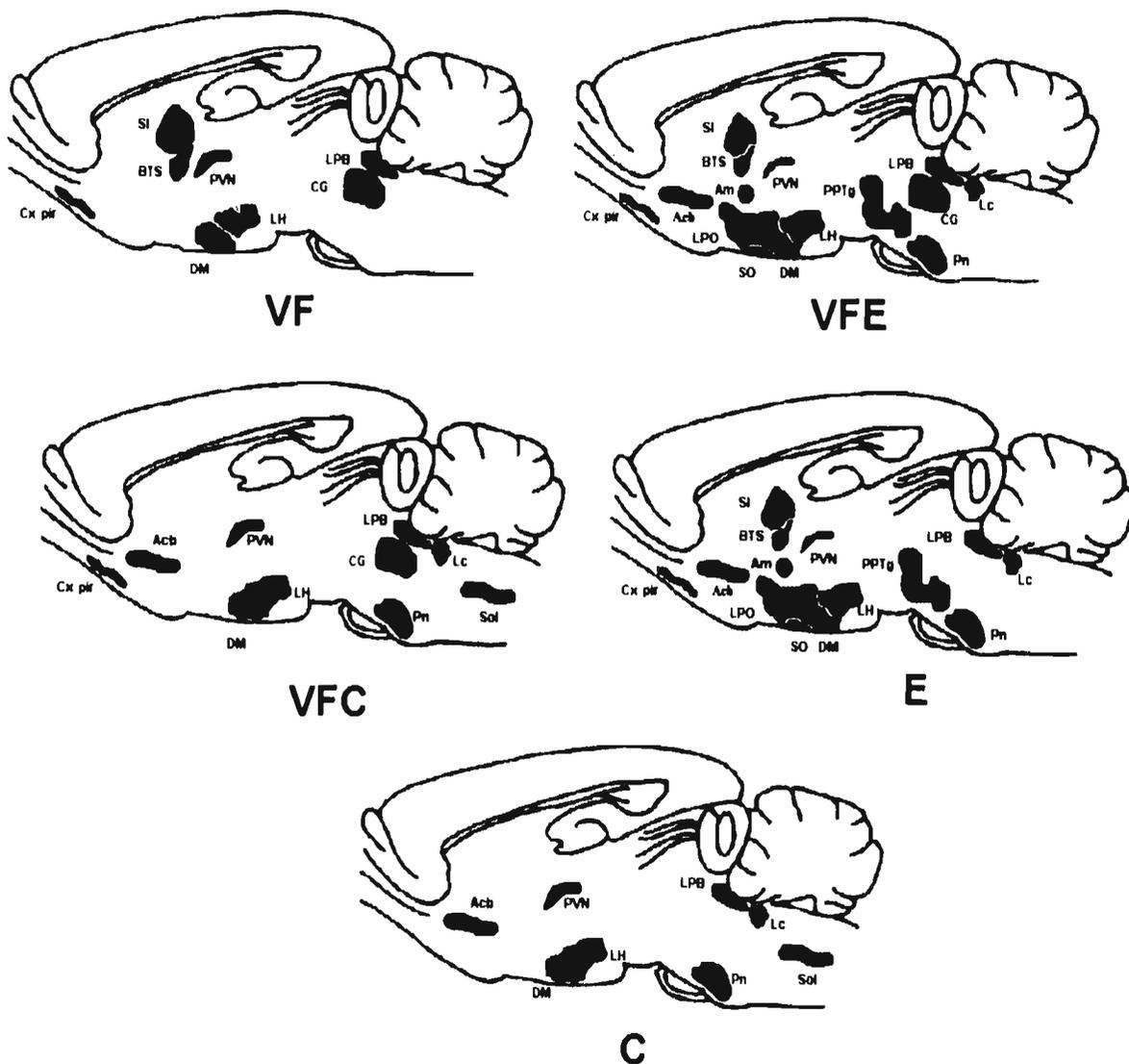
Un resumen gráfico de la distribución de la expresión de Fos de los grupos experimentales se muestra en la figura 12.



**Figura 11.** La cuantificación de los núcleos inmunorreactivos a Fos fu determinada 120 min. después de cada actividad en el núcleo paraventricula (PVN). a) Control b) Vigilia forzada c) Vigilia forzada más estrés d) Vigilia forzada más ingesta de comida. La foto fue tomada a un aumento de 20x. (3v se refiere a tercer ventrículo).



**Figura 10.** En las fotografías se muestran las secciones coronales del Locus coeruleus (LC), en donde se observa la distribución de los núcleos inmunorreactivos a la proteína Fos después de realizadas las siguientes actividades: a) Control b) Vigilia forzada c) Vigilia forzada más estrés d) Vigilia forzada más ingesta de comida. La foto fue tomada a un aumento de 10x (4v se refiere al cuarto ventrículo).



**Figura 12.** Los esquemas representan un corte parasagital del cerebro de la rata que ilustra las diferencias en el patrón de la distribución de la inmunorreactividad a Fos entre E, estrés; C, Ingesta de comida; VF, vigilia forzada; VFE, vigilia forzada más estrés y VFC, vigilia forzada más ingesta de comida. El color negro se refiere a los núcleos que tuvieron un incremento moderado en el número de células inmunorreactivas a Fos en comparación con el grupo control. El color gris señala los núcleos que tuvieron mayor incremento de células inmunorreactivas con respecto al grupo control. Es importante aclarar que este esquema resume los datos de la tabla 3 y sólo es una representación gráfica que sirve para visualizar los datos obtenidos. La cuantificación de la inmunorreactividad se hizo en cortes coronales.

## ***Discusión***

La familia de proteínas c-fos juegan un papel importante en la regulación transináptica de la expresión génica en neuronas estimuladas fisiológicamente (Curran y Morgan, 1994, Greenberg et al, 1986, Hunt et al, 1987). La inducción neuroquímica de genes como c-fos y de otros productos de genes de expresión temprana, son los mecanismos celulares por los cuales se regula el metabolismo neuronal (Dragunow y Faull, 1989).

La inmunohistoquímica contra la proteína Fos ha sido reportada como una poderosa herramienta para detectar poblaciones de neuronas con actividad metabólica elevada (Dragunow y Faull, 1989). Además, la resolución celular con la que cuenta esta técnica y la baja reacción inespecífica, permite una cuantificación adecuada de los datos (Curran y Morgan, 1994).

Sin embargo, los resultados obtenidos por esta técnica deben ser analizados cuidadosamente, ya que puede darse el caso de que las neuronas activadas no hayan sido marcadas por el anticuerpo (Dragunow y Faull, 1989). La inmunohistoquímica a Fos puede incluir neuronas Fos (+), que no estén relacionadas con el fenómeno estudiado.

En el diseño experimental del presente estudio, se tomaron en cuenta todas las posibles variables que pudieran inducir actividad neuronal no relacionada con los estímulos aplicados. Por ejemplo, los animales de los distintos grupos experimentales, se mantuvieron por un periodo de un mes en luz continua, con el objeto de que el ciclo circádico de los animales no influyera sobre la activación de la proteína Fos (Deprés-Brummer et al, 1995). Además, los animales fueron habituados y manipulados una semana antes de aplicar el protocolo de experimentación, con el objetivo de evitar un estrés adicional a los grupos experimentales. Por otra parte, el tiempo que se tomó entre la aplicación del estímulo y la fijación del tejido, fue

seleccionado con base en el tiempo en que se da la máxima expresión de la proteína Fos, reportada en previos experimentos tanto *in vitro* como *in vivo* (Muller et al, 1984; Earnest et al, 1990; Sagar y Sharp, 1990; Sudol et al, 1993).

La distribución de la inmunoreactividad en los animales control es semejante y comparable a la descrita por otros autores (Sagar et al, 1988). En la actualidad no se encuentra disponible en la literatura un mapa completo de la expresión de la proteína Fos en el cerebro, en ninguna de las condiciones experimentales que se manejaron en el presente trabajo.

Por otra parte la inmunoreactividad a Fos observada en los grupos experimentales mostró una distribución discreta, la cual es consistente con la interpretación que se le da a continuación.

### **Expresión de c-fos y vigilia forzada**

El presente estudio demuestra que después de 4 hrs. de vigilia forzada se induce un incremento significativo de la inmunoreactividad a Fos, en algunas áreas del cerebro que están implicadas en la regulación del ciclo sueño-vigilia.

Los cambios más significativos fueron observados en Cx pir., DM, LH, CG, LPB, PVN, BNST y SL. El incremento en el número de células inmunoreactivas a Fos en el DM podría deberse a que en esta región se localizan neuronas que mantienen una actividad eléctrica elevada durante el período de vigilia, lo cual concuerda con el hecho de que el animal se encontraba despierto (Lin et al, 1989). De los núcleos BNST y SL, no se conoce cual es papel que desempeñan en la regulación de los mecanismos de sueño; sin embargo, se ha sugerido su participación en la generación del ritmo theta, una frecuencia eléctrica que es detectada en el electroencefalograma durante la fase de sueño (Monmaur y Breton, 1991).

Por otra parte, en regiones tales como Lc y RD, las cuales se ven involucradas en la inducción y regulación del sueño, no se observaron diferencias significativas en el número de neuronas inmunoreactivas a Fos. Tononi colaboradores (1994), demostraron que después de un período de vigilia espontánea o de privación de sueño, en presencia de luz constante, existe un incremento en el número de células inmunoreactivas a c-fos, en comparación con animales que se encuentran en periodo de sueño. Nuestros datos confirman que existe inmunoreactividad a Fos en el Lc de los animales sometidos a un periodo de vigilia forzada, sin embargo el número de células inmunoreactivas a Fos es muy bajo y no es comparable con los encontrados por Tononi y colaboradores. Esta diferencia puede deberse a que el método de privación de sueño utilizado en el presente estudio, indujo menos estrés al animal en comparación al utilizado por Tononi y colaboradores.

### **Expresión de c-fos y estrés**

El cerebro de los animales a los cuales se indujo estrés por inmovilización, presentaron una intensa inmunoreactividad a Fos en regiones discretas del cerebro anterior y tallo cerebral.

Las regiones que mostraron un aumento significativo en el número de células inmunoreactivas a Fos fueron: Cx pir, SI, BNST, Am, Acb, PVN, LH, APL, DM, SO, CG, Pn y PPTg. Estudios previos muestran que algunas de estas regiones se encuentran relacionadas anatómicamente. Por ejemplo, la Am y BNST reciben inervación directa de PBL (Jackson y Crossma, 1981). El BNST emite axones hacia el Acb (Swanson et al, 1983). El SI por su parte, recibe inervación del LH, PVN y Lc (Staiger y Nomberg, 1989) y sus eferentes proyectan al APL, PVN, CG, y So (Swanson y Cowan, 1979, 1983). Todas estas áreas mostraron un incremento en el número de células

inmunoreactivas a Fos con respecto al grupo control. Estos resultados muestran que la relación anatómico funcional, también es reflejada en el cambio de la expresión de la proteína Fos, después de un periodo de estrés por inmovilización.

El significado funcional del incremento en la expresión de Fos en estas áreas, podría estar correlacionado con el hecho de que esta proteína funciona como factor transcripcional de otros genes que codifican para otras enzimas y receptores (Currant, 1988; Fritschy et al, 1991). En relación a esto, estudios recientes muestran que núcleos como Pn y Acb presentan un aumento en el número de receptores muscarínicos del tipo 3 en animales privados de sueño por 72 hrs. (Callawar y Hemksen, 1992). En otros núcleos como el CG, PVN y Lc también se observan cambios la cantidad de receptores a VIP, cuando los animales son privados de sueño por 24 y 72 hrs (Jiménez et al, 1996). Es probable que estos cambios en la densidad de receptores, estén provocados por el estrés que es inducido durante la privación de sueño, el cual a su vez es responsable de la expresión de c-fos u otros genes de expresión temprana, que se encuentran regulando la transcripción de los genes que codifican para estos receptores.

La hipótesis de que el aumento en la cantidad de sueño que se da después de un periodo de privación, se deba al estrés inducido por el método de privación, se ve apoyada por el estudio hecho por Rampin y colaboradores (1991). Ellos demostraron que después de la inducción de estrés por inmovilización en animales no privados de sueño, se presenta un periodo de sueño post-estrés. Los autores de este trabajo sugieren que los péptidos derivados del POMC, que son liberados durante el estrés, podrían ser los responsables de la generación del sueño que le sucede (Chastrett et al, 1985,1990). González y colaboradores (1994) por su parte, demostraron que los animales tratados con DSP-4 (neurotoxina que provoca la muerte de

células noradrenérgicas del Lc) y estresados por 2 hrs con el método de inmovilización, no presentan el periodo de sueño que le sucede al estrés. Esto sugiere que el Lc es el responsable de inducir el sueño post-estrés. Sin embargo, en el presente estudio, se demostró que no solo existen cambios metabólicos en el Lc de los animales estresados con este método, sino también en otras áreas del puente como el Pn y el PPTg. En estudios previos se ha demostrado que la estimulación eléctrica del PPTg, aumenta la liberación de acetilcolina en el FTG, así como también la actividad eléctrica de estas neuronas durante el sueño MOR. Por otra parte, la lesión del PPTg con ácido kainico produce una disminución de la cantidad de sueño MOR, el cual es proporcional al número de células colinérgicas destruidas (Webster y Jones, 1988). Es probable que el incremento de la concentración de la proteína Fos en regiones como el PPTg y Lc, sea el responsable de la generación de sueño que le sucede al periodo de estrés.

El incremento del número de células inmunoreactivas a Fos en el Lc, podría estar influyendo la expresión del gene que codifica para la tirosina hidroxilasa, enzima reguladora de la síntesis de noradrenalina, el cual cuenta con un sitio de unión AP-1 en el extremo 5' (Fritschy et al, 1991). Esto explica la presencia de Fos en las células noradrenérgicas del Lc. Sin embargo, no se debe descartar la participación de otras regiones cerebrales. Por ejemplo, es probable que la secreción de péptidos como el CRF, la ACTH endorfinas, epinefrina y noradrenalina que controlan la frecuencia cardiaca, respiratoria y la temperatura corporal durante el estrés; también pudieran estar involucrada en la inducción del sueño que le sucede al periodo de estrés. En el presente estudio se demostró que regiones como el PVN muestran un incremento en el número de células inmunoreactivas a Fos. En estudios previos se ha demostrado que en este núcleo se encuentran neuronas capaces de sintetizar CRF (Swanson et al, 1983). La

administración intracerebroventricular del CRF incrementa el porcentaje de sueño de ondas lentas II (Opp et al 1989). Este incremento en el sueño de ondas lentas, es similar al encontrado en animales a los cuales solo se les ha estresado (Garcia, 1987). Estas evidencias apoyan la idea de que el CRF sea el responsable de la liberación de otros péptidos con capacidad de inducir sueño, como el péptido del lóbulo intermedio semejante a la corticotropina CLIP (Chastrette y Cespuglio, 1985) y CCK (Mansbach y Lorenz, 1993).

#### **Ingesta de alimento y expresión de c-fos**

En los grupos de ingesta de alimento, los datos indican que después de una intensa conducta de ingesta, entre los eventos postprandiales se incluye un aumento en la inmunoreactividad a Fos. Entre los grupos neuronales que muestran un aumento en la inmunoreactividad, encontramos regiones previamente reportadas como responsables del procesamiento central de la conducta de ingesta de alimento, cuando esta se presenta espontáneamente.

El incremento en la expresión de Fos fue observada en tres grandes áreas del sistema nervioso central, previamente implicadas en la función del control gástrico, ingesta de alimento y la secreción neuroendocrina: el tallo cerebral, el sistema límbico y el hipotálamo respectivamente. La expresión de Fos asociada a la ingesta de alimento fue mostrada en el Acb, DM, LH, Sol, LC y PBL. El incremento en el número de células inmunoreactivas a Fos concuerda con el hecho estas regiones forman parte del sistema gustatorio y se encuentran relacionadas anatómicamente (Halsell, 1992). Los datos obtenidos en el presente estudio, concuerdan con los encontrados por Olson y colaboradores (1993), quienes al administrar inhibidores de la ingesta de alimento y la motilidad gástrica, observaron un incremento en el número de

células inmunoreactivas a fos en el PBL, Lc y Sol, con respecto a el grupo control. En regiones como el Sol, se localizan neuronas sintetizadoras de CCK y Somatostatina las cuales proyectan hacia el PBL, mientras que en esta última región se han detectado neuronas sintetizadoras de substancia P y CCK (Herbert y Saper, 1990). El PBL por su parte, proyecta axones CCK inmunoreactivos hacia el PVN (Moga y Saper, 1994). Esta inervación explica por que el PVN presenta un mayor número de células inmunoreactivas a Fos con respecto al grupo control. En el PVN también se han identificado grupos de neuronas inmunoreactivas a CRF que proyectan hacia el Lc (Valentino, 1992), lo cual explicaría el aumento de inmunoreactividad en el Lc. Además, se ha demostrado que algunas neuronas sintetizadoras de ACTH y OT que se encuentran localizadas en el PVN, están relacionadas con el proceso de saciedad. (Sander y Porter, 1988). El PVN también dirige sus axones hacia la eminencia media y otras estructuras del cerebro anterior basal, en particular el área preóptica ventro lateral, juega un papel importante en el control y mantenimiento del sueño (Sherin et al, 1996).

La mayoría de los estudios sobre la ingesta de alimento han tenido como objetivo principal, la identificación de los neuropéptidos que regulan los procesos de saciedad. Sin embargo, se ha observado que algunos de estos péptidos como el VIP, CCK y la somatostatina, también pueden inducir sueño. (Drucker, et al 1984; Mansbach y Lorenz, 1983; Obal, 1986; Danguir, 1984, 1986). En el presente estudio se demostró como algunas regiones cerebrales, que en previos reportes se han identificado como sintetizadoras de estos péptidos, presentan un incremento en la inmunoreactividad a Fos después de una ingesta de alimento. Esto apoya la idea de que estas regiones sintetizadoras de los FIS, podrían estar promoviendo la generación del sueño post-prandial.

En resumen, nuestros datos demuestran que estímulos como la vigilia forzada, el estrés por inmovilización ó conductas como la ingesta de alimento, que se realizan durante el período de vigilia, tienen un impacto en el patrón de expresión de la proteína Fos. Esto indica de manera indirecta, cual es el estado metabólico en el que se encuentra el cerebro previo a entrar a un período de sueño. Los presentes resultados sugieren que los que los diferentes patrones de expresión de la proteína Fos, están relacionados con regiones cerebrales, que en previos estudios se han identificado como sintetizadoras y liberadoras de FIS. Es posible que la activación metabólica que se presenta en estas regiones cerebrales, sea importante para la inducción del sueño que está asociada a las conductas que aquí fueron estudiadas. En otra serie de experimentos que se llevaron a cabo en nuestro laboratorio con el mismo paradigma, se demostró que las mismas conductas estudiadas en la presente tesis, provocan un cambio sobre la arquitectura y la densidad espectral del EEG, registrado durante el período de sueño que le sucede a los estímulos de vigilia forzada, estrés o la conducta de ingesta de alimento (Garcia, 1997). Es posible que los patrones de expresión de Fos que muestra el cerebro después de cada experiencia, repercutan sobre la arquitectura del sueño que le sucede.

Por otra parte, no hay que descartar que algunas regiones cerebrales que no mostraron inmunoreactividad a Fos y que sintetizan FIS, también puedan estar participando en el periodo post-prandial y post-estrés. Esto es posible ya que el c-fos, no es el único gene de expresión temprana que puede estar siendo transcrito por las neuronas metabólicamente activas. Este hecho nos hace sugerir que algunas neuronas activas que no transcriben Fos, pero si otro u otros genes de expresión temprana, pudieran estar participando en estas conductas.

## **CONCLUSIONES**

**La cantidad de células inmunoreactivas a c-fos es diferente para cada actividad realizada durante la vigilia. Los grupos que presentaron un mayor número de células inmunoreactivas a la proteína Fos fueron los de estrés inducido por inmovilización.**

**Los patrones de expresión de la inmunoreactividad a Fos en el cerebro difieren entre grupos, lo cual depende de la actividad realizada durante la vigilia. Nuevamente los grupos con mayor número de estructuras en los que se observó inmunoreactividad a Fos, fueron los estresados por el método de inmovilización.**

**Algunas de las estructuras que mostraron inmunoreactividad a c-fos, se ha demostrado previamente que participan en los procesos de regulación y generación de sueño. Esto sugiere que las redes neuronales que se activan durante y/o después de un estrés intenso ó una ingesta de alimento abundante, a su vez activan núcleos neuronales relacionados con la regulación y generación de sueño.**

## ***Bibliografía***

Agnati, L.F. Fuxe, H., Yu Z.Y., Harfstry, A., Okret, S., Wiskstrom, A.C., Zoli, M., Vale, W.W. y Goldstein, M. (1985) **Intravenous uridine treatment antagonizes hypoglycemia-induced reduction in brain somatostatin-like immunoreactivity.** *Neurosci Lett.* 54:148-152

Alexrod, J. y Reisine, T.D. (1984) **Stress hormones: their interaction and regulation** *Science.* 224:452-459

Anand, B.K. y Brobeck, J.R. (1951) **Localization of a "Feeding center" in the hypothalamus of the rat.** *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 77:323-324.

Arlond, F.J.L. Lucas-Bueno, D., Shiers, H. Hancock, G., Evant, G.I. y Herbert, J. (1992). **Expression of c-fos in regions of the basal limbic forebrain following intracerebroventricular corticotropin-releasing factor in unstressed or male rats.** *Neurosci.* 51:1. 377-390.

Borbély, A., y Tobler, Y., (1980) **The search for an endogenous sleep substance.** *TIPS.* 1: 356-358.

Callaway, C.W y Henriksen S.J (1992) **Neuronal firing in the nucleus accumbens is associated with the level of cortical arousal.** *Neuroscience* 1992 51: (3) p547-53

Chastrette, N., y Cespuglio, R., (1985). **Influence of proopiomelanocortin-derived peptides on sleep-waking cycle of the rat.** *Neurosci. Lett.* 62:365-390.

Chastrette, N., Cespuglio, R., Lin, Y.L., y Jouvet, M. (1990). **Proopiomelanocortin (POMC)-derived peptides.** *Neuropeptides* 15. 61-74.

Chastrette, N. Pfaff, D.W. y Gibbs, R.B. (1991). **Effects of daytime y nighttime stress on fos-like immunoreactivity in the paraventricular nucleus of the hypothalamus, the habenula and the posterior paraventricular nucleus of the thalamus.** *Brain Res.* 563:339-344.

Chen, X. y Hebert, J. (1995) **Regional changes in c-fos expression in the basal forebrain and brainstem during adaptation to repeated stress: correlation with cardiovascular, hypothermic and endocrine responses.** *Neuroscience.* 64. 675-685.

Cravatt BF; Prospero-Garcia O; Siuzdak G; Gilula NB; Henriksen SJ; Boger DL; Lemer RA. 1995. **Chemical characterization of a family of brain lipids that induce sleep.** Science. 268 p1506-9.

Cunningham, E.T. Jr., Bohn, M.C. y Sawchenko, P.E. (1990) **The organization of adrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus.** J. Comp. Neurol. 292:651-667.

Curran, T. y Verman, I. (1984). **The FBR murine osteosarcoma virus.** Y. Molecular analysis and characterization of 75, 000 gag-fos fusion product. Virology 135:218-228.

Curran, T. y Morgan J.I. (1994) **Fos: An Immediate-early transcription factor in neurons.** J. Neurobiol. 26:403-412.

Curran, T. (1988) **The fos oncogen.** In Reddy E.P, Skalka AM. Curran T. (Eds): "The Oncogen Handbook" Amsterdam: Elsevier Science Publishers, pp 307-325.

Curtis, A.L., Drolet, G. y Valentino, R.J. (1993). **Hemodynamic stress activates locus coeruleus neurons of unanesthetized rats.** Brain Res. Bull. 31. 737-744.

Danguir, J, Nicolaidis, S; Gerard, H. (1979) **Relation between feeding and sleep patterns in the rat.** J. Comp. Physiol. 93:820-830.

Danguir, J. y Nicolaidis, S.(1984) **Intracerebroventricular infusion of somatostatin selectively increase causes selective increase of slow wave sleep in rats.** Brain Res.306:97-103.

Danguir, J., (1986) **Intracerebroventricular infusion of somatostatin selectively increase paradoxical sleep in rats.** Brain res. 367: 26-30.

Deprés-Brummer, P. L'vi, F., Metzger, G., y Touito, Y. (1995) **Light-induced suppression of the rat circadian system.** Am. J Ohysiol., 269:R1111-R1116.

De Saint Hilaire-Kafi, Z; Deporter, H; Nicolaidis, S. (1989) **Does cholecystinin induced physiological satiety and sleep?** Brain Res. 488:304-310.

Denbow, D.M. Van Krey, H.P., Lacy, M.P.; Dietrick, T.J. (1983) **Feeding, drinking and body temperature of Leghorn chicks: effects of ICV injection of biogenic amines.** *Physiol. Behav.* 31:85-90.

Dragunow, M. Y Faull, R. (1989) **The use of c-fos metabolic marker in neuronal pathway tracing.** *J. Neurosci. Methods* 29(3):261-5

Drucker-Colin, R. R., Spanis, C.W., Hunyadi, J., Cassin, J.R. y McGaugh, J.L. (1975). **Growth hormone effects on sleep and wakefulness in rat.** *Neuroendocrinology.*, 18, 1-8.

Drucker-Colin R., Bernal Pedraza, J., Fernandez-Cancino, F., y Oksenberg, A., (1984) **Is vasoactive intestinal polypeptide (VIP) a sleep factor?** *Peptides.* 5:837-840.

Drucker-Colin R. (1995) **The function of sleep is to regulate brain excitability in order to satisfy the requirements imposed by waking.** *Behavioral Brain Res.* 69:117-124.

Earnest, D.J. Iadarola, M., Yen, H.H. y Olschowka J.A. (1990) **Photic regulation of c-fos expression in neural components governing the entrainment of circadian rhythms.** *Experimental Neurol.* 109: 353-361.

Ehert, G y Fischer, R. (1991) **Neuronal activity and tonotopy in the auditory system visualized by c-fos gene expression,** *Brain Res.*, 567:350-354.

El Mansari, M. Sakai, K., y Jouvet, M. (1989). **Unitary characteristics of presumptive cholinergic tegmental neurons during the sleep-waking cycle in freely moving cats.** *Exp. Brain Res.* 76: 519-529.

Fritschy, J.M. and Grazna, R. (1991). **Immunohistochemical analysis of the neurotoxic effects of the DSP-4 identifies two populations of noradrenergic axon terminals.** *Neuroscience.* 30. 181-197.

Garcia, G.F., **Impacto de las distintas experiencias en la vigilia sobre la densidad espectral del electroencefalograma y la arquitectura de sueño.** Tesis de Maestría, 1997. pp 110.

Gibbs, J. y Bourne, E.W., (1985) **Effect of bombesin on feeding behavior.** *Life Sci.* 37:147-153.

Greenberg, M.E. Ziff, E.B y Green, L.A. (1986) **Stimulation of neural acetylcholine receptors induced rapid gene transcription** Science. 234:80-83

Gonzalez, M.M. del C., Valatx, J.L., Kitahama, K., y Jouvet, M.(1994). **Role of the locus coeruleus on the mechanism of the sleep rebound.** J. Sleep Res., 3 (Suppl. 1) 92.

Gonzalez, M.M. del C., Deabilly, G. Valatx, L.L., Jouvet, M.( 1994). **Sleep increase after immobilization stress: role of noradrenergic locus coeruleus system in the rat.** Neurosci. Lett. 202. 5-8.

Halsel, V.C.B. (1992) **Organization of parabrachial nucleus efferent to thalamus and amygdala in rat.** J.Comp Neural. 317:57-78

Harbuz, M.S., Chalmers, J., Lorraine, D.S y Lightman, L.S. (1993) **Stress-induced activation of CRF and c-fos mRNAs in the paraventricular nucleus are not affected by serotonin depletion.** Brain Res. 609:167-173.

Hebert, H. y Saper C.B.(1990) **Cholecystinin, galanin and CRF immunoreactive projection from the nucleus of the solitary tract to the parabrachial nucleus in the rat.** J. Com Neurol. 29, 581-598.

Hetherington, A.W. y Ranson, S.W. (1942) **The spontaneous activity and food intake of the rats with hypothalamic lesion.** Am.J.Physiol. 136:609-617.

Hobson, A., McCarley, R., y Wyzinski, W. (1975) **Sleep cycle oscillation: Reciprocal discharge by two brain stem neuronal groups.** Science. 189:55-58.

Hunt, S.P., Pini, A., Evan, G.(1987). **Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation.** Nature. 328:623-635.

Imaki, T., Shibasaki, T. y Hotta, M. (1985). **The satiety effect of growth hormone-releasing factor in rats.** Brain Res. 340:186-188.

Jackson, A. and Vrossman, A.R. (1981) **Basal ganglia and other afferent projection to the peribrachial region in the rat. A study using retrograde and anterograde transport of horseradish peroxidase.** Neurosci. 6:1537-1549

Jones, B. **Basic Mechanisms of sleep-wake states.** En: J.Kruger, T. Roth y E. Dement (Eds). Principles of Sleep Medicine. Saunders Ed. New York, 1989. pp 121-138.

Jones, B., y Beaudet, A. (1987) **Retrograde labeling of neurons in the brain stem following injections of H<sup>3</sup> coline into the forebrain of the rat.** Exp. Brain Res. 65:437-442.

Jones, B., y Yang, T. (1985)**The efferent projections from the reticular formation and the locus coeruleus studied by anterograde and retrograde axonal transport in the rat.**J. Comp.Neurol. 242:56-62

Jouvet, M. y Moruzzi, G. **Neurophysiology and neurochemistry of sleep and wakefulness.** Springer-Verland, New york. 1972. p 534.

Kerppola, K., y Curran, T. (1991)**Transcription factor interactions: basics on zippers.** Currant, Opn Struct. Biol. 1:71 79.

Kissilef, H.R. y Van Itallie, T.B. (1982) **Physiology of the control of food intake.** Annu. Rev. Nutr. 2:371-418.

Krishnan R.R., Venkataraman S., Doeaiswamy. M.P. Reed, D.A. **Concepts in hypothalamo-pituitary-adrenal axis regulation** En: Riche J.C. Ed. **Stress: Neuropeptides and Systemic Disease.** Academic Press. New York. 1991. 19-35.

Krueger, J., Pappenheimer, J., y Karnovsky, M., (1982) **Sleep-promoting effects of muramyl peptides.** Proc. Natl. Acad. Sci., 79: 6102-6106.

Krueger, J., Rosenthal, R., Martin, S., Walter, J., Davanne, D., Shoham, S., Kubillus, S., y Biemann, K.,(1987) **Bacterial peptidoglycans as modulators of sleep. Y. Anhydrous forms of muramyl peptides enhance somnogenic potency.** Brain Res., 403: 249-266.

Krueger, J., Walter, J., Dinarello, C., Wolff, S., y Chedid, L.,(1984) **Sleep promoting effects on endogenous pyrogen (interleukin-1).** Am. J. Physiol. 246: R994-R999.

Krueger, M.J. y Obal, F. **Sleep factors** En:Saunder, A.N. and Sullivan, C.E.(Eds) Sleep y breathingh Ed. New York, 1994. pp 79-111. (1994)

Kushida CA; Zoltoski RK; Gillin JC (1995) **The expression of m1-m3 muscarinic receptor mRNAs in rat brain following REM sleep deprivation.** Neuroreport 12:1705-8

Lecea L; Criado JR; Prospero-Garcia O; Gautvik KM; Schweitzer P; Danielson PE; Dunlop CL; Siggins GR; Henriksen SJ; Sutcliffe JG. (1995) **A cortical neuropeptide with neuronal depressant and sleep-modulating properties.** Nature 381 p242-5

Levine, A.S. y Morley, J.E.(1984) **Neuropeptide Y: A potent inducer of consummatory behavior in rats.** Peptides. 5(suplemento 1):1025-1029.

Lin, J., Sakai, K. y Jouvet, M.(1988) **Evidence for histaminergic arousal mechanisms in the hypothalamus of cats .** Neuropharmacol. 27:111-122

Lin, J.S., Sakai, K. Vanni-Mercier, G. y Jouvet, M.(1989) **A critical role of the posterior hypothalamus in the mechanisms of wakefulness determined by microinjection of muscimol in freely moving cats.** Brain Res.479:225-240.

Mansbach, R., y Lorenz, D., (1983) **Cholecystokinin (CCK) elicits prandial sleep In rats.** Physiol Behav.30:179-183.

Merchant-Nancy. H., Vazquez, J., Aguilar-Roblero, R. y Drucker-Colín, R.(1992). **c-fos proto-oncogen changes in relation to REM sleep duration.** Brain Research. 579:342-346.

Merchant-Nancy. H., Vazquez, J., Garcia, F. y Drucker-Colín, R.(1992)**Brain distribution of the c-fos expression as result of prolonged rapid eye movent sleep period duration.** Brain Research. 579:342-346.

Mogan, M.M. y Saper.(1994) **Neuropeptide immunoreactive f afferents to the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus in the rat.** J.Com. Neurol. 253:315-332.

Monmaur, P. y Breton, P.(1991) **Ellicitation of hippocampal theta by intraseptal carbachol injection in freely moving rats.** Brain Res. 544: 150-155.

Morgan, J.I. y Curran, T. (1986) **Role of ion flux in the control of c-fos expression.** Nature. 322:552-555.

Morgan, J.I y Curran, T. (1990) **Proto oncogen expression in the nervous system.** Discuss Neurosci., VII.11-20

Morota, I.J.A. Crosby, G. y Uthl, G.R.(1992) **Selective of pentobrbital and halothane on c-fos and c-jun-B gene expression in rat brain** Anesthesiology, 77:365-371

Moruzzi, G., y Magoun, H, (1949) **Brainstem reticular formation and activation of the EEG.** EEG Clin. Neruophysiol. 1.455-473

Muller, R, Muller, D., Verrier, B., Herbest, H., (1984) **Evidence that expression of c-fos protein in amnio cells is regulated by external signals.** J. EMBO. 5:2.311-6.

Nauta, W. (1946) **Hypothalamic regulation of sleep in rats. An experimental study.** J. Neurophysiol. 9: 285-316.

Obal, F.,(1986) **Effects of peptides (DISP, DISP analogues, VIP, GRF Y CCK) on sleep in the rat.** Clin. Neuropharmacol.9:459-461.

Olds, J., y Milner, P.(1951). **Positive reinforcement produced by electrical stimulation of the septal area and other regions of the rat brain.** J. Comp. Physiol.. Psychol.47:419-427.

Olson, B.R. Freilino, M., Hoffman, G.E. Stricker, E.M. Saved, A.F. y VerbalisJ.G. (1993) **c-fos expression in rats brainstem nuclei in response to treatments that alter food intake and gastric motility.** Mol. Cell. Neurosci. 4:93-106.

Pavel, G. (1979) **Pineal vasotocin y sleep: involvement of serotonin containg neurons.** Brain Res. Bull. 4:731-734

Paxinos, G., and Watson, C., **The rat in stereotaxic Coordinates.** Academic Press, Orlando, 1986.

Pompeiano,M. Cirelli, C. y Tononi, G.(1992) **Effects of sleep deprivation on Fos-like immunoreactivity in the rat brain** Arch. Ital. Biol. 130:325-335

Pompeiano,M. Cirelli, C. y Tononi, G.(1994) **Immediate-early genes in spontaneous wakefulness and sleep expression of c-fos and NGFI-A m RNA and protein** J.Sleep Res, 3:80-96.

Plata-Salaman C.R.(1989) **Growth factors, feeding regulation and the nervous system.** Life Sciences. 45:1207-1217.

Rampin, C. Cespuglio, R., Chastrette, N. y Jouvet, M. (1991). **Immobilization stress induced a paradoxical sleep rebound in rat.** Neurosci. Lett., 126 113-118.

Rolls, C.T. (1981) **Central nervous mechanisms related of feeding and appetite.** Br Med Bull 37:131-134.

Saddin, J.F. Parker, D.C., Mace, J.W.Gotlin, R.W., Jhonson, L.C. y Rossman, L.G. (1969) **Human growth hormone release: relation to slow-wave sleep and sleep-walking cycles.** Science 165:513-515.

Sander, L.D. y J.R. Porter (1988) **Influence of bombesin, CCK secreting and CRF on corticosterone concentration in the rat.** Peptides. 9:173-117.

Sagar, S.M., Sharp, F.R. Curran, T.(1988). **Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level.** Science. 240:1328-1331.

Sagar, S.M., y Sharp, F.R. (1990) **Light induced a Fos-like nuclear antigen in retinal neurons.** Mol. Brain Res. 7 :17-21.

Sallaz, M y Jourdan F. **C-fos expression and 2DG uptake in the olfactory bulb of odour simulated awake rats.** NeuroReport. 4:55-58.

Saper, C. y Loewy, A. (1985)**Efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat.** Brain Res. 197:291-317.

Sakai, K., El Mansari, J., Lin, J., Zhang, G. y Vanni-Mercier,G. **The posterior hypothalamus in the rat regulation of wakefulness and paradoxical sleep.** En: M.Mancia y G. Marini(Eds.). The Diencephalon and Sleep .Raven Press., New York. 1990. pp 171-178.

Selye, H. (1973) **The evolution of the stress concept.** Amer. Scient. 61:692-699.

Sheng , M. y Greenberg, M.E.(1990) **The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system** Neuron, 4:477-485

Shiromani, P.J. Kilduff, T.S. Bloom, F.E. y McCarley, C.R.(1992) **Cholinergically induced REM sleep triggers Fos-like immunoreactivity in dorsolateral pontine regions associated with REM sleep** Brain Res., 580:351-357.

Sherin, J.E., Shiromani, P.J., McCarley, C.R. y Saper, C.B. (1996) **Activation of Ventrolateral Preoptic Neurons During Sleep.** Science . 271:216-18.

Stacher,G., (1985).**Satiety effects of CCK and ceruletide in lean and obese man,** Ann.N.Y.Acad.Sci.448:431-436.

Staiger J.F. y Numborg, F.(1991) **The afferent connections of the lateral septal nucleus in the rat: Projection to diencephalon and brain stem.** Cell Tissue Res. 254:391-415.

Steinbush,H.**Serotonine-immunoreactive neurons and their projections in the CNS.** En:A Bjorklund, T. Hokfelt y M.Kuhar(Eds.), Hand Book of Chemical Neuroanatomy.Elsevier Amsterdam, 1984. pp68-125.

Schoenenberger, G.A. (1984), **Characterization, properties and multivariate functions of delta-sleep-inducing peptide (DISP).** Eur. Neurol. 23:321-345 .

Shoham, S., Davenne, D., Cady, A., Dinarello, C., y Krueger, J., (1987) **Recombinant tumor necrosis factor and interleukin-1 enhance slow-wave-sleep in rabbits.** Am. J. Physiol., 253: R142-R149.

Sudol, M. Seth, G. Grant, N. y Mainsopierre, C. (1993). **Proto-oncogen and signals processes in neural tissues.** Neurochem. Int. 44:369-384

Swanson, L.W. y Sawchenko, P.E. (1983) **Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei.** Ann Rev. Neurosci. 6:269-324.

Sawanson. L.W. y Cowan, M.W. (1979)**The connection of the septal region in the rat.** J. Comp.Neural 1986, 621-656.

Swanson, L.W., Sawchenko,P.E. (1986) **Regulation of multiple peptide in CRF parvocellular neurosecretory neurons: implications for the stress response.** Prog.Brain Res.68:169-190.

Sawchenko, P.E. The final common path. En Brown, M.R., Koob, G.F. River, C. Eds. **Stress:Neurobiology and neuroendocrinology**. New York. 1991 55-71.

Swank , M.W y Bernstein, LI(1994)**C-fos induced in response to a conditional stimulus after single trial taste aversion learning**. Brain Res., 636:202-208

Tononi, G., Pompeiano, M. Cirelli, C.(1994) **The locus coeruleus and immediate-early genes in spontaneous and forced wakefulness**. Brain Res. Bull. 35:589-96.

Valentino, R.J.Foote, S.L., y Pagen, M.E.(1992)**The locus coeruleus as a site for integrating CRF and noradrenergic mediation of stress responses**. Ann. Ny. Acad.Sci. 697, 173-188.

Yim,G.K. y Lowy, M.T. (1984). **Opioids, feeding and anorexia's Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.** 43:2893-2897.

Zini , I., Merol, E. Fuxe, K., Lenzi, P.L., Agnati, L.F., Harfstrand, A., Mutt, V., Tatemoto, K., Moscara, M. (1984) **Actions of centrally administered neuropeptide y on EEG activity in different rats a strains in different phases of their circadian cycle**. Acta Physiol. Scand.