

11281



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA  
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

## “IDENTIFICACIÓN DE UN SUSTRATO ANATÓMICO EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL QUE RESPONDE A LA SINCRONIZACIÓN POR ALIMENTO”

### TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:  
ALBERTO MANUEL ANGELES CASTELLANOS

TUTOR:  
DRA. CAROLINA ESCOBAR BRIONES



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

Tesis:

**"IDENTIFICACIÓN DE UN SUSTRATO ANATÓMICO EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL QUE RESPONDE A LA SINCRONIZACIÓN POR ALIMENTO"**

Comité Tutorial:

Dra. Carolina Escobar Briones

Dr. Mauricio Díaz Muñoz

Dr. Gabriel Roldan Roldan

Jurado de Examen de Grado:

Presidente: Dra. María Luisa Fanjul Peña de Moles

Secretario: Dra. Carolina Escobar Briones

Vocal: Dr. Rolando Hernández Muñoz

Vocal: Dr. Oscar Prospero García

Suplente: Dr. Gabriel Roldan Roldan

Suplente: Dr. Mauricio Díaz Muñoz

Para la realización de esta tesis se contó con el apoyo de los proyectos de CONACYT: N33033 y M43950; DGAPA IN203803, IX227504.

Beca del Programa de mejoramiento de profesorado de educación superior (PROMEP-UABJO) 2000-2004.

Beca complementaria de la dirección general de estudios de posgrado (DGEP-UNAM) 2000-2004.

## **AGRADECIMIENTOS.**

A la Universidad Autónoma "Benito Juárez de Oaxaca" por el apoyo brindado para esta aventura a través del programa PROMEP y a la Facultad de Medicina de la UNAM por abrigarme durante todo este tiempo.

A la Columna 8, "*14 de Junio*" por apoyarme en los momentos mas críticos de indecisión.

A la Dra. Lorena Ocampo Tallavas por su apoyo, libertad y confianza de dejarme hacer y por la amistad y cariño de tanto tiempo.

A el Dr. Javier Ochoa Canales "Jorvick" por hacer SWITCH de sensibilidades en cualquier punto del camino conmigo.

A Siraam Cabrera Vásquez y su familia por todo su apoyo; A Cynthia Cárdenas Chuliá por sus consejos, entusiasmo y cariño; A Manuel y Sergio Sánchez Sánchez por su hermandad; Al Tallito, Betito, Neto, Silvano, Ésau, y el otro simio por la confianza en este recalcitrante amigo, y a todos los nuevos amigos del TACOMABI que hacen el equipo y motor de trabajo cotidiano, esta es mi mejor forma de darles la bienvenida a mis sueños compartidos.

Especialmente a mi tutor y directora de esta tesis, Dra. Carolina Escobar Briones: gracias por tanta paciencia, enseñanzas y amistad, por soportar mis bromas, desatinos, necedades, desacuerdos y sobre todo gracias por confiar en mi, por enseñarme que la mejor forma de ser un equipo es la sinceridad y armonía.

Al Dr. Raúl Aguilar Roblero por su amistad y su apoyo sin exigir nada a cambio, así como a su grupo de trabajo.

A mis amigos y compañeros del Laboratorio: Tere Martínez por tu apoyo y amistad inigualable; A Teresita Solís por soportar todas y cada una de mis bromas; A Mari Carmen Miñana por compartir la desnutrición con nuestros ritmos; Al buen (Pichón) Jorge Mendoza porque escribir las historias contigo siempre es un bello viaje de sentimientos encontrados.

A mis revisores de tesis por que con sus comentarios enriquecieron este trabajo.

Quiero dedicar también esta tesis a quien es nuevo en la tarea de vivir la excitante experiencia de la investigación.

A mi Padre Andrés Ángeles (tío Rollins) donde estés si es que estas o estas llegando, gracias por coincidir conmigo (TE EXTRAÑO).

A Sabina Castellanos mi madre, allá en su mundo de risas y silencios.

A mis hermanos Andrés, Juanelo, Claudia y Gloria, por todo el amor y la inspiración que nos une.

A Kryz Luna Martínez, que le dio sentido final a esta eterna búsqueda de ilusiones con su fe y su confianza, en este camino que emprendimos juntos y a Ernestico por ser el viento que mueve este molino con la gran fuerza de un huracán, que le impone esperanza y vida a mi vida (TE AMO).

Y a todos los que hicieron que esta sea la mejor de mis experiencias, que va mas allá de lo imaginado.

**Manuel Ángeles Castellanos**

*"Otra vez siento bajo mis talones el costillar de rocínante, y vuelvo al camino con mi adarga al brazo ...."*

*¡Oh Sancho!, que en nuestras obras,  
hemos de matar en los gigantes a la soberbia;  
a la envidia, en la generosidad y buen pecho;  
a la ira, en el reposado continente y quietud del animo;  
a la gula y al sueño, en lo poco que comamos, y en lo mucho que velamos....*

*Ser casto en los pensamientos, honesto en las palabras,  
liberal en las obras, valiente en los hechos,  
sufrido en los trabajos, caritativo con los menesterosos  
y finalmente, mantenedor de la verdad,  
aunque cueste la vida el defenderla.*

*De todas estas grandes y mínimas partes se compone un buen caballero andante.....*

**Miguel de Cervantes Saavedra**  
***El ingenioso hidalgo Don Quijote de la Mancha.***

# INDICE

<b>TEMA:</b>	<b>PAG.</b>
<b>INDICE</b>	01
<b>RESUMEN</b>	03
<b>ABSTRACT</b>	04
<b>ABREVIATURAS</b>	05
<b>INTRODUCCIÓN</b>	06
<b>RITMOS BIOLÓGICOS</b>	06
Ritmos Ultradianos	10
Ritmos Infradianos	10
Ritmos Circadianos	11
Núcleo Supraquiasmático	12
Fenómeno de sincronización	14
Sincronización por alimento	15
Identificación del reloj sincronizado por alimento	19
<b>INGESTIÓN DE ALIMENTO</b>	21
La conducta de ingestión involucra más que la alimentación	21
El modelo de entrada-integración-salida y sus limitaciones	22
Clasificación de la entrada de información	23
Sustrato neuronal involucrado en la regulación del consumo de Alimento	25
Hipotálamo	28
Principales núcleos hipotálamicos involucrados en la regulación Del balance energético y el consumo de alimento	30
Estructuras del sistema límbico involucradas en la conducta de Alimentación	34
<b>GEN <i>c-fos</i> Y OTROS GENES DE RESPUESTA INMEDIATA</b>	39
Vías de señalamiento neural que regulan la expresión de <i>c-fos</i>	40
Inducción de proteína <i>c-Fos</i> en el sistema nervioso central por El alimento	42
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	44
<b>HIPÓTESIS</b>	46
<b>OBJETIVOS</b>	47

<b>MATERIAL Y METODOS</b>	47
<b>DISEÑO EXPERIMENTAL</b>	48
Sincronización	48
Control de la condición metabólica	48
Persistencia	50
Tiempos muestreados	51
Histología e inmunohistoquímica	52
Cuantificación de células inmunoreactivas	53
Análisis de datos	53
Estructuras analizadas	54
<b>RESULTADOS</b>	55
Núcleos del tallo cerebral	55
Núcleos de hipotálamo	62
Estructuras del sistema límbico	71
<b>DISCUSIÓN GENERAL</b>	83
Estructuras del sistema nervioso central que se activan después de la ingestión de alimento	83
Estructuras del sistema nervioso central que se activan previo a la ingestión de alimento	87
Estructuras del sistema nervioso central que se activan en condiciones de persistencia de la sincronización por alimento.	90
<b>CONCLUSIONES</b>	94
Modelo del reloj sincronizado por el alimento	95
<b>REFERENCIAS</b>	96
<b>ANEXOS</b>	110

## RESUMEN

Cuando el acceso al alimento se restringe a unas horas al día, los animales desarrollan actividad de anticipación que consiste de un incremento en la actividad locomotora, el pico de corticosterona, de ácidos grasos y de la temperatura corporal se recorren hacia horas previas a la llegada del alimento.

Este fenómeno de sincronización está relacionado a la expresión de un reloj independiente del núcleo supraquiasmático. Hemos propuesto que el oscilador (OSA) está constituido por un sistema redundante formado por las diversas estructuras del sistema nervioso central y órganos periféricos que participan en el procesamiento y regulación de la conducta ingestiva y el balance energético. Para este modelo resulta indispensable comprender cuales estructuras median las entradas y salidas y cuales forman el mecanismo del oscilador.

El presente trabajo tuvo como objetivo identificar las estructuras del sistema nervioso central que participan en este fenómeno de sincronización por el alimento, utilizando como herramienta la expresión de la proteína c-Fos como marcador de actividad neuronal.

Los resultados muestran que el núcleo del tracto solitario, el núcleo parabraquial y paraventricular hipotálamico muestra una intensa activación neuronal posterior al momento de la alimentación lo que sugiere están involucradas con la transmisión de la señal generada por la comida y por lo tanto pueden constituir las vías de sincronización. El complejo amigdalino, el área perifornical y el núcleo tuberomamilar mostraron un aumento en la expresión de proteína c-Fos previo al momento del alimento sugiriendo una relación con la generación de la actividad anticipatoria al alimento. En la corteza prefrontal, corteza infralímbica, núcleo paraventricular talámico y los núcleos dorsomedial y lateral del hipotálamo, encontramos una anticipación y persistencia en ayuno de la activación por el alimento, que sugieren que están relacionados con los mecanismos del reloj. En conclusión, reiteramos que este reloj está constituido por un sistema en donde interactúan diferentes estructuras del sistema nervioso central y que éstas participan diferencialmente en los diversos procesos de la sincronización por alimento.



## ABSTRACT

When food is restricted to a few hours daily, animals exhibit food anticipatory activity (FAA) characterized by behavioural arousal and locomotor activation 2-3 h preceding food access. Corticosterone, free fatty acids and core temperature shift their phase anticipating the daily meal

It is well accepted that food entrainment depends upon a circadian oscillator independent of the SCN because food entrainment is elicited in animals with bilateral lesions of the SCN. It has been suggested that this food entrained oscillator (FEO) may be constituted by a distributed and possibly redundant system built up by diverse central nervous structures and peripheral organs involved with the processing and regulation of ingestive behaviors and energy balance. To characterize this model of FEO, it is necessary to identify which structures mediate the input of entraining signals, which structures constitute the clock work and which mediate the output that generates FAA.

The aim of this study was to identify in the central nervous system those structures involved in the process of food-entrainment. Therefore we used the protein c-Fos as marker of the neuronal activity.

Data indicate a marked cellular activation in the paraventricular nucleus and brain stem nuclei after meal time, which did not persist in fasting, suggesting that these structures are mainly involved with the response to signals elicited after feeding and could therefore be part of the entraining pathway. Food entrainment produced increased c-Fos-IR anticipating meal time in the amygdala nuclei, perifornical area and tuberomammillary nucleus indicating their possible involvement in the generation of AA. Food-entrained c-Fos-IR patterns persisted after three days in fasting in the dorsomedial and lateral hypothalamic nuclei, prefrontal cortex, lateral septum and paraventricular thalamic nucleus suggesting an involvement of these nuclei in a time keeping system entrained by feeding schedules.

In conclusion, we confirm that diverse cerebral structures are involved in food-entrainment and that they are differentially contributing to this time keeping system.

## ABREVIATURAS

$\alpha$ -MSH: Hormona estimuladora (alfa) del melanocito	LCR : Líquido Cefalorraquídeo
22A : 22 horas de Ayuno	LH : Núcleo Lateral del Hipotálamo
22A-R : 22 horas de Ayuno y Re-alimentación	MCH : Hormona Concentradora de Melatonina
3V : Tercer ventrículo	MeA : Amígdala Medial
4V : Cuarto ventrículo	NPY : Neuropeptido Y
A : Ayuno	NSQ : Núcleo Supraquiasmático
AA : Actividad Anticipatoria	NTS : Núcleo del Tracto Solitario
Acc : Núcleo Accumbens	PBN : Núcleo Parabraquial
AGRP : Proteína Relacionada al Gene Agouti	PE : Persistencia
AL : <i>ad libitum</i>	PeF : Núcleo Perifornical
AP : Área Postrema	<i>Per/PER</i> : Gen/Proteína "Periodo"
APO : Área Preóptica	POMC : Hormona Proopiomelanocortina.
ARC : Núcleo Arqueado	PVN : Núcleo Paraventricular del Hipotálamo
BLA : Amígdala Basolateral	PVT ; Núcleo Paraventricular del Tálamo
BNST : Núcleo de la Estria Terminalis	RA : Restricción de Alimento
CA1 : Área 1 del Cuerno de Ammon	RSA : Reloj Sincronizado por el Alimento
CA2 : Área 2 del Cuerno de Ammon	SL : Septum Lateral
CA3 : Área 3 del Cuerno de Ammon	SNC : Sistema Nervioso Central
CART : Transcrito semejante a Cocaína y Anfetamina	sol : Tracto Solitario
CCK : Colesistocinina	TM : Núcleo Tuberomamilar del Hipotálamo
CeA : Amígdala central	V : Nervio Trigémino
IR : Inmuno-reactividad	VII : Nervio Facial
CIL : Corteza Infralímbica	VMH : Núcleo Ventromedial del Hipotálamo
CPF : Corteza Prefrontal	VTA : Área Ventral Tegmental
CPL : Corteza Prelímbica	X : Nervio Neumogástrico (Vago)
DMH : Núcleo Dorsomedial del Hipotálamo	
DMX : Núcleo Dorsal Motor del vago	
DO : Densidad Óptica	
F-ZT : Food-Zeitgeber Time	
IEGs : Genes de Expresión Inmediata	
IX : Nervio Glossofaríngeo	

# INTRODUCCIÓN

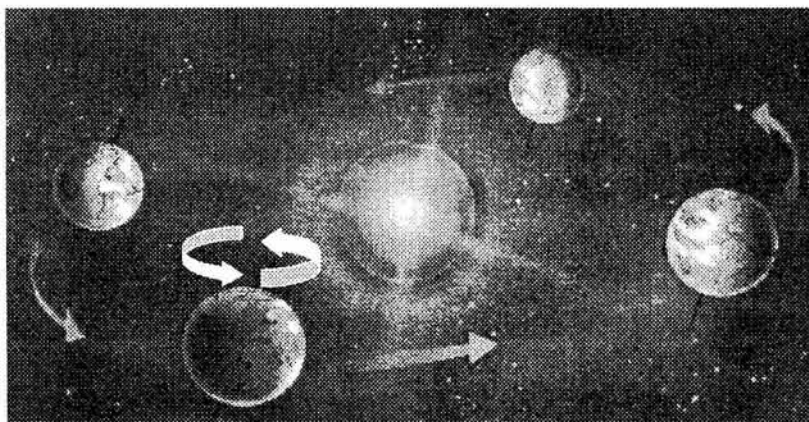
## RITMOS BIOLÓGICOS

La organización temporal es una característica fundamental de los organismos (Pittendrigh, 1993), manifestándose a través de cambios cíclicos en casi todas los eventos fisiológicos y conductuales. Existe una gran cantidad de estímulos en el medio ambiente que pueden afectar al organismo; entre estos podemos mencionar la alternancia entre el día y la noche, las oscilaciones diarias de la temperatura, de la presión atmosférica, y de la humedad.

Según Aschoff (1981) "la recurrencia de cualquier evento en un sistema biológico con intervalos más o menos regulares puede ser considerada un ritmo biológico".

Todos los organismos vivos presentan fluctuaciones periódicas que varían a diferentes frecuencias, desde las muy altas que oscilan a un ciclo por milisegundo, como la actividad eléctrica cerebral, o que oscilan con varios ciclos por minuto, como el ritmo del latido cardiaco, hasta las frecuencias muy bajas como el ritmo de reproducción de algunos animales y la hibernación, que se presentan una vez por año.

Uno de los cambios ambientales cíclicos de mayor influencia sobre los procesos rítmicos de los organismos es el ciclo luz-oscuridad (la alternancia día-noche), el cual está determinado por el movimiento de rotación de la Tierra (Fig. 1)



**Figura 1.** *Movimiento de rotación y translación de la tierra, fenómeno que generan los cambios diarios de luz-oscuridad y de las estaciones del año, respectivamente.*

El desarrollo de la vida en un ambiente que presenta cambios cíclicos llevó a desarrollar diversas estrategias tanto conductuales como fisiológicas para mantener un equilibrio funcional con el medio cambiante en el que se encuentran. Desde el punto de vista evolutivo a estos mecanismos se les ha denominado selección natural y el resultado de esta selección es el proceso de adaptación que han definido a las especies. Pittendrigh (1993) sugirió que la repetición ordenada y por lo tanto predecible de los ciclos ambientales, fue asimilada por los organismos mediante la creación de programas temporales internos que sincronizan las actividades metabólicas, fisiológicas y conductuales, permitiendo anticiparse al cambio ambiental que van a enfrentar.

La cronostasis define la existencia de procesos periódicos internos en un organismo que se han generado como mecanismos de adaptación ante un ambiente fluctuante. Todos los organismos presentan fluctuaciones en procesos fisiológicos y conductuales en intervalos de tiempo constante, que les permite organizar sus actividades de acuerdo a los momentos óptimos del día, lo cual implica que en alguna parte del organismo hay un sistema capaz de cuantificar el tiempo, lo que Pittendrigh denominó reloj biológico (Pittendrigh. 1993), del que depende la organización temporal de los organismos.

La cronobiología que es el estudio de los ritmos biológicos se ha desarrollado desde hace ya más de 2 siglos, aunque durante mucho años se pensó que, las variaciones cíclicas de los organismos dependían solamente de los cambios cíclicos del medio ambiente; es decir, una simple respuesta. Por lo tanto, se pensaba que los ritmos tenían únicamente un origen exógeno.

Sin embargo, durante el siglo XVIII el Francés J. De Marian, encontró que los cambios o variaciones rítmicas de algunas plantas y flores se mantenía aún en ambientes de oscuridad continua, es decir sin señales externas que indiquen el paso del tiempo.

Con estas observaciones se propuso que los ritmos biológicos no dependen sólo de señales externas, sino que tienen un origen endógeno y que pueden responder a señales ambientales (Pittendrigh. 1981).

A principios de 1900 se desarrolló el concepto de memoria temporal. Se pensaba que los organismos poseían un mecanismo para generar cierta organización temporal en sus procesos. Posteriormente, Aschoff y Pittendrigh (1957) basados en resultados de sus experimentos, eliminaron la idea de una memoria temporal demostrando la capacidad endógena que los organismos tienen para medir el tiempo, y por lo tanto la necesidad de un sistema de medición temporal, "el reloj biológico".

Se considera reloj biológico al sistema que tiene la capacidad de generar una organización temporal rítmica en el organismo así como de imponer un periodo y una fase a los procesos internos.

Para el estudio de los ritmos biológicos, se consideran una serie de características que permiten su evaluación; las variables de estudio son: periodo, frecuencia y amplitud.

- El periodo de un ritmo biológico se refiere al tiempo necesario para que se repita un mismo fenómeno y es generado por el reloj biológico.
- La frecuencia es el número de ciclos con el mismo periodo que se repiten en una unidad de tiempo.
- La amplitud se define como la diferencia que existe entre el valor máximo y el valor mínimo de un parámetro fluctuante.

Los ritmos biológicos se pueden clasificar de acuerdo a su periodo o bien de acuerdo al estímulo geofísico al que se relaciona directamente su periodo de oscilación (*Tabla 1*). Por su periodo se clasifican en ritmos ultradianos, los cuales se caracterizan principalmente por tener un periodo menor de 24 horas, ritmos circadianos con un periodo de aproximadamente 24 horas y ritmos infradianos con periodos mayores de 24 horas.

**Tabla 1.** Clasificación de los ritmos según los ciclos geofísicos o su periodo.

<b>ESTÍMULO GEOFÍSICO</b>	<b>RITMO BIOLÓGICO</b>	<b>PERIODO DE OSCILACIÓN</b>
<i>Mareas</i>	<i>Circamareal</i>	<i>Ultradiano</i>
<i>Ciclo día – noche</i>	<i>Circadiano</i>	<i>Circadiano</i>
<i>Ciclos lunares</i>	<i>Circalunar</i>	<i>Infradiano</i>
<i>Ciclos anuales (estaciones)</i>	<i>Circanual</i>	<i>Infradiano</i>

## **Ritmos Ultradianos**

Los ritmos ultradianos como se mencionó anteriormente son fluctuaciones que presentan una frecuencia alta, es decir su periodo es menor de 24 horas. El periodo de este tipo de ritmos abarcan desde algunos milisegundos, minutos hasta algunas horas. Dentro de esta clasificación se pueden observar la actividad neuronal, la frecuencia de contracción cardiaca y la liberación de algunas hormonas así como algunas manifestaciones conductuales, fases de sueño y en algunas especies marinas ritmos de 12 horas asociados a las mareas.

Los ritmos ultradianos se encuentran regulados por un proceso de retroalimentación fisiológica del cual dependen las oscilaciones del ritmo y no por un sistema de medición del tiempo. Por otro lado, la mayoría de los ritmos ultradianos presentan oscilaciones circadianas superpuestas a su oscilación ultradiana.

El ritmo cardiaco y el ritmo respiratorio son considerados como ejemplos de ritmos ultradianos, que dependen de un sistema de retroalimentación y que además muestran una fluctuación en su frecuencia durante el día, evidenciando la existencia de un reloj biológico circadiano.

## **Ritmos Infradianos**

Son ritmos con una frecuencia de oscilación baja es decir su periodo es mayor de 24 horas. Estos ritmos se encuentran en una variedad de organismos marinos, los cuales se sincronizan por ciclos lunares (entre 28 y 30 días). En mamíferos, un ejemplo muy claro de un ritmo infradiano es el ciclo menstrual en la mujer y en otros primates. Otros procesos endocrinos, metabólicos y conductuales en primates también se presentan con una periodicidad infradiana (Turek. 1994).

Por otro lado durante el año el ambiente presenta cambios muy considerables para cualquier organismo, tales como las fluctuaciones en la temperatura, la abundancia relativa de alimento durante las diferentes estaciones. A estos se asocian ritmos circanuales como la hibernación. Este es sólo un ejemplo de los procesos cíclicos que presentan ritmicidad circanual.

## **Ritmos Circadianos**

Los ritmos circadianos (cerca de un día, periodo cercano a 24 h), son los ritmos más estudiados ya que muchos parámetros fisiológicos y conductuales presentan este tipo de ritmicidad, además de que son de fácil acceso para su estudio. La alternancia día-noche es uno de los eventos ambientales de mayor relevancia para la expresión de los ritmos circadianos. La ingestión de alimento y de agua, la alternancia actividad-reposo, los procesos metabólicos y bioquímicos son algunos de los eventos que se encuentran en sincronización con la alternancia entre el día y la noche.

Algunas actividades conductuales de tipo circadiano se ven acompañadas de procesos fisiológicos que también se presentan con la misma fase, por ejemplo la temperatura corporal en animales nocturnos muestran el mayor incremento durante la noche, mientras que en animales diurnos se da durante el día. El ritmo de la temperatura corporal se encuentra relacionado a la actividad física de los organismos.

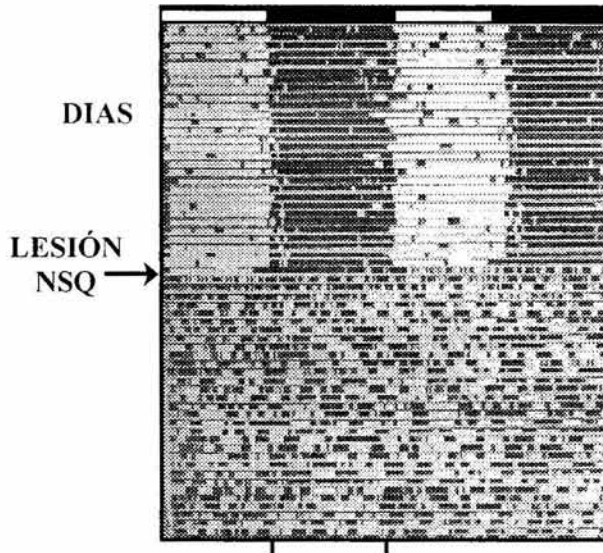
Otro parámetro fisiológico en donde se puede observar un ritmo circadiano sincronizado a la alternancia día-noche, es el de corticosterona. El aumento en las concentraciones plasmáticas de corticosterona en animales y cortisol en el humano comienza al final de la noche y disminuye al final del día (Follenius y cols. 1982). Se ha demostrado en humanos que la secreción de la hormona del crecimiento tiene un ritmo circadiano, presentando una secreción máxima durante las primeras horas del sueño (Van Cauter y cols. 1992). De tal manera existe una gran cantidad de fenómenos en los organismos que presentan ritmicidad circadiana; los ejemplos conductuales y fisiológicos antes mencionados son sólo algunos.



## El Núcleo Supraquiasmático

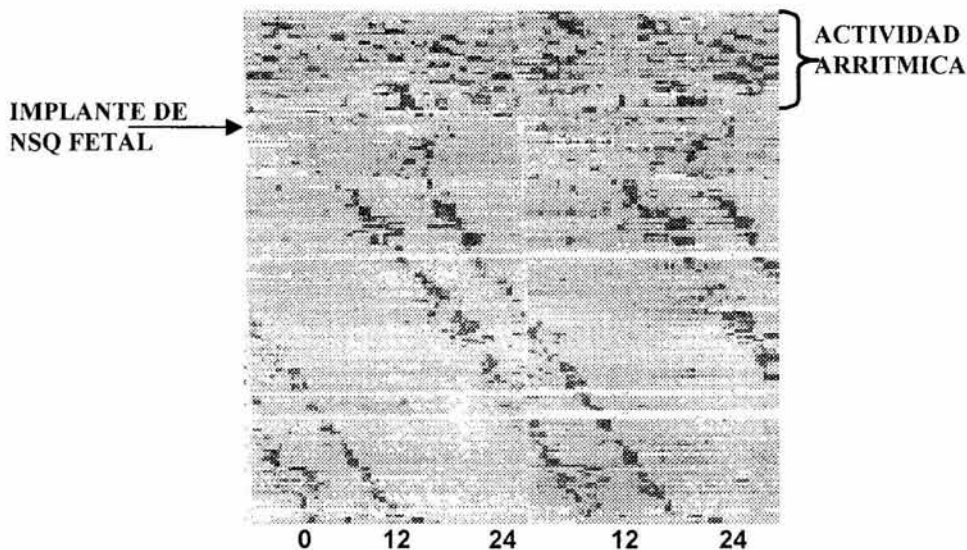
EL núcleo supraquiasmático (NSQ) se encuentra en la parte anterior ventral del hipotálamo inmediatamente arriba del quiasma óptico. Diversos estudios en mamíferos han demostrado que este núcleo es el principal oscilador o reloj endógeno generador de los ritmos circadianos (Moore y Eichler, 1972).

La función del NSQ como un reloj biológico, se logro cuando Moore y Eichler (1972) cuando encontraron que la destrucción de esta estructura eliminaba el ritmo de corticosterona. Simultáneamente Stephan y Zucker (1972) descubrieron que lesiones del NSQ eliminaban la ritmicidad circadiana de actividad locomotora y de ingestión de agua (Fig. 2).



**Figura 2.** Actograma de doble representación (dos días) de actividad locomotora de un hámster. En la mitad superior del actograma se aprecia la organización temporal de la conducta con un periodo de 24 horas. La flecha indica el momento de la lesión del NSQ. Después de la flecha la organización circadiana que se observaba previa a la lesión se vuelve totalmente arrítmica, el animal distribuye su conducta de manera azarosa sin ninguna organización temporal (Tomada de Moore, 1998).

Otra manipulación experimental que ha demostrado la capacidad del NSQ como reloj biológico circadiano, es que en animales con lesión del NSQ muestran un actividad locomotora arrítmica y cuando se realiza un transplante de tejido fetal hipotálamico que contenga neuronas del NSQ, se observa una recuperación de su ritmo en la conducta locomotora (Fig. 3) (Aguilar-Roblero y cols. 1986).



**Figura 3.** Actograma de doble representación en el que se puede observar la conducta de un hámster con lesión del NSQ. Posteriormente se implantó tejido fetal del hipotálamo anterior. Se puede ver la recuperación de la actividad locomotora en forma rítmica con un periodo estable. (Tomada de Aguilar-Roblero y col., 1994)

El NSQ como reloj biológico endógeno ha sido estudiado en diversas especies, tanto diurnas como nocturnas que pueden presentar ritmicidad circadiana. El NSQ de roedores es el que ha recibido mayor atención para el estudio de los ritmos circadianos, por lo que es el reloj biológico mejor caracterizado hasta la fecha.

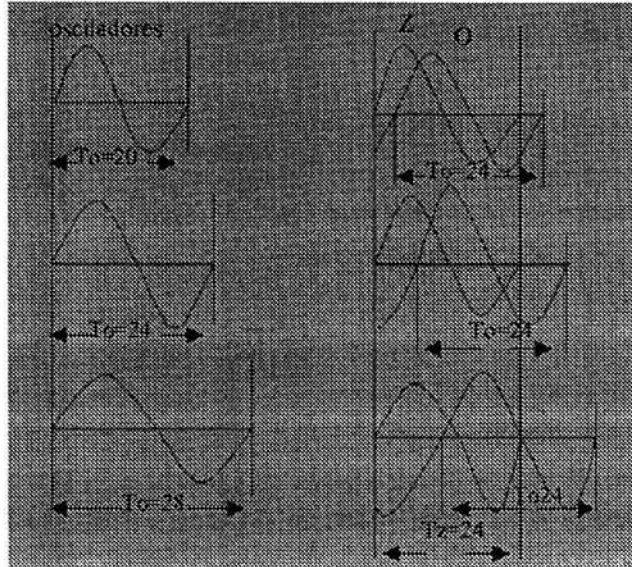
### **Fenómeno de Sincronización.**

Los procesos rítmicos se originan a partir de mecanismos endógenos en el organismo, pero estas oscilaciones deben estar en relación con la temporalidad del ambiente externo. Podemos definir a la sincronización como el fenómeno por el cual los ritmos endógenos se ajustan a los ritmos ambientales. En el medio ambiente existen señales que indican el transcurso del tiempo en forma periódica y a estas señales se les denomina sincronizadores (Pittendrigh, 1981). Una señal se considera sincronizador cuando se presenta regularmente, es predecible y proporciona información del paso del tiempo.

El mecanismo de sincronización fue propuesto por Pittendrigh en 1959. Pittendrigh señalaba que la sincronización es la coordinación entre dos osciladores que presentan oscilaciones similares en donde se implica un control del periodo y de la fase por el sincronizador sobre el oscilador. Cuando se presenta la sincronización la ritmicidad endógena ajusta su periodo y fase a la del sincronizador, es decir el sincronizador impone su fase y periodo al oscilador (*Fig. 4*)

La influencia de los cambios de luz-oscuridad sobre un oscilador es constante, por lo tanto el oscilador se ve afectado por el sincronizador de manera que se acelera y desacelera su velocidad de oscilación al estarse ajustando continuamente. Desde el momento en que un sincronizador afecta al oscilador, este empieza a ajustarse al periodo del sincronizador, pero dicho ajuste se presenta de manera gradual hasta ajustarse a la fase y periodo del sincronizador. A estos cambios graduales se les ha denominado ciclos transitorios.

La sincronización de los ritmos circadianos depende de la existencia de un reloj circadiano así como de vías sensoriales a través de las cuales los estímulos externos, que pueden funcionar como sincronizadores, modifican este reloj (Escobar y cols. 1998).



**Figura 4.** En la figura de la izquierda se muestran 3 oscilaciones con un periodo distinto ( $T_0$ ), las cuales posteriormente se exponen a un sincronizador con un periodo de 24 horas ( $T_z$ ). Al sincronizarse comienzan a oscilar con un periodo de 24 horas y cada uno con una relación de fase distinta hacia el sincronizador figura de la derecha (Tomada de Pittendrigh, 1981).

### Sincronización por alimento.

La ingestión de alimento es un evento muy importante y necesario para la supervivencia y salud de todos los organismos, y para muchas especies la disponibilidad y acceso al alimento varía de acuerdo al ambiente en el cual viven. Para la gran mayoría de las especies, el alimento se encuentra disponible únicamente en momentos específicos del día durante los cuales pueden tener acceso a éste. Debido a esta restricción natural del alimento, los organismos han desarrollado estrategias eficientes tanto conductuales y metabólicas para la obtención de energía. Algunos animales han desarrollado estrategias conductuales de búsqueda y almacenamiento de comida para enfrentar esta restricción de alimento, pero cuando la disponibilidad del alimento depende del

tiempo más que del lugar, los organismos han desarrollado la capacidad de poder "medir" el tiempo de disponibilidad por medio de relojes u osciladores endógenos.

Muchos de los estudios actuales que tienen como fin analizar del fenómeno de la sincronización por alimento se han basado en los resultados que Augusto Forel reportó en 1910. Forel propone en las abejas la existencia de mecanismos de medición de tiempo para comer. Forel denominó a este fenómeno memoria temporal (Gruart y col. 2002).

Por otro lado, en 1922 Carl Richter reportó que ratas, sometidas a una sola comida al día tenían un aumento de su actividad locomotora antes de la llegada del alimento (Bolles y Stokes. 1965). El no lo relacionó con un reloj, sino a mecanismos de reforzamiento. Fue en 1962, que Robert Bolles sugirió que la actividad locomotora que mostraban los animales antes de la hora de la comida podría estar generada por la señal de un "reloj biológico". De acuerdo a estos resultados, se pudo observar que cuando se restringe el acceso al alimento por unas cuantas horas al día, este adquiere relevancia como sincronizador de los ritmos biológicos. Es decir, los ritmos circadianos conductuales y fisiológicos modifican sus oscilaciones organizando sus picos de máxima secreción alrededor de las horas de alimentación.

Los primeros estudios dirigidos a explorar la potencia del alimento como sincronizador se realizaron en ratas y se pudo observar que al limitar el acceso al alimento a una misma hora durante varios días; se genera una modificación en la distribución temporal de su conducta presentando una intensa actividad locomotora durante las 2-3 horas previas al acceso al alimento. Esto se conoce como actividad de anticipación al alimento (AA) (Bolles y Stokes. 1965).

La imposición de horarios restringidos de alimento también sincroniza procesos fisiológicos asociados al balance energético y la digestión (Escobar y cols. 1998; Díaz-Muñoz y cols. 2000). Este fenómeno de anticipación se considera que es dependiente de un reloj u oscilador que es sincronizado por el alimento, ya que dicho fenómeno cuenta con propiedades particulares de un reloj y sobre todo, que es independiente del NSQ. Dicha consideración surgió a partir de los estudios de F. Stephan (1979), en donde demostró que en animales con lesiones del NSQ

y bajo condiciones de iluminación constante, aun se presenta la AA bajo horarios restringidos de alimentación.

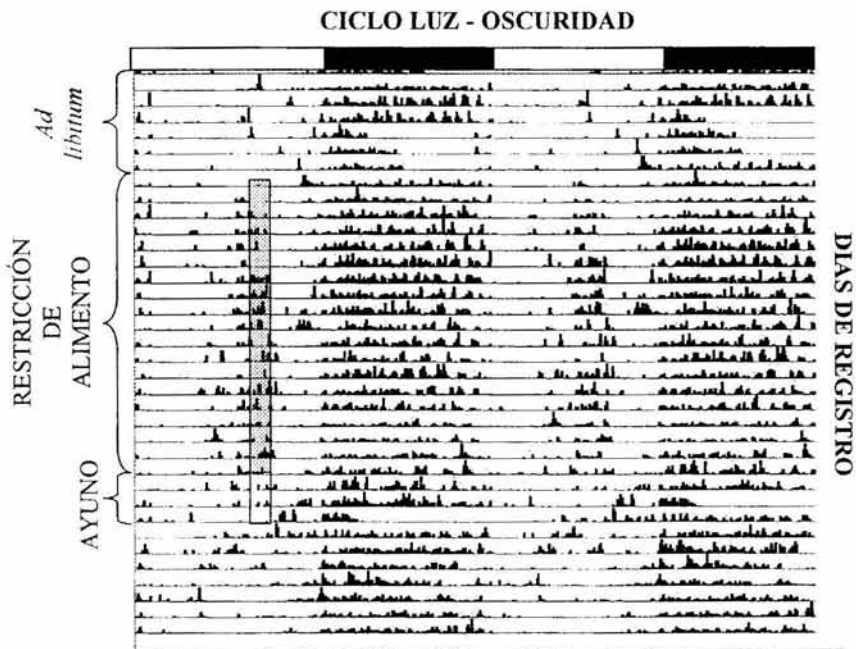
Se ha sugerido que la AA puede depender de un proceso de aprendizaje asociativo, en donde los organismos pueden anticipar el tiempo de llegada del alimento de acuerdo a señales ambientales tan sutiles como las variaciones de temperatura, la intensidad de la luz, un sonido, o cualquier otro estímulo externo que pudiera servir de señal de tiempo para el animal (Mistlberger. 1994). Aún considerando que así fuera, la estimación del tiempo para un periodo circadiano requiere de la existencia de un reloj.

Por otra parte, el fenómeno de AA cuenta con características particulares que apoyan que se trata de un proceso circadiano asociado al alimento, y por lo tanto de un reloj. (Fig. 5).

- La AA solamente aparece cuando el alimento se presenta con un periodo dentro de un rango circadiano, es decir cada 19 a 31 horas (Stephan. 1981). Cuando el alimento se presenta fuera de este rango no se presenta la AA. Mistlberger y cols. (1994) demostraron que en ratas la AA se presenta de manera más intensa cuando el alimento se presenta cada 25 ó 26 horas. Los resultados de estos experimentos indican que la AA, y en general la sincronización por alimento, depende de un reloj interno con un periodo cercano a 24 horas.
- La AA persiste aún en ausencia del alimento, es decir en condiciones constantes. Se ha demostrado que la AA persiste con la fase y el periodo impuestos por el alimento durante varios días después de haber sometido a los animales a horarios restringidos de alimentación. Estas características indican la existencia de un componente de oscilación autosostenido circadiano (Mistlberger. 1994).
- La existencia de ciclos transitorios que se generan cuando se cambia de fase y periodo de la llegada del alimento. Estos eventos

evidencian un fenómeno de re-sincronización del reloj a la nueva fase y periodo (Stephan. 1981).

- La AA no solamente es reflejada en la activación conductual del organismo sincronizado a horarios restringidos de alimentación. También parámetros de carácter fisiológico se sincronizan con el alimento, entre ellos el ritmo de la temperatura corporal, (Krieger y Herbert. 1978) el ritmo de corticosterona plasmática (Honma y cols. 1984), glucógeno hepático, ácidos grasos libres (Escobar y cols. 1998), insulina, motilina (Davidson y Stephan. 1999).



**Figura 5.** Actograma de doble representación de la conducta de una rata que se encuentra bajo sincronización por alimento. el rectángulo representa los días las horas y días de restricción de el alimento (tomada de Mendoza y cols., 2004).

La dirección que ha tomado el estudio de este fenómeno de la sincronización de los ritmos biológicos por el alimento y el estudio de la AA, es tratar de identificar los mecanismos por los cuales los organismos son capaces de predecir y anticipar el momento de la llegada del alimento.

### **Identificación del reloj sincronizado por el alimento (RSA)**

Se ha intentado la identificación del sustrato morfo-funcional del reloj sincronizado por el alimento (RSA), principalmente en el sistema nervioso central (SNC), en estructuras que participan con el balance energético y la regulación de la ingestión de alimento; que podrían ser parte de este reloj circadiano. Sin embargo, aún no se ha podido identificar la o las estructuras relacionadas con la sincronización por alimento.

Se han realizado estudios dirigidos a la identificación del reloj sincronizado por alimento. Uno de mayor aproximación fue el que demostró que el registro de actividad eléctrica multiunitaria en el núcleo ventromedial hipotálmico (VMH) y sobre todo, el núcleo lateral hipotálmico (LH) se sincroniza al alimento y muestra persistencia del patrón sincronizado hasta por 4 días en total privación de alimento (Kurumiya y Kawamura. 1991).

En otro trabajo se realizó una lesión bilateral del VMH demostrando una pérdida de la sincronización por alimento, manifestada por una abolición de la AA y del ritmo de corticosterona (Krieger. 1980), sugiriendo que el VMH pudiera ser el sustrato anatómico del oscilador sincronizado por alimento. Posteriormente se demostró que la AA se restauraba después de la fase dinámica o aguda de la lesión, y cuando los animales entraban en la fase estática de la lesión se minimizan las alteraciones metabólicas que se generan por la lesión (Mistlberger y Rechtschaffen. 1984). Con lo anterior se descartó el VMH como el responsable de general la sincronización por alimento. También se han realizado lesiones del núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) sin resultados exitosos (Mistlberger y Rusack. 1988). Otras áreas cerebrales como el LH, al ser lesionado no elimina la AA, así mismo lesiones de hipocampo, amígdala o núcleo accumbens tampoco eliminan la AA (Mistlberger y Mumby. 1992). De la misma manera se han realizado



estudios con lesiones en otras áreas involucradas con la entrada de información visceral hacia el hipotálamo, es decir el núcleo parabraquial (PBN) que su lesión bilateral genera una marcada atenuación de la AA (Davidson y cols. 2000) y la lesión del Área Postrema (AP) que no altera la expresión de la AA en ratas sincronizadas al alimento (Davidson y cols. 2001).

Debido a que lesiones de diversos núcleos del sistema nervioso central no alteran los ritmos sincronizados por el alimento, se ha considerado que el oscilador sincronizado por alimento puede estar constituido por un sistema multiestructural y redundante en donde se involucre la participación de estructuras periféricas que interactúan con estructuras centrales involucradas en la regulación del metabolismo energético (Escobar y cols. 1998). La información metabólica relacionada con la ingestión de alimento, puede ser una señal para el sistema nervioso central en la sincronización por alimento. La participación de procesos fisiológicos a nivel periférico en este fenómeno, ha llevado a tratar de buscar el oscilador circadiano asociado al alimento en procesos digestivos, metabólicos y en su relación con el sistema nervioso central.

Por lo anterior, es evidente que la identificación de una estructura única como sustrato del reloj sincronizado por el alimento no ha sido exitosa y se sugiere que este reloj puede estar constituido por un sistema distribuido y redundante de órganos periféricos interactuando con estructuras del sistema nervioso central e involucradas con las conductas de ingestión y con el balance energético. Por lo que basados en estas consideraciones nuestro grupo se ha planteado un modelo de oscilador constituido por estructuras de entrada o de sincronización, otras involucradas en la medición temporal, que serían los componentes del reloj propiamente dicho, y las estructuras involucradas en la transmisión o salidas de la información del reloj. Ninguna de ellas se conocen.

## INGESTION DE ALIMENTO

### La conducta de ingestión involucra más que la alimentación

El consumo de alimento es un proceso muy complejo que involucra diversos mecanismos y eventos para generar el aporte de nutrientes para la supervivencia y desarrollo del individuo. La conducta de ingestión está compuesta de varios eventos que involucran la búsqueda, el consumo y asimilación del alimento. Estos eventos están influidos por la alternancia hambre-saciedad (Berthoud. 2002; Kalra y cols. 1999).

La conducta de ingestión se divide en diferentes fases usando criterios conductuales y neurobiológicos (Watts. 2000). Podemos encontrar una *fase de iniciación* donde el valor incentivo del alimento y/o el estado interno del individuo genera una atención hacia el alimento. También la sola presencia de un estímulo directo del alimento, tales como la vista y el olor, pueden ser suficientes para iniciar la conducta de ingestión sin ninguna influencia del estado metabólico.

Por otro lado, en ausencia de estímulos directos del alimento, el estado metabólico puede ser suficiente para evocar el recuerdo de la presentación del alimento, una vez generada la fase de inicio el individuo entra en la *fase de obtención*. Durante esta fase se involucra un intenso y prolongado forrajeo. Tal conducta requiere planeación, aprendizaje y memoria y depende de procesos cognoscitivos corticales. La *fase consumatoria* es cuando el alimento finalmente se ingiere el alimento desencadenando el evento de digestión.

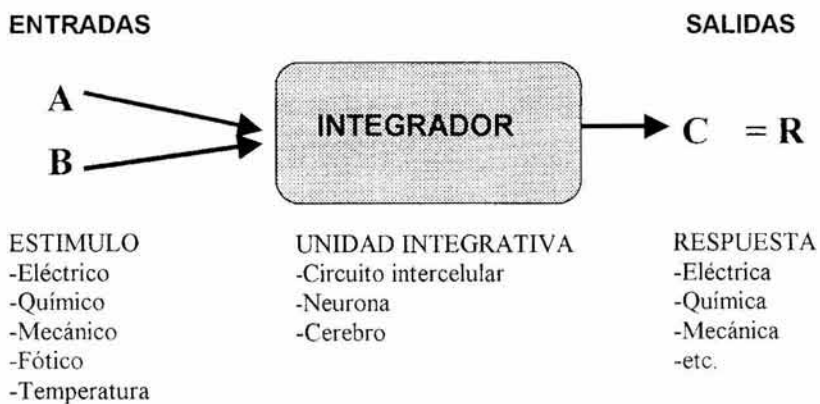
Durante la alimentación, los humanos constantemente comparan la sensación actual con la esperada de cada componente individual del alimento. Por otro lado, los mecanismos de saciedad entran en acción dirigidos a detener el consumo de alimento. Sin embargo, la terminación de la alimentación no finaliza con el episodio conductual de ingesta. Información importante en cuanto a las consecuencias absortivas y postabsortivas son acumulados después de la terminación de la comida y se guardan en una memoria asociativa para un uso futuro. Esta es una conducta en secuencia que sigue a la saciedad, sugiriendo una extensa comunicación entre sistemas neurológicos de control y diferentes conductas (Berthoud. 2002; Strubbe. 1994).

## El modelo de la entrada-integración-salida y sus limitaciones

Los mecanismos de control neural son típicamente observados como mecanismos de "entrada-integración-salida". Para el control de la conducta de alimentación parece ser obvio que el olor y el sabor de una deliciosa cazuela de frijoles es por ejemplo un entrada al sistema y que el tomar una cucharada y llevarla a la boca e ingerirla es un ejemplo de una salida del sistema. Esto es menos obvio que el sistema integrativo, que es por definición: la integración de paquetes de información. El sabor de los frijoles representa la combinación sensorial subjetiva del gusto, olor, temperatura y tal vez la textura, como un ejemplo de integración (Schwartz y cols. 2000).

Uno de los problemas es la identificación del límite entre los tres componentes de este modelo. ¿cuándo inicia la integración de la información y cuando se transforma en información de salida? (Fig. 6).

Otro problema con el modelo de entrada-integración-salida es que se asume que es lineal y que por lo tanto queda implícita la suposición de un integrador central (tipificado por el hipotálamo como centro teórico de la alimentación) que genera todas las salidas. ¿Es ésta la última estructura involucrada en la toma de decisión entre comer y no comer? (Cowley y cols. 1999; Berthoud. 2002).



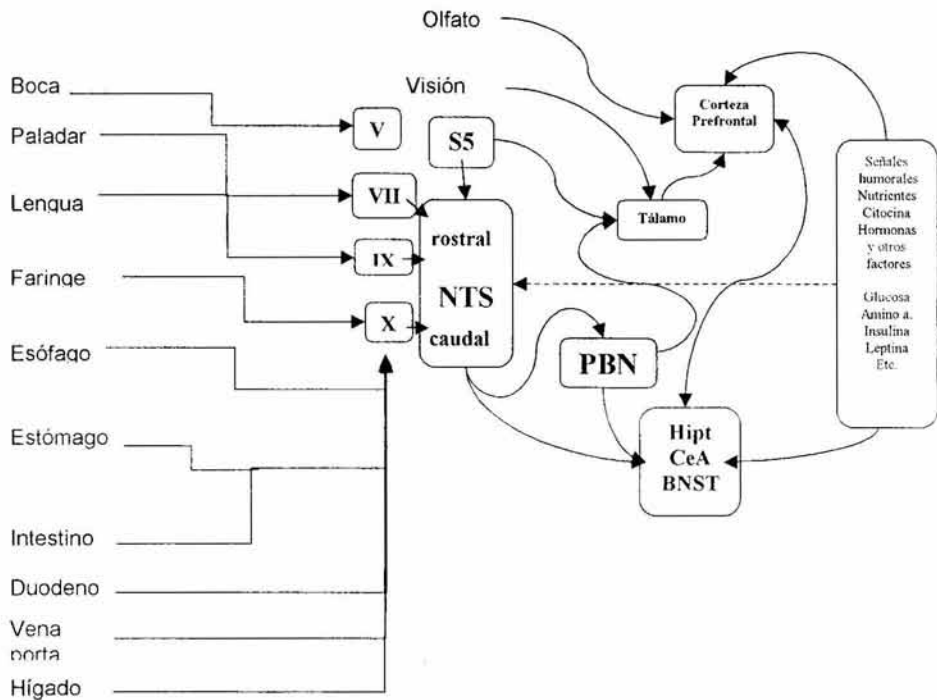
**Figura 6.** Sistema lineal de integración hipotético. Donde A y B son señales generadas por un mismo estímulo o varios que convergen en un integrador generando una nueva señal (C) la cual puede tomarse como una respuesta (Modificada de Berthoud 2000 ).

### **Clasificación de la entrada de información.**

Los sistemas de entrada mediante los cuales se integra la información usada por el SNC para generar respuestas significativas concernientes al consumo de alimento y control del peso corporal tienen varias clasificaciones. Estos estímulos de entrada de información incluyen aspectos visuales, olfativos, auditivos y táctiles, considerándose que éstos son los de primer contacto entre el individuo y el alimento. Posteriormente se encuentran los estímulos generados por el alimento después de la ingestión, que pueden ser divididos en estímulos generados en cada uno de los segmentos del canal alimenticio y son algunas veces agrupados en pregástricos (sabor, textura, temperatura), gástricos (distensión, secreción, motilidad) y postgástricos, o estímulos postabsortivos. Los estímulos postabsortivos incluyen: 1) mecanismos de transporte de nutrientes de la mucosa intestinal y los asociados a la liberación local de hormonas que actúan en la circulación o en nervios sensoriales viscerales; 2) nutrientes, metabolitos y hormonas actuando en sensores del espacio hepático portal; 3) pasos de procesamiento metabólico y otros asociados potencialmente a mensajeros locales y hormonas que actúan en el hígado (glucagon) y 4) metabolitos, hormonas y otros factores originados de varios tejidos y que son liberados a la sangre o linfa y que actúan haciendo responder a sensores directos en el cerebro (glucosa, aminoácidos, insulina y leptina) (Beck, 2001) (Fig. 7).

Otros estímulos se han categorizado por su efecto, es decir, orexigénico o anti-orexigénico. Por ejemplo las entradas del gusto a sabor dulce es típicamente positivo (reforzante) señal que incrementa la alimentación, mientras que otros estímulos tales como la colecitocinina (CCK) son consideradas como de retroalimentación negativa o señales de saciedad que suprimen la ingestión (Attoub y cols. 2001).

Finalmente, las entradas pueden ser divididas de acuerdo al tipo de información: las que son derivadas directamente de estímulos internos o externos. Estímulos generados por el alimento y los generados del metabolismo como acciones hormonales así como el componente hedónico del alimento.

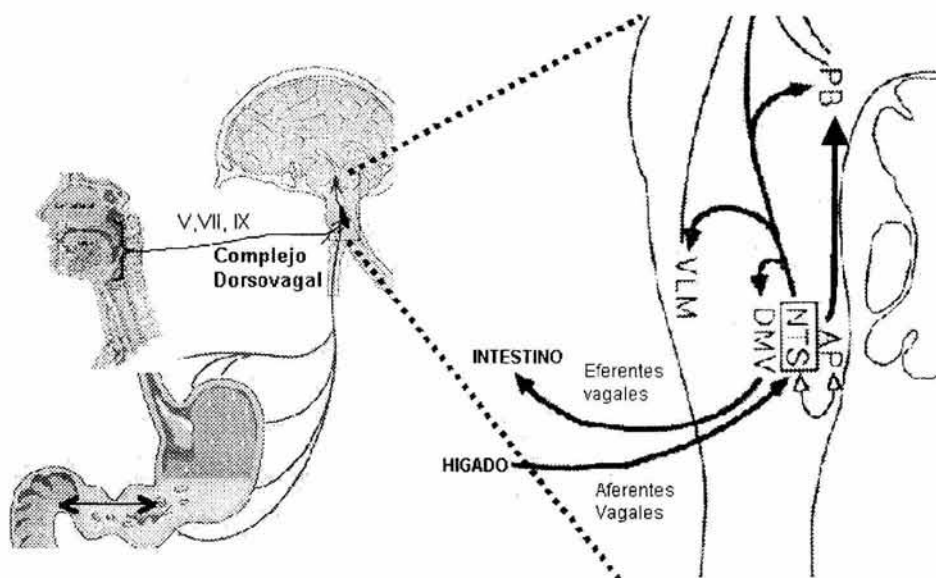


**Figura 7.** Entradas viscerales sensoriales al sistema nervioso central relevantes para el control del consumo de alimento y balance energético. A todo lo largo del tubo digestivo, se localiza una gran cantidad de mecano y quimiorreceptores que transmiten señales relacionadas al alimento a través de aferentes viscerales primarias al tallo cerebral, como los nervios trigémino (V), facial (VII), glossofaríngeo (IX) y el nervio vago (X).  
 Abreviaciones: BST, núcleo del lecho de la estria terminales; CeA, núcleo central de la amígdala; Hyp, hipotálamo; NTS, núcleo del tracto solitario; PBN, núcleo parabraquial; S5, núcleo sensitivo principal de trigémino. (Modificada de Berthoud 2000.)

### **Sustrato neuroanatómico involucrado en la regulación del consumo de alimento.**

La integración de la homeostasis energética involucra múltiples áreas cerebrales fuera del hipotálamo. Por ejemplo la información neuronal proveniente de la región orofaríngea y del tracto gastrointestinal relacionada a la saciedad y el hambre converge al núcleo del tracto solitario (NTS) en el tallo cerebral, estas señales llegan conducidas por los nervios craneales trigémino (V) conducción somatosensorial, tacto, temperatura; facial (VII) inerva el paladar y por el nervio accesorio o cuerda del tímpano conduce la información de los 2/3 anteriores de la lengua principalmente los sabores amargo, salado y ácido; glossofaríngeo (IX) inerva el 1/3 posterior de la lengua conduce el sabor amargo y del nervio vago que conduce la información directa del tracto gastrointestinal (*Fig. 8*). Estas señales incluyen sabor, distensión gástrica y niveles de glucosa en la vena porta entre otras (Konturek y cols. 2004). El péptido gastrointestinal colecistocinina (CCK), se libera por distensión gástrica. El aumento de CCK genera una señal al NTS vía el receptor CCK<sub>A</sub> en las terminales sensitivas del nervio vago (Moriarty y cols. 1997). Las neuronas del NTS son neuronas glucosensitivas y otras sintetizan el péptido proopiomelanocortina (POMC); contienen receptores para leptina y receptores a la melanocortina (MC4-R). La administración de agonistas de MC4-R dentro del cuarto ventrículo (adyacente al NTS) así como en el ventrículo lateral en el hipotálamo generan una respuesta de saciedad similar a la inducida por el alimento, indicando que las neuronas del NTS y el hipotálamo pueden procesar información relacionada a la homeostasis energética (Laskiewicz y cols. 2003). El NTS envía una densa proyección al núcleo lateral del hipotálamo (LH) a través de una vía indirecta, con relevo en el núcleo parabraquial (PBN) que puede ser particularmente importante en la regulación de la función de las neuronas orexigénicas y glucosensibles del LH (Berthoud y Neuhuber. 2000). Por otro lado, también en el tallo cerebral se encuentra el área postrema (AP) la cual forma parte del complejo vagal y está especializada en recibir la entrada de información de tipo humoral ya que carece de barrera hematoencefálica y proyecta hacia el NTS así como al PBN. (Broberger y Hökefelt. 2001). Otro ejemplo de impulsos distantes son

las fibras que contienen 5-HT que se originan de los núcleos dorsal y medial del rafe en el tallo cerebral caudal y terminan en neuronas del núcleo arqueado (ARC) y paraventricular hipotálamico (PVN). La 5-HT tiene un poderoso efecto anorexigénico y termogénico y es un blanco para varias drogas antiobésicas de acción central (Leibowitz y Alexander, 1998).



**Figura 8.** Vías aferentes y eferentes que llegan al complejo vagal, el cual se encuentra constituido por el Núcleo del tracto solitario (NTS), el área postrema (AP) y el núcleo dorsal motor del vago (DMV). El NTS y el AP proyectan hacia el núcleo parabraquial (PBN).

Las estructuras del tallo cerebral son las que participan en las entradas de tipo sensorial-vísceral y vías de salidas de tipo motor. En el tallo cerebral se encuentra una gran cantidad de núcleos pero los que han tomado mayor importancia en la integración de la información vísceral relacionada con la

ingestión de alimento y balance energético han sido los que forman parte del complejo del vago es decir el NTS, el AP y DMX (Berthoud y Neuhuber. 2000).

El NTS y el AP se consideran sitios de relevo de la información de tipo visceral. La información humoral llega al NTS a través de proyecciones del AP al NTS (Ritter y cols. 2000). Además, el NTS es una estructura que recibe proyecciones de tipo neural directamente del tracto gastrointestinal, como el sistema portal hepático. También recibe información directa de la región orofaríngea principalmente de sabor y consistencia del alimento. Esta información es transmitida al PBN directamente y también hacia otras áreas como al hipotálamo que participan en la regulación del consumo de alimento y balance energético (Berthoud. 2000).

El PBN se encuentra localizado en la parte posterior del tallo cerebral y es considerado como un área de integración general de eventos sensoriales, incluido el sabor (Spector. 1995) e información visceral mecánica y química (Baird y cols. 2001), a través proyecciones recíprocas de varias áreas del tallo cerebral, del diencefalo y del cerebro anterior. Por lo tanto, el PBN se considera una interfase entre el control de los reflejos medulares, la conducta y la regulación de sistema autónomo (Saper. 1995).

Lo relevante para el control del consumo de alimento y la homeostasis energética es que el núcleo PBN medial y lateral reciben información del sabor e información sensorial de tipo visceral provenientes de la porción rostral y caudal del NTS respectivamente. Estas áreas del PBN proyectan a la amígdala y varios núcleos hipotálamicos tales como el núcleo paraventricular (PVN), arqueado (ARC), área preóptica (APO), ventromedial (VMH), lateral (LH) (Saper. 1995).

Por otro lado y tomando en cuenta que la glucosa es el metabolito de gran importancia como fuente de energía para la supervivencia y funcionamiento celular. Ésta se obtiene principalmente del alimento, lógicamente después de un elaborado proceso digestivo y metabólico. Los niveles de glucosa en el torrente sanguíneo deben mantenerse en rangos constantes, para asegurar la llegada de este energético a todo el organismo, independientemente de la cantidad, calidad y la frecuencia del alimento.



La utilización de la glucosa y otros metabolitos energéticos generan señales que son usadas por el sistema nervioso central (SNC) para controlar el consumo de alimento. Los mecanismos que integran la información de los diferentes procesos metabólicos no son bien conocidos a la fecha.

Sin embargo, estudios utilizando registros de actividad eléctrica neuronal, lesiones electrolíticas y químicas, así como Inmunohistoquímica, especialmente la expresión de proteína c-Fos como un marcador de actividad neuronal, han permitido identificar regiones cerebrales involucradas en la integración y regulación del metabolismo energético (Sakurai y cols. 1998). En especial se han identificado estructuras hipotálamicas y del tallo cerebral. Los sitios hipotálamicos son los núcleos: VMH, LH, dorsomedial (DMH), ARC y PVN, los cuales contienen mecanismos neurales que regulan la conducta de alimentación y el balance energético (Schwartz y cols. 2000). Las lesiones en estos núcleos, a excepción del LH, generan un aumento marcado del apetito y por ende aumento del peso corporal (Berthoud. 2000).

Durante la década pasada se exploraron algunos mediadores específicos así como la red neuronal que regula el consumo de alimento. Importantes avances sobre los mecanismos hipotálamicos incluyen la caracterización de nuevos péptidos así como sus receptores.

### **Hipotálamo.**

El hipotálamo del mamífero desde el punto de vista histológico consiste en más de 40 núcleos y áreas distintos, ya que muchos de los núcleos pueden ser subdivididos en subnúcleos (Simerly. 1995). La zona medial o zona periventricular está involucrada con la detección de señales circulantes del líquido cefalorraquídeo (LCR) y en la organización y control de la respuesta endocrina. La zona medial está compuesta principalmente por varios núcleos tales como el dorsomedial, ventromedial, área anterior del hipotálamo, núcleo preóptico medial. Todos estos reciben entradas sensoriales y se interconectan densamente con el resto del hipotálamo. La zona lateral es la más caracterizada por su clara definición de núcleos y está atravesada por el tracto medial del cerebro anterior y

el fórnix. En esta área se encuentran el área lateral preóptica, el núcleo lateral anterior, el núcleo perifornical, y los núcleos premamilares en la parte posterior (Simerly, 1995).

Recientemente se ha hecho una definición neurohistoquímica de grupos celulares con relevancia para el consumo de alimento. La zona lateral tiene un sistema de comunicación intra y extra hipotálmica que establece una interfase con otras áreas hipotálamicas mediales y con áreas cortico/limbicas involucradas con la activación asociada con la expresión de conductas motivadas tales como el alimento, ejecución de la conducta y aspectos cognitivos. Proyecciones descendentes se ven involucradas en la ejecución de funciones motoras esqueléticas y autonómicas. El núcleo paraventricular del hipotálamo representa un microcosmos dentro del hipotálamo, formando una interfase entre subnúcleos con los tres sistemas efectores, el endocrino (grupo magnocelular), autonómico y conductual (grupo parvicelular).

A principios de los años 1940s, los estudios de lesión o estimulación de núcleos específicos en el hipotálamo revelaron alteraciones en la conducta de alimentación. Con relación a esto algunos núcleos fueron designados como centros de "alimentación" o "saciedad", pero con la caracterización posterior de redes neuronales y de la distribución de sus conexiones, la designación de estas estructuras como "centros" ha sido remplazada por la de núcleos que expresan neurotransmisores específicos, que generan o modulan efectos particulares sobre el consumo de alimento y/o del metabolismo energético generados por señales del estado nutricional.

## **Principales núcleos hipotálamicos involucrados en la regulación del balance energético y del consumo de alimento.**

El núcleo ARC, está situado en la base del tercer ventrículo, inmediatamente arriba de la eminencia media. Se encuentra compuesto por grupos neuronales en la región tuberal del hipotálamo y aparentemente se encuentra dividido en varios dominios funcionales. Por ejemplo, existen grupos neuronales que sintetizan el neuropéptido Y (NPY) y la proteína relacionada al gen *agouti* (AGRP), ambos estimuladores potentes del consumo de alimento y que se co-localizan (Broberger y cols. 1998). También contiene poblaciones neuronales que sintetizan proopiomelanocortina (POMC)(Broberger. 1999) y el transcrito relacionado a cocaína y anfetaminas (CART) los cuales inducen una respuesta anorexigénica (Elias y cols. 1998). El ARC también tiene extensas conexiones recíprocas con otras regiones hipotálamicas, incluyendo el PVN, el DMH, el VMH, y el LH (Simerly. 1995). Por otra parte el sistema capilar de la eminencia media no presenta barrera hemato-encefálica, de tal forma que las neuronas del ARC son relativamente accesibles a los mensajeros circulantes incluyendo la leptina e insulina.

El PVN está situado en la parte superior del tercer ventrículo en el hipotálamo anterior. Este núcleo es un centro integrador sobre el que convergen muchas vías neuronales que influyen sobre la homeostasis energética (Swanson y Sawchenko. 1980). Este núcleo se encuentra ricamente innervado por neuronas del núcleo ARC que contienen NPY/AGRP y POMC/CART, además de neuronas de orexina del LH. El PVN es rico en terminales que contienen neurotransmisores que modifican el apetito. Entre éstas se incluyen NPY, la hormona estimuladora del melanocito alfa ( $\alpha$ -MSH), serotonina (5-HT), galanina, noradrenalina y péptidos opioides.

El PVN es particularmente sensible al efecto de estos neurotransmisores sobre la modulación de la alimentación y la liberación de energía. El factor liberador de corticotropina (CRF) es expresado por neuronas en el PVN que proyectan a la eminencia media y pueden actuar inhibiendo a las neuronas del

NPY de la proyección ARC-PVN formándose así un asa de retroalimentación negativa (Swanson y Sawchenko. 1980). Las principales conexiones del PVN hacia la parte posterior son a diferentes regiones del mesencéfalo incluyendo la sustancia gris periacueductal , al núcleo del rafe dorsal, locus coeruleus, núcleos pedúnculo-pontinos, PBN, núcleo dorsal del vago, NTS, y la columna intermedio lateral de la médula espinal (Cechetto y Saper. 1988). Esta es una de las cinco únicas áreas del SNC que proyectan directamente a neuronas pre-ganglionares del sistema simpático y parasimpático que inervan el páncreas (Jansen y cols. 1997).

El VMH fue considerado por mucho tiempo como el "centro de la saciedad" (Brobeck. 1946 citado en Powley y cols. 1980). La estimulación del VMH inhibe el consumo de alimento y, al contrario, una lesión en esta región causa una sobre alimentación y en consecuencia un aumento de peso. Recientemente, se han demostrado una alta abundancia de receptores a leptina en neuronas del VMH, particularmente de la región dorsal y algunas de éstas proyectan a la zona subparaventricular (Elias y cols. 1998). Se presume que este núcleo puede ser un importante blanco para la leptina circulante, y lo sitúa como un núcleo relacionado con la regulación de la adiposidad.

El VMH recibe señales de varios sitios como la amígdala, el LH y de muchos núcleos del hipotálamo medial, de la misma manera recibe información proveniente de los núcleos PBN y del NTS (Fulwiler y Saper. 1985). Las proyecciones eferentes del VMH son hacia el área gris periacueductal y otros núcleos reticulares del tallo cerebral. También proyecta importantemente hacia los núcleos del hipotálamo medial evitando la zona periventricular y lateral (Saper y cols. 2000); en el cerebro anterior, proyecta hacia la zona incerta, los núcleos talámicos mediales, la amígdala, el núcleo accumbens y varias áreas de la corteza prefrontal.

El DMH está localizado inmediatamente dorsal al VMH tiene extensas conexiones con núcleos hipotálamicos tales como el PVN, LH y el tallo cerebral. El VMH y el LH no tienen conexiones directas, sólo indirectas a través del DHM y el PVN. El PVN y el DMH pueden cooperar funcionalmente como una unidad, para

inicio y mantenimiento del consumo de alimento. El DMH contiene receptores a insulina, leptina y algunas neuronas del sistema ARC-NPY/AGRP que terminan en este núcleo. Se ha considerado al DMH como una interfase entre el VMH y el LH, siendo un núcleo de integración y distribución de información entre ambas estructuras, y teniendo, por lo tanto, gran importancia funcional ya que esta información puede ser enviada a muchas otras parte del SNC, tales como, el tallo cerebral o hacia el cerebro anterior.

Las lesiones generadas por el paso de corriente eléctrica (electrolíticas) de este núcleo generan alteraciones en la conducta de alimentación menos dramáticas que las lesiones del VMH. Tal como en otros sitios hipotálamicos, la microinyección de varias señales orexigénicas en el DMH promueven el hambre (Bernardis y Bellinger. 1987).

Una función crucial de las neuronas de este núcleo es la que se observa cuando la infusión de NPY inhibe el consumo de alimento generado por una inyección de leptina y aumenta la expresión de proteína c-Fos, un marcador de actividad neuronal (Yokosuka y cols. 1998). Estos resultados sugieren que el sitio de interacción entre el NPY y la leptina reside en el DMH y puede representar un componente del circuito involucrado en la regulación de la inhibición del consumo de alimento por la leptina (Yokosuka y cols. 1998). Las aferencias que este núcleo recibe son del hipotálamo principalmente del Arc, VMH, PVN y del LH.

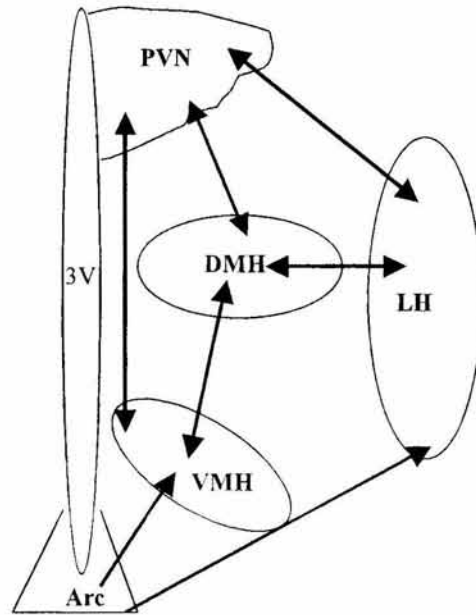
El DMH, al igual que el PVN y el LH, también recibe aferencias provenientes de varias áreas del tallo cerebral, pero principalmente del PBN y el NTS (Thompson y Swanson. 1998). De la misma manera, recibe información del cerebro anterior incluyendo proyecciones del subiculum ventral (complejo hipocampal), corteza prefrontal infralímbica (corteza viceromotora), septum lateral y núcleo de la estria terminalis (Thompson y Swanson. 1998).

El LH es un área vagamente definida, donde la población difusa de neuronas incluye subpoblaciones definidas que expresan principalmente orexinas A y B, así como hormona concentradora de melanina (MCH) (Bittencourt y Elias. 1998). La inyección intracerebroventricular de MCH incrementa considerablemente el consumo de alimento (Tritos y cols. 1998), de tal manera que se piensa que la

MCH está involucrada en el desarrollo de la obesidad y la resistencia al efecto de la insulina (Ludwig y cols. 2001); la inyección de orexina A dentro del ventrículo cerebral también incrementa el consumo de alimento (Sakurai y cols. 1998).

Las terminales de NPY son abundantes en el LH y principalmente en la zona perifornical. Las terminales neuronales de NPY que se encuentran en contacto con células orexigénicas y MCH provienen del núcleo Arc, la zona perifornical contiene una alta densidad de receptores  $Y_5$  los cuales median el efecto estimulador del apetito del NPY (Schaffhauser y cols. 1997). El LH fue visto por mucho tiempo como el "centro del hambre". Ya que la estimulación de este núcleo incrementa el consumo de alimento, y cuando se destruye se genera una disminución en el consumo de alimento, y causando una importante pérdida de peso (Brobek. 1946 citado en Kalra y cols. 1999).

Todos los núcleos mencionados anteriormente también contienen gran número de neuronas glucoreceptivas que responden a los niveles de glucosa circulante. Estas neuronas han sido clasificadas como glucostáticas y glucosensibles, siendo las últimas quienes responden a una disminución en los niveles de glucosa extracelular y se encuentran involucradas con las señales de consumo de alimento. Las neuronas glucostáticas por el contrario, se activan cuando detectan un aumento en los niveles extracelulares de glucosa por lo que se han considerado parte del sistema que regula la saciedad (Oomura. 1984) (*Fig. 9*).



**Figura 9.** Conexiones intra hipotálamicas de los principales núcleos involucrados en el control de balance energético y consumo de alimento. DMH: dorsomedial; VMH: ventromedial; LH: lateral hipotálamico; Arc: arqueado; PVN: paraventricular; 3V tercer ventrículo.

### **Estructuras del sistema límbico involucradas en la conducta de alimentación.**

La conducta de ingestión se encuentra controlada por varios sistemas neuronales en el sistema nervioso central. Entre estos sistemas podemos encontrar el sistema mesocorticolímbico. Este sistema se compone de estructuras como el complejo amigdalino, la corteza prefrontal (CPF), núcleo accumbens (Acc), el núcleo de la estria terminalis (NBST), el septum lateral (SL) y el área tegmental ventral (VTA) entre otros. Este sistema se encuentra involucrado principalmente en la disociación y evaluación de las propiedades hedónicas "liking" y el componente motivacional "wanting" del alimento. Uno de los aspectos

importantes en la conducta de alimentación es el valor reforzante que genera el alimento, proceso en el cual se encuentra involucrada principalmente la amígdala, estructuras del cerebro anterior que reciben información sensorial (olfato y gusto) proveniente del tallo cerebral y de la corteza, así como señales fisiológicas relacionadas con el hambre y saciedad (Ahn y Phillips. 2002).

La amígdala es una estructura que anatómicamente se ha dividido principalmente en tres subnúcleos los cuales son la amígdala medial (MeA), la central (CeA) y la basolateral (BLA); la mayoría de los estudios del circuito funcional de la amígdala se han enfocado a la CeA y a la BLA. Ambos subnúcleos reciben información de diferentes áreas. Por ejemplo, la BLA recibe información del tálamo y de diferentes regiones corticales, como la corteza auditiva, la somato sensorial y la corteza visual (McDonald. 1991).

La información olfativa llega a la MeA y a la BLA a través de conexiones provenientes de la corteza piriforme. La BLA también recibe conexiones de áreas polisensoriales, incluyendo la corteza prefrontal, entorrinal y corteza del hipocampo. Estas evidencias indican que la BLA juega un importante papel en la formación de asociaciones entre estímulos sensoriales específicos y eventos biológicos significantes generando un balance emocional y motivacional (Nader y cols. 2000; McDonald. 2003). La CeA recibe información de tipo gustativo directamente del NTS y también indirecta desde el PBN (Norgren. 1976); por otro lado, la CeA manda información al Acc así como al VTA y la sustancia Negra. La BLA manda proyecciones topográficamente organizadas al LH (Petrovich y cols. 2002), conectado anatómicamente en el hipotálamo con el circuito neural involucrado en el control de la conducta de alimentación (Elmqvist. 1998).

La BLA<sup>4</sup>, al igual que la CeA, proyecta hacia el Acc así como a la CPF (McDonald. 1991) la proyecciones al núcleo Acc en su porción central que se sugiere probablemente esté involucrado con el reforzamiento de un nuevo aprendizaje.

La relación entre las funciones de la amígdala y el hipotálamo en el control de la conducta de alimentación es importante para la integración y respuesta a estímulos de olor y sabor, estímulos motivacionales, y aprendizaje (Olds. 1976;



Petrovich y cols. 2002). También, se ha demostrado que los núcleos de la amígdala, y en especial la CeA, tienen neuronas glucosensitivas, además de recibir información gastrointestinal y participar con otras estructuras del sistema límbico para generar un estado motivacional. Por lo tanto se ha sugerido que la amígdala puede ser un intermediario anatómico y funcional en algunos de los procesos de la conducta de ingestión (Mei y Lucchini. 1992)

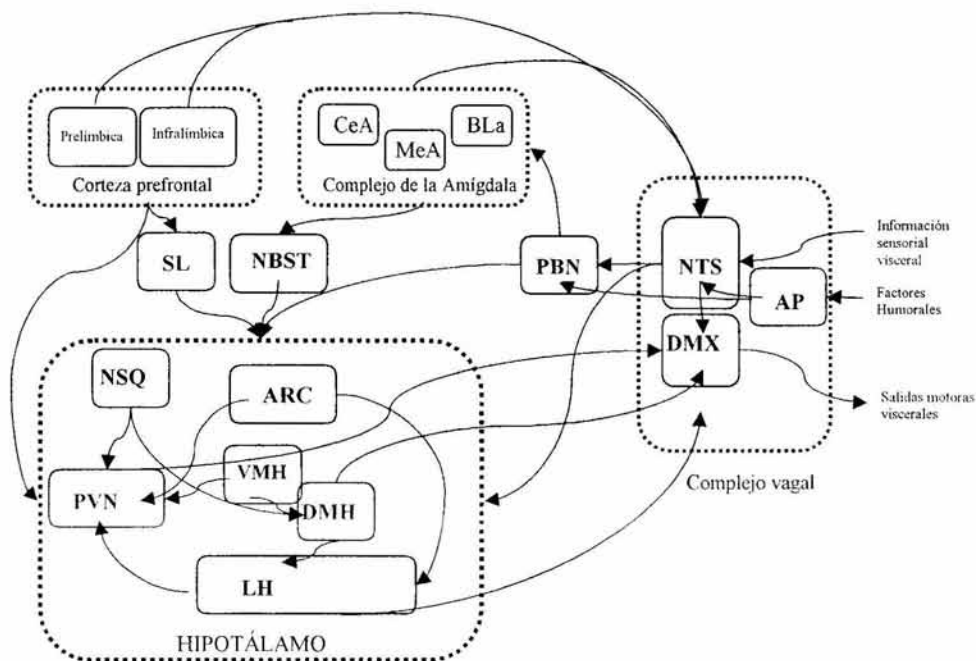
El NBST es el centro de relevo entre la amígdala y el hipotálamo y recibe fibras de ambas partes (Alheid. 1995), y el NBST, al igual que la CeA recibe información directa del NTS y el complejo parabraquial (Riche y cols. 1990).

En la corteza prefrontal se pueden reconocer principalmente dos áreas, la corteza infralímbica que se encuentra en la parte más medial y la corteza prelímbica. La corteza prelímbica recibe proyecciones de diversas regiones límbicas, incluyendo el cíngulo, y la corteza entorrinal (Rolls. 2004). La corteza infralímbica recibe proyecciones de la región CA1 del hipocampo también de la corteza prelímbica (Hurley y cols. 1991), y aferencias de otras estructuras de sistema nervioso autónomo, como el PBN ( Saper. 1995). La corteza prelímbica proyecta a regiones corticales límbicas así como proyecciones descendentes al hipotálamo, área gris periacueductal, PBN y NTS (Hurley y cols. 1991). La corteza infralímbica tiene proyecciones a áreas límbicas así como proyecciones a la CeA, NBST, LH, DMH, área gris periacueductal, PBN, NTS, medula espinal (lamina I) y la columna simpática preganglionar (Hurley y cols. 1991).

La corteza prefrontal contiene neuronas que responden al sabor y neuronas que responden al olor, siendo dos estímulos asociados con el reforzamiento. También responde a la textura del alimento a través de las entradas somato-sensoriales. Todas estas evidencias muestran que la corteza prefrontal está involucrada en respuestas al alimento, así como con la conducta motivacional (Rolls. 2004) (*Fig. 10*).

El hipocampo es una estructura que se encuentra conectada con los circuitos involucrados en el control de la conducta ingestiva. El hipotálamo y la amígdala se encuentran conectados con la porción ventral del hipocampo, también el hipocampo es considerado como un relevo entre los núcleos talámicos y el

séptum lateral, además recibe información de el tallo cerebral a través de vías multisinápticas a las porciones ventral y dorsal. Estas conexiones entre el hipocampo y las áreas involucradas en control del balance energético se han tomado en cuenta recientemente por varios aspectos de la conducta de ingestión, particularmente la representación de la memoria y aprendizaje asociativo relacionado a la selección del alimento (Ishikawa y Nakamura. 2003).



**Figura 10.** sustrato neural involucrado en el control del consumo de alimento y balance energético. Diagrama esquemático simplificado donde se encuentran el complejo vagal, el complejo de la amígdala, el hipotálamo y áreas corticales. Durante el fenómeno de alimentación se generan una gran cantidad de eventos conductuales y estímulos viscerales internos que envían información al SNC básicamente de dos maneras en forma neural y humoral. Esta información se procesa e integra en diferentes áreas del cerebro para después generar una respuesta. Las flechas indican la dirección de la proyección. Las bifurcaciones no necesariamente indican axones colaterales. Abreviaciones NBST, núcleo del lecho de la estria terminalis; SL, núcleo lateral del septo; CeA, núcleo central de la amígdala; BLA, núcleo basolateral de la amígdala; MeA, núcleo medial de la amígdala; ARC, núcleo arcuato del hipotálamo; PVN, núcleo paraventricular; NSQ, núcleo supraquiasmático; VMH, núcleo ventromedial; DMH, núcleo dorsomedial; LH lateral; PBN, núcleo parabraquial; NTS, núcleo del tracto solitario; DMX, núcleo dorsal motor del vago; AP, área postrema. (Modificada de Berthoud 2000)

## **GEN *c-fos* Y OTROS GENES DE EXPRESIÓN INMEDIATA**

La morfología única y propiedades excitables de las células nerviosas las dota con propiedades especializadas que permiten la recepción, transmisión, y almacenamiento de información.

Es conocido que las señales transinápticas causan una respuesta rápida en las neuronas que puede ocurrir con un rango de tiempo de milisegundos (como la apertura de canales), de segundos y minutos (eventos mediados por segundos mensajeros). Estudios recientes revelan que la activación transináptica también desarrolla respuestas lentas, a largo plazo en las neuronas que son relacionadas con la inducción de expresión de genes (Morgan y Curran. 1991).

La expresión neuronal de genes puede ser modulada por neurotransmisores, actividad eléctrica, o factores neurotróficos y todos estos pueden jugar un importante papel en el desarrollo y la plasticidad adaptativa del sistema nervioso. Algunas de las consecuencias de la estimulación transináptica pueden generar cambios en el desarrollo neuronal o densidad sináptica así como cambios en el nivel de expresión de los neurotransmisores, receptores, canales iónicos y en los genes que son capaces de responder a esta estimulación (Montarolo y cols. 1986). Estos genes caen dentro de dos clases generales: genes cuya transcripción es activada en minutos después de estimulación (Morgan y Curran. 1991), denominados genes de expresión inmediata (IEGs), y los genes de expresión tardía (Klarsfeld y cols. 1989), cuya expresión es inducida (o reprimida) más lentamente en un rango de tiempo de horas, vía un mecanismo que es generalmente dependiente de síntesis de proteína de novo.

La diferencia entre los IEGs y los genes de expresión tardía no siempre es clara. Se ha llevado a proponer que los IEGs codifican proteínas reguladoras de la expresión de genes de respuesta tardía. El producto de los genes de respuesta tardía se piensa que sirve para funciones más específicas en la respuesta neuronal. Se ha mostrado que muchos IEGs codifican factores de transcripción para programas específicos de genes de expresión tardía, la inducción de estas

proteínas puede, por lo tanto, mediar muchas de las repuestas a largo plazo de las señales transináptica de las neuronas (Sheng y Greenberg. 1990).

Los proto-oncogenes *c-fos* y *c-myc* fueron entre los primeros IEGs identificados (Greenberg. 1999) y son los miembros mas representativos de esta familia de genes.

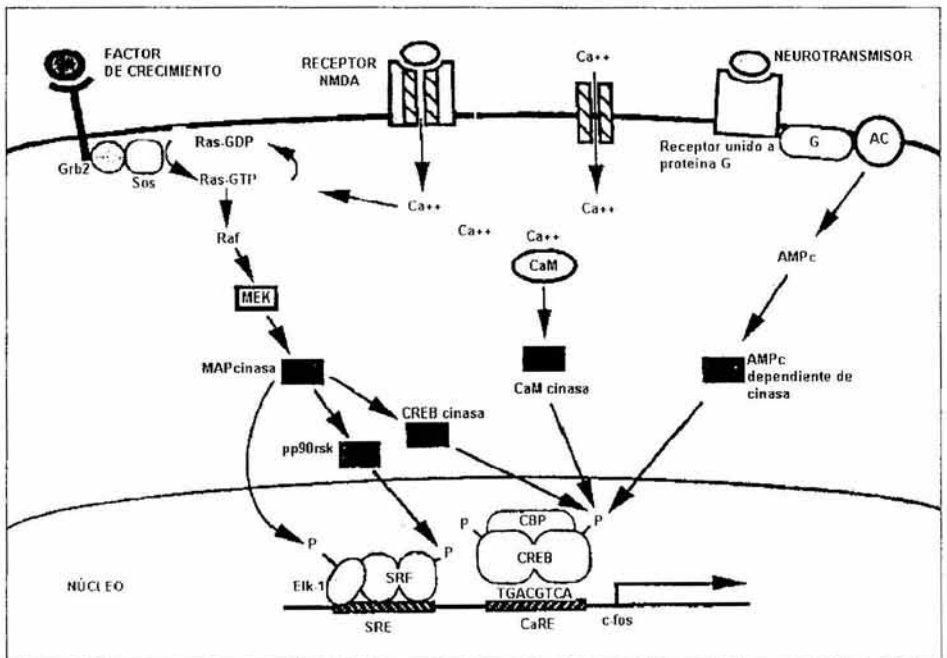
### **Vías de señalamiento neural que regulan la expresión de *c-fos***

- ❖ El neurotransmisor activa receptores unidos a proteínas Gs regulan la actividad de la adenilato ciclasa (AC), la cual aumenta los niveles de AMPc. El incremento del AMPc activa a la proteína cinasa dependiente de AMPc (PK-A), esta proteína fosforila al elemento de unión que responde al AMPc (CREB) en la serina 133 (Ser<sup>133</sup>), por lo que CREB en su forma activada induce la transcripción de *c-fos* a nivel de la región Ca/CRE.
- ❖ La activación de los receptores ionotrópicos, tales como los receptores NMDA, permiten una entrada de Ca<sup>2+</sup> a la célula. El Ca<sup>2+</sup> se une a la calmodulina (CaM) formando el complejo Ca/CaM el cual activa la proteína cinasa dependiente de Ca/CaM (CaM cinasa). Esta proteína fosforila a CREB en la Ser<sup>133</sup> para activar su función trans-activadora, generando la inducción de la transcripción de *c-fos* a través de Ca/CRE.

Ambas vías de señalización vía AMPc y Ca<sup>2+</sup> convergen sobre CREB para regular la transcripción dependiente de Ca/CRE. Adicionalmente a CREB, otros factores relacionados pueden heterodimerizar con CREB, tal como el factor de transcripción 1 (ATF-1), que pueden regular la transcripción de *c-fos* vía Ca/CRE en respuesta a estímulos específicos o en tipos específicos de células. Otro factor de coactivación, es la proteína de unión de CREB (CBP) que puede unirse a la Ser<sup>133</sup> fosforilando a CREB y aumentar la transcripción mediada por Ca/CRE.

- ❖ Factores séricos o de crecimiento activan a un receptor cinasa de tirosina, generando la activación de la proteína Ras unida a GTP (Ras).

La entrada de  $\text{Ca}^{++}$  vía receptores L-VSCCs o NMDA pueden también activar a Ras. Una vez activada Ras se inicia una cascada de proteínas cinasa que secuencialmente fosforila y activa a c-Raf, MEK, MAPcinasa y  $\text{pp}^{90\text{rsk}}$ . MAPcinasa y  $\text{pp}^{90\text{rsk}}$  pueden fosforilar y activar EIK-1 y SRF respectivamente, induciendo la transcripción de c-fos vía SER. La señalización por Ras, probablemente a través de MAP cinasa, puede también activar CREB cinasa que puede fosforilar a CREB e inducir la transcripción de c-fos a través de Ca/CRE (Kornhauser y cols. 1996) (Fig. 11).



**Figura 11.** Vías de señalamiento neural que regulan la expresión de c-fos (modificada de Kornhauser y cols. 1996).

### **Inducción de proteína c-Fos en el sistema nervioso central por el alimento**

La detección inmunohistoquímica de la proteína c-Fos, la cual es el resultado final de la transcripción del RNAm *c-fos* en el SNC, se ha considerado como un marcador de activación neuronal (Morgan y Curran. 1991). De tal manera, la expresión de la proteína Fos ha sido extensamente usada para identificar la actividad neuronal en el sistema nervioso central en estructuras que participan en el control de la conducta de alimentación entre otras. Existen estudios donde se ha utilizado la identificación inmunohistoquímica de la proteína Fos como marcador de actividad neuronal en protocolos de alimentación. Por ejemplo, se ha visto un incremento significativo del número de neuronas que expresan proteína Fos inmunoreactiva (c-Fos IR) en los núcleos motor dorsal del vago e hipogloso durante la ingestión de alimento, así como un incremento de c-Fos IR en el núcleo del tracto solitario solamente después del consumir alimento (Emond y Weingarten. 1994).

La expresión de proteína c-Fos también se ha visto aumentada en el PVN en conejos neonatos coincidiendo con el momento de activación conductual al anticipar el alimento. En el núcleo supraóptico el aumento del número de neuronas c-Fos IR ha sido asociado a la succión. (Allingham y cols. 1998; Caba y cols. 2003).

También la expresión de c-Fos se ha estudiado en condiciones metabólicas como la obesidad, donde se muestra una diferencia significativa de la actividad neuronal en el hipotálamo entre los animales obesos y los no obesos a favor de los primeros.

La activación neuronal observada por la expresión de c-Fos del núcleo tuberomamilar se anticipa a la llegada del alimento en animales mantenidos en ayuno por 16 horas. Esta activación está temporalmente muy relacionada con el incremento de actividad locomotora que muestran las ratas en anticipación al próximo alimento (Inzunza y cols. 2000). Se han estudiado también estructuras nerviosas que participan en los mecanismos mecánicos de la alimentación como son la masticación deglución y distensión estomacal, por ejemplo, la activación del

NTS y formación reticular durante el momento de succión (Shironaka y cols. 2000).

En resumen, podemos decir que la actividad de los grupos celulares se puede identificar a través de la síntesis de proteínas de genes de expresión temprana, en este caso el gen *c-fos*. Este gen se expresa minutos después de la estimulación ya sea eléctrica o modulada por neurotransmisores y el RNAm tiene una vida media de 10 a 15 min. La proteína resultante de la expresión de este gen puede ser detectada por inmunohistoquímica en neuronas de 20 a 90 minutos después de la despolarización (Morgan y Curran. 1991).

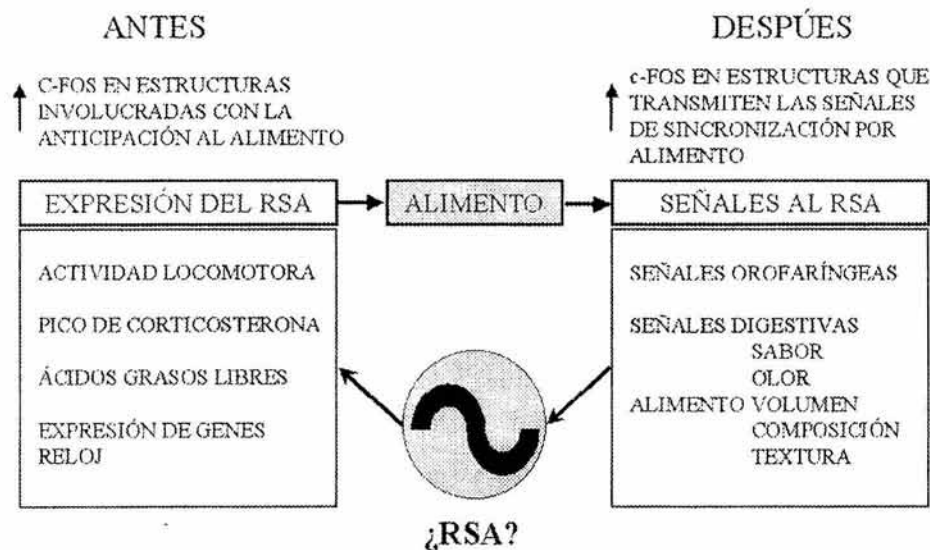
De tal manera, que la expresión inmunohistoquímica de la proteína Fos es una herramienta de gran valor para el estudio neuroanatómico-funcional y ofrece una importante alternativa para determinar el sustrato anatómico involucrado en el proceso de sincronización por alimento.



## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se han realizado múltiples trabajos y manipulaciones con el fin de identificar la estructura anatómica responsable de generar las fluctuaciones en la conducta y de parámetros metabólicos en la sincronización por alimento, cuando es restringido a horarios específicos del día. Principalmente se han realizado lesiones electrolíticas de estructuras relacionadas con el control del consumo de alimento y control del balance energético, como núcleos hipotálamicos, sistema límbico y algunas otras regiones como el área postrema y el núcleo parabraquial. No obstante, a la fecha no se ha podido identificar el sustrato anatómico y funcional del reloj sincronizado a la disponibilidad del alimento, lo cual sugiere que se puede tratar, como ya hemos mencionado, de un sistema distribuido y redundante.

Este sistema multiestructural puede estar constituido por elementos del sistema nervioso central involucrados con las entradas de sincronización, mientras que otras estructuras pueden participar o formar parte del reloj propiamente y otras involucradas en la transmisión o salidas de la información del reloj.



En este proyecto nos propusimos identificar las estructuras del sistema nervioso central involucradas con cada uno de los componentes del sistema del reloj sincronizado por el alimento. Para ello, se propone identificar las estructuras que muestran actividad neuronal después de la llegada del alimento; es decir, las estructuras que reciben la información que se genera durante el evento alimenticio desde la masticación, distensión gástrica así como los eventos tardíos de la digestión, ya que en cada uno de estos eventos, se generan señales neurales y humorales que producen activación de estructuras neuronales que pueden estar involucradas en las vías de sincronización.

También identificaremos las estructuras que muestran activación neuronal antes del momento de alimentación; es decir, las estructuras que se encuentra activadas en relación con la AA la cual es una expresión del RSA, por lo que estas estructuras pueden estar relacionadas con las vías de transmisión del reloj. Por otra parte, para poder identificar las estructuras neurales que se encuentran involucradas directamente con los mecanismos del reloj, es necesario estudiar la persistencia de la actividad neuronal en condiciones constantes; es decir, después de haber sincronizado a los animales, dejarlos en ayuno por varios ciclos e identificar las estructuras que muestran actividad con la misma fase de la llegada del alimento (sincronizador). Para todo esto utilizaremos como herramienta la identificación de la proteína c-Fos a través de inmunohistoquímica.

## HIPÓTESIS

1. En las ratas sincronizadas con alimento, la expresión de la proteína c-Fos durante las horas posteriores a la ingestión indicará aquellas estructuras que responden a señales digestivas y que pueden formar parte de la vía de sincronización al reloj sincronizado por el alimento.
2. En las ratas sincronizadas con alimento, la expresión de la proteína c-Fos durante horas previas al alimento indicará aquellas estructuras asociadas a la conducta de anticipación y que posiblemente constituyen vías de salida del reloj sincronizado al alimento.
3. En ratas sincronizadas con alimento, la persistencia de patrones de expresión de la proteína C-Fos en ayuno, indicará estructuras en donde se presentan oscilaciones sostenidas y que pudieran ser sustrato del reloj.

## **OBJETIVOS**

1. Identificar por medio de la técnica inmunohistoquímica para la proteína c-Fos, los grupos neuronales involucrados en la sincronización por alimento.
2. Clasificar las estructuras anatómicas de acuerdo al patrón de respuesta, en componentes de las vía de la sincronización, mecanismos del reloj y vía de transmisión.

## **MATERIAL Y METODOS**

Para la realización de este trabajo se utilizaron 180 ratas macho de la cepa Wistar de peso inicial de 250 a 300g. Las ratas fueron obtenidas del bioterio general de la Facultad de Medicina de la UNAM y mantenidas en el bioterio del departamento de Anatomía bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12-12 h (prendido de luz a las 07:00 h), libre acceso al agua y alimento (Rodent Laboratory Chow 5001). El manejo y trato de los animales se realizó bajo las normas de uso de animales de experimentación según el decreto de ley de protección a los animales del Distrito Federal, publicada en la Gaceta Oficial del Distrito Federal, 26/02/02.

## DISEÑO EXPERIMENTAL

### SINCRONIZACIÓN:

La primera etapa de experimentación fue diseñada para explorar la expresión celular de la proteína c-Fos (c-Fos-IR), asociada con la sincronización por el alimento.

Las ratas fueron asignadas en forma aleatoria a una de dos condiciones de alimentación, por tres semanas. Las ratas fueron mantenidas en grupos de seis animales que compartieron las mismas condiciones de alimentación en cajas de acrílico transparente (40X50X20 cm).

El grupo *ad libitum* (AL) se mantuvo con acceso libre al alimento. Este grupo fue incluido como un grupo control para observar la expresión de c-Fos bajo condiciones regulares de alimentación. (n =36)

Grupo de restricción de acceso al alimento (RA). Este grupo se mantuvo bajo condiciones de disponibilidad del alimento solamente por dos horas al día de 12:00-14:00 h, el resto del tiempo el comedero se mantuvo vacío. (n =36)

### CONTROL DE LA CONDICIÓN METABÓLICA:

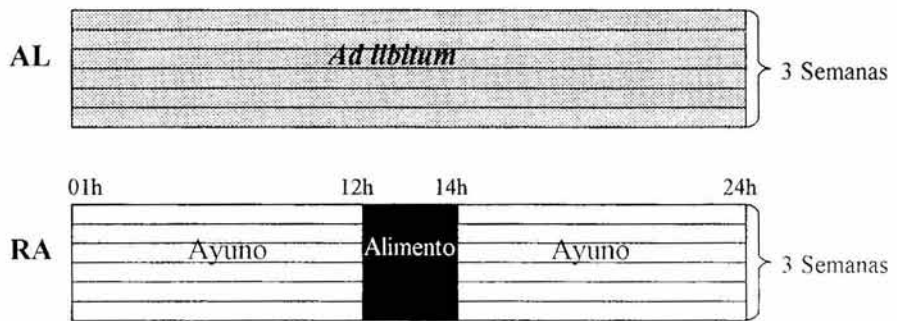
Para descartar que los efectos observados pudieran deberse a la condición metabólica que pudiera generar el ayuno agudo de 22 horas así como la realimentación por 2 horas sobre la expresión de c-Fos-IR, se diseñaron otros dos grupos control adicionales. Cada grupo incluyó 6 animales.

1) Grupo control de 22 horas de ayuno (22A) las ratas fueron mantenidas con acceso libre al alimento por tres semanas, el día anterior al experimento el alimento fue retirado a las 14:00 horas y después de 22 horas sin alimento es decir a las 12:00 horas del siguiente día las ratas fueron sometidas al procedimiento experimental como se explica posteriormente (Pág. 55).

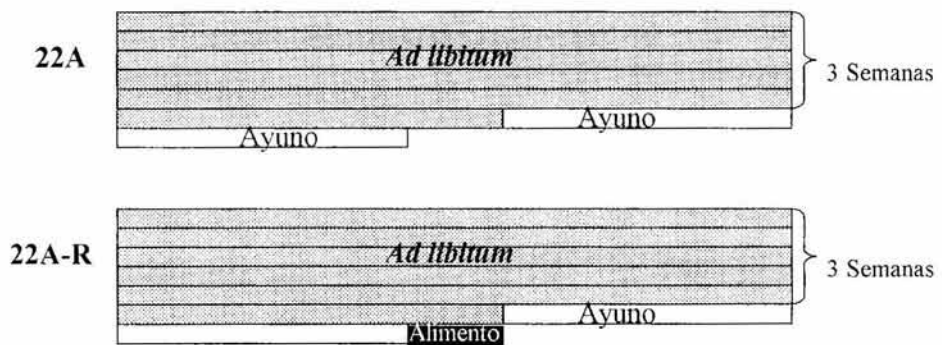
2) Grupo control de realimentación (22A-R). Las ratas al igual que las anteriores se mantuvieron por tres semanas en condiciones de acceso libre al alimento. Después se dejaron en ayuno por un periodo de 22 horas y se realimentaron por un periodo de dos horas (12:00-14:00 h) y fueron sometidas al procedimiento experimental.

## DISEÑO EXPERIMENTAL

### Sincronización:



### Control de la condición metabólica

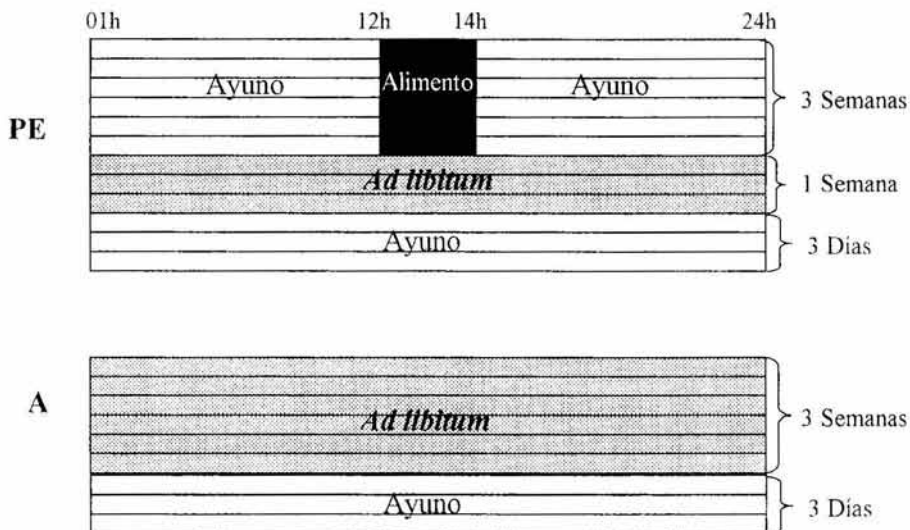


## PERSISTENCIA:

En una segunda etapa del trabajo experimental se exploró la persistencia en ayuno del patrón sincronizado de la expresión de c-Fos-IR.

Las ratas fueron asignadas en forma aleatoria a uno de dos grupos: En el grupo de persistencia (PE) las ratas fueron sincronizadas al alimento igual al grupo RA con disponibilidad de dos horas al día (12:00 a 14:00 h) por tres semanas, seguido de acceso libre al alimento por cinco días, y tres días de ayuno, posteriormente. (n =36)

Para el control de ayuno (A) las ratas se mantuvieron, con acceso libre al alimento por tres semanas, al final de las tres semanas el alimento se retiró del comedero a las 14:00 horas y se mantuvieron en ayuno por tres días. (n =36)

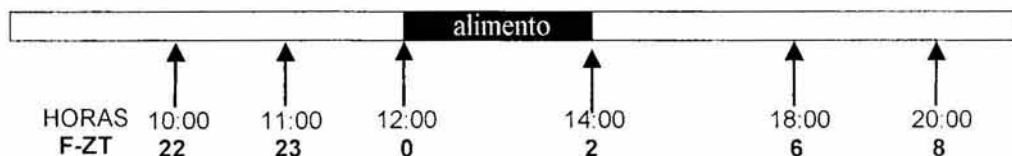


## Tiempos muestreados:

Para todos los grupos las ratas se sacrificaron y se obtuvieron los cerebros en el último día de cada protocolo de alimentación; 45 minutos después de cada punto temporal a evaluar, porque se estima que es el tiempo necesario para que se alcancen los niveles máximos de proteína después de un estímulo (Wang y cols. 1996). El tejido fue procesado y marcado de acuerdo al punto temporal correspondiente. Los puntos temporales evaluados fueron los siguientes 10:00, 11:00, 12:00, 14:00, 18:00 y 20:00 horas y se expresaron en los resultados como F-ZT del término en inglés Food-Zeitgeber Time (momento de sincronizador) tomando como F-ZT0 el momento de la llegada del alimento. El número de ratas por punto temporal fue de 6 ratas.

Además, para obtener una curva circadiana para el núcleo supraquiasmático (NSQ) como un control positivo, se incluyeron adicionalmente otras ratas en condiciones de AL y RA en ZT12 y ZT18 (24:00 y 06:00 respectivamente).

## PERFUSIÓN





## Histología e Inmunohistoquímica.

Las ratas fueron anestesiadas con una dosis de pentobarbital (0.065 mg/kg), (Sedal-Vet 65mg/ml). Una vez anestesiadas fueron perfundidas a través del corazón (ventrículo izquierdo) con aproximadamente 250 ml de solución salina isotónica al 0.9% seguido de 250 ml de solución fijadora PLP (Paraformaldehído 4%, Lisina 1.4% y metaperiodato de sodio 0.2%) en buffer de fosfatos (PBS, 0.1M, pH 7.2). Se pinzó la arteria aorta y vena cava por arriba del diafragma para asegurar que las soluciones únicamente perfundieran la región superior. Los cerebros fueron removidos y post fijados por una hora en PLP y crioprotegidos en solución de sacarosa al 10, 20 y 30% por 24 horas en cada una de las concentraciones.

Los cerebros fueron congelados y cortados en un criostato a  $-18^{\circ}\text{C}$  en cortes horizontales a  $40\mu\text{m}$  de espesor, los cortes fueron re-colectados en forma seriada en cuatro grupos. Una serie de cortes se tiñó con violeta de cresilo (Nissl) para identificar los núcleos que fueron analizados. Un segundo grupo de cortes fue procesado para inmunohistoquímica para la proteína c-Fos (técnica por flotación). Los cortes se incubaron por 72 horas a  $4^{\circ}\text{C}$  en el anticuerpo primario (c-Fos hecho en conejo de Santa Cruz Biotechnology) a una dilución de 1:2500 en PBSGT (PBS, suero de cabra 1% y 0.03% de tritón X-100). Posteriormente, los cortes se incubaron en el anticuerpo secundario biotinilado (anti-conejo, hecho en cabra de Laboratorios Vector) a una dilución de 1:200 en PBSGT por 2 horas a temperatura ambiente. Después, los cortes se incubaron con el complejo avidina-biotina (0.9% avidina y 0.9% biotina; Laboratorios Vector) en PBSGT por dos horas a temperatura ambiente. El tejido se llevó a una reacción con el cromógeno diaminobenzidina (0.5 mg/ml, en Trizma buffer 7.2) y peróxido de hidrógeno ( $35\mu\text{l}$ , 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Entre cada uno de los pasos de incubación se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno con PBS.

Los cortes se montaron en portaobjetos gelatinizados y se intensificó la reacción con tetraóxido de osmio al 0.1% por 15 segundos (Baker Analyzed). Los cortes se deshidrataron con alcohol, aclararon con xilol y se cubrieron con medio de montaje Permount (Fisher Chemicals) y cubre objetos.

### **Cuantificación de células inmunoreactivas (c-Fos-IR).**

Con los cortes teñidos con Nissl se identificó cada uno de los núcleos evaluados en este estudio. Para la cuantificación de células c-Fos-IR se tomó un corte representativo de la estructura a analizar. Las imágenes de las preparaciones en inmunohistoquímica se obtuvieron digitalmente con un sistema de análisis de imagen computarizado (Meta Vue Serie 4.5, Universal Imaging Corporation) conectado a un microscopio óptico Nikon (Nikon Eclipse E600). Sobre la imagen digitalizada se sobrepuso una rejilla de 108 cuadros de 40 x 40 $\mu$ m al centro de cada estructura que fue analizada. Únicamente fueron contadas la células c-Fos IR en forma unilateral a un aumento 100 veces (10X) contenidas en los 25 cuadros centrales. Para minimizar el número de resultados falsos positivos, se calculó la densidad óptica (DO) del fondo del corte donde no había células inmunoreactivas, de 10 puntos diferentes del fondo, se promedió la DO basal y se multiplicó por dos, de esta manera todas las células que tuvieran una DO mayor al valor preestablecido se consideraron positivas y fueron incluidas en los resultados y las que tuvieron un valor menor fueron descartadas. Todas las cuentas se realizaron, sin conocer los datos específicos del experimento, como son número de animal y condición de alimentación.

### **Análisis de Datos**

El número de células fue transformado a células/mm<sup>2</sup> los datos se clasificaron por grupos y punto temporal. Los valores se presentaron en promedios  $\pm$  error estándar del promedio. Los datos se compararon entre los grupos AL y RA, así como los datos PE se compararon con A. Ambas comparaciones se realizaron con un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías para medidas independientes con un factor grupo de dos niveles y un factor tiempo de 6 niveles. Además todas

la pruebas de ANOVA fueron seguidas de una prueba *post hoc Tukey (HSD; honest significant difference)* con un valor de  $p < 0.01$ . Los valores de los grupos de 22A y de 22A-R se compararon con los valores celulares de los puntos temporales de 12:00h y 14:00h del grupo RA, respectivamente con un ANOVA de una vía para medidas independientes. Los análisis estadísticos fueron realizados con un programa de estadística (Statistic versión 4.5; StatSoft, Inc. 1993).

## **Estructuras analizadas.**

### **Tallo cerebral:**

Del tallo cerebral se analizaron el núcleo del tracto solitario (NTS), que por ser un núcleo muy extenso se dividió en rostral, medial y caudal, el núcleo para braquial (PBN) que también se dividió en lateral y medial, el núcleo motor dorsal del vago (DMX) y el área postrema (AP).

### **Hipotálamo:**

En el hipotálamo se analizaron los siguientes núcleos neuronales:

Dorsomedial hipotalámico (DMH), lateral del hipotálamo (LH), paraventricular (PVN), ventromedial hipotalámico (VMH), núcleo perifornical (PeF), núcleo tuberomamilar (TM) y el núcleo supraquiasmático (NSQ).

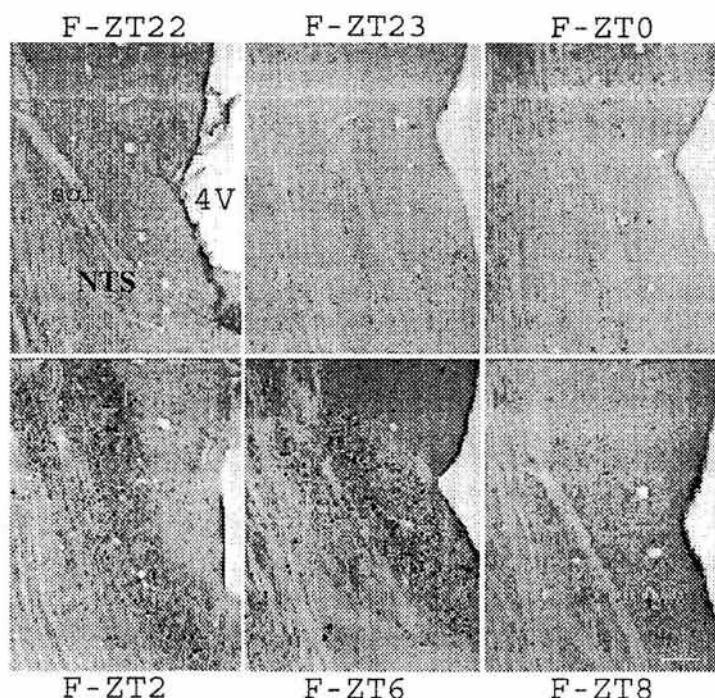
### **Sistema límbico:**

Del sistema límbico las estructuras analizadas fueron: Amígdala central (CeA), la amígdala basolateral (BLA) y la amígdala medial (MeA), el núcleo de la estría terminalis (NBST), el núcleo paraventricular talámico (PVT), el núcleo lateral del séptum (SL), y la corteza prefrontal se subdividió en prelímbica (CPL) e infralímbica (CIL).

## RESULTADOS

### Núcleos del tallo cerebral

Todos los núcleos del tallo cerebral que se estudiaron mostraron inmunoreactividad a la proteína c-Fos (c-Fos-IR). El grupo AL mostró una cantidad de células c-Fos-IR constante y no se observó una fluctuación. En el grupo de ratas en restricción de alimento (RA) se observó un incremento del número de células c-Fos-IR después del alimento en todos los núcleos del tallo cerebral analicé (Fig. 12); es decir, en F-ZT2 y F-ZT6. En todos los núcleos, el número de células c-Fos-IR en el grupo RA fue estadísticamente diferente a lo observado en el grupo AL para ambos puntos temporales (Tabla 2).

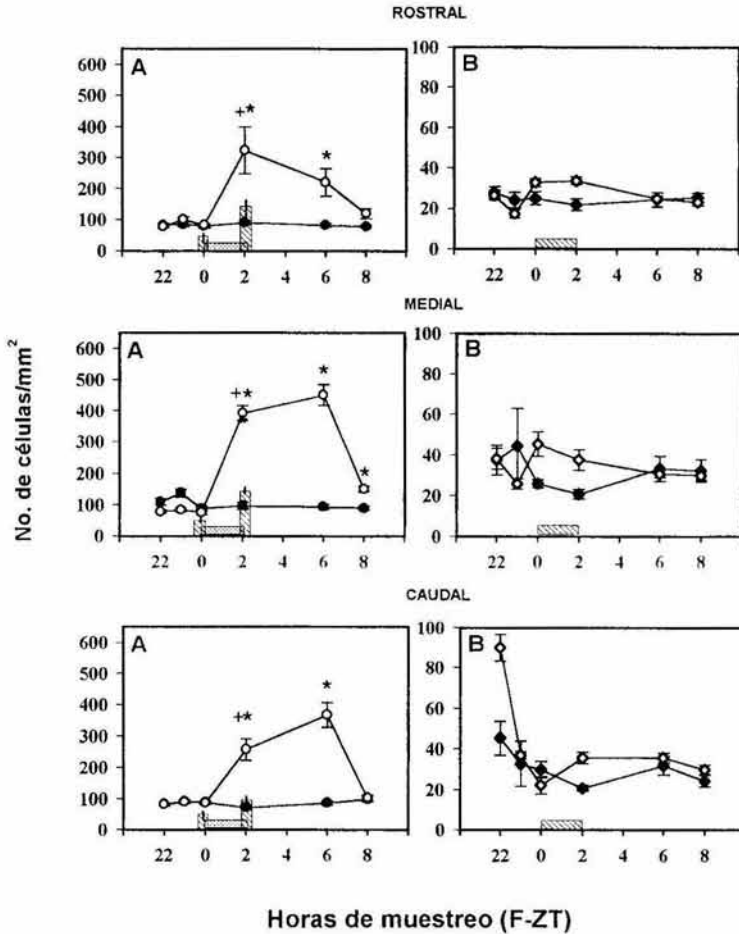


**Figura 12.** Microfotografía que ilustra las células c-Fos-IR en una sección representativa del NTS de ratas del grupo RA en todos los puntos temporales analizados. NTS: núcleo del tracto solitario; Sol: tracto solitario; 4V: cuarto ventrículo; (la barra =100 μm).

En ninguna de las tres regiones del núcleo del tracto solitario (NTS) se observó diferencia en el número de células c-Fos IR entre los puntos temporales previos a la llegada del alimento entre los grupos AL y RA (*Tabla 2*), así como cuando se comparó con el grupo de control metabólico 22A en el punto temporal correspondiente (F-ZT2). En el punto temporal inmediato a la llegada del alimento, es decir, F-ZT2, el número de células c-Fos-IR fue estadísticamente diferente entre el grupo RA y 22A-R (rostral  $F_{(1,8)}=13.3$ ;  $p<0.001$ ; medial  $F_{(1,8)}=100.9$ ;  $p<0.001$ ; caudal  $F_{(1,8)}=22.7$ ;  $p<0.001$ ). En todas las regiones del NTS el número de células positivas para c-Fos mostró un incremento marcado en F-ZT6 o sea seis horas después del momento de la llegada del alimento (*Fig. 13A*).

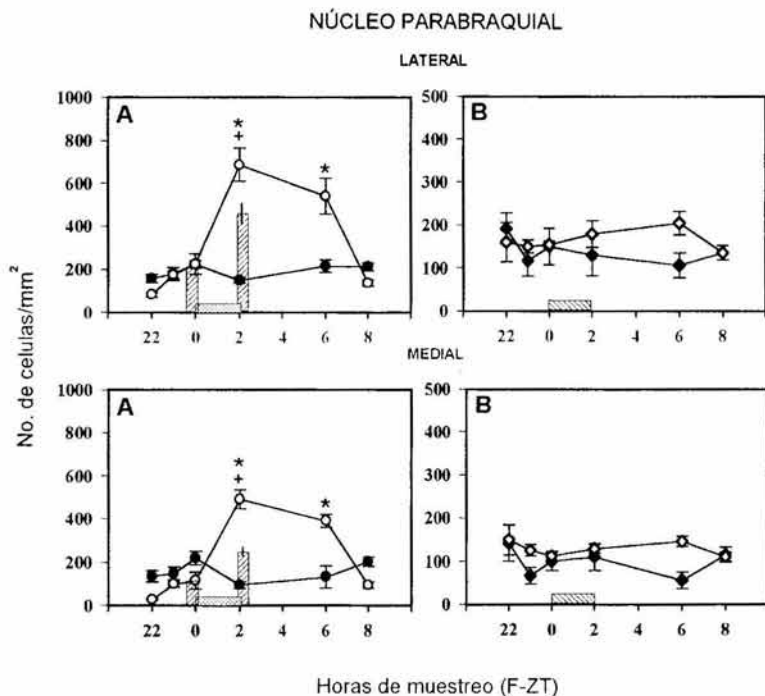
En el NTS en los grupos PE y A se observó una disminución del número de células c-Fos-IR comparadas con los grupos anteriores AL, pero no mostraron persistencia del patrón temporal de sincronización (*Fig. 13B*).

## NUCLEO DEL TRACTO SOLITARIO



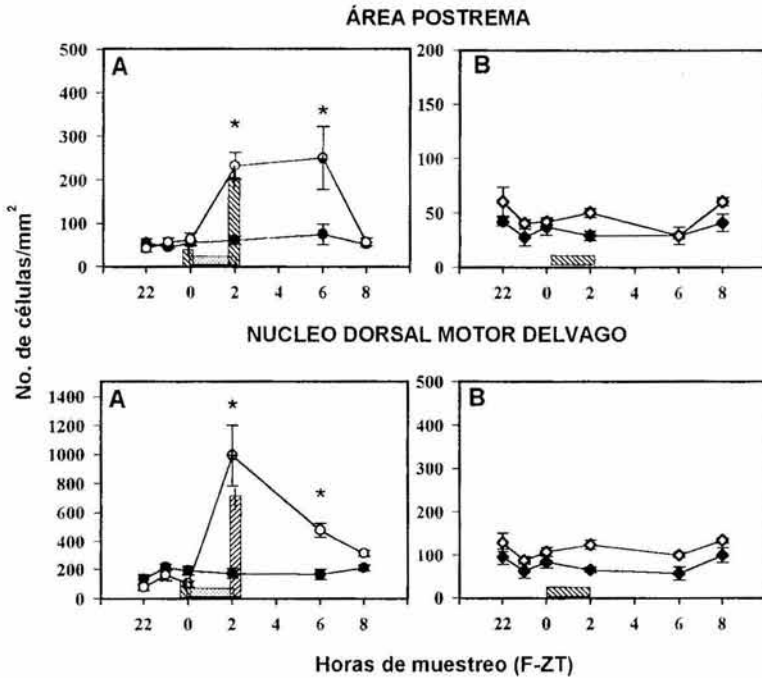
**Figura 13.** Número de células positivas para *c-Fos* en las tres subdivisiones del NTS (A) de ratas sincronizadas por alimento (RA; círculos claros) y sus controles *ad libitum* (AL; círculos oscuros) y (B) ratas en ayuno posterior a la sincronización (PE; rombos claros) y sus controles de ayuno (A; rombos oscuros). El grupo control de ayuno de 22 horas (22A) y de realimentación (22A-R) se representan en A como barras rayadas en F-ZT0 y F-ZT2 respectivamente. En A la barra horizontal sobre el eje X representa el tiempo de alimentación y en B el momento en que las ratas esperaban el alimento. Los asteriscos indican diferencias entre AL y RA (\*)= $p < 0.05$ , la cruz indica diferencias entre el punto correspondiente del grupo RA (+)= $p < 0.05$ . Las ratas muestran un incremento de células *c-Fos*-IR después de la llegada del alimento F-ZT2 y F-ZT6 en las tres subdivisiones del NTS. El grupo PE y su control A no muestran fluctuaciones en el número de células *c-Fos*-IR.

En el PBN, al igual que en el NTS no se observaron cambios del grupo AL y se observó un aumento del número de células c-Fos-IR en los dos puntos temporales posteriores a la comida en el grupo RA (Fig. 14A). Igualmente los valores de F-ZT2 fueron estadísticamente diferentes del control 22A-R (medial,  $F_{(1,8)}=35.8$ ;  $p<0.001$ ; lateral,  $F_{(1,8)}=9.8$ ;  $p<0.05$ ). Tampoco se observó persistencia de este patrón sincronizado en el grupo PE, ni en el control A (Fig. 14B).



**Figura 14.** Número de células c-Fos-IR en el PBN bajo condiciones de sincronización A y de ayuno B. En los puntos temporales F-ZT2 y F-ZT 6 las ratas del grupo RA muestran un incremento en el número de células c-Fos-IR en ambas regiones del PBN (lateral y medial). (\*) indica diferencia estadística entre AL y RA,  $p<0.001$ . (+) indica diferencia estadística entre F-ZT0 y 22A-R,  $p<0.01$ . Otras indicaciones como en la figura 13.

En el área postrema así como en el DMX se observó el mismo patrón en el grupo AL y RA como en las otras regiones. El número de células c-Fos-IR en F-ZT0 en el grupo RA no fue diferente del grupo de 22 A (AP;  $F_{(1,8)}=0.68$ , NS., DMX;  $F_{(1,8)}=0.31$ , NS), tampoco fue diferente el número de c-Fos-IR en ninguna de las dos áreas en F-ZT2 comparadas con el grupo de 22 A-R (AP;  $F_{(1,8)}=0.75$ , NS., DMX;  $F_{(1,8)}=3.06$ , NS)(Fig. 15A). El patrón de sincronización observado previamente en el grupo de sincronización (RA) no persistió en el grupo PE (Fig. 15B). Tampoco se observó diferencia de células c-Fos-IR comparado con el grupo A (Tabla 3).



**Figura 15.** (A) En el AP y DMX se observa un incremento de células c-Fos-IR en el grupo RA (círculos claros) posteriores a el alimento, el número de células c-Fos-IR fue diferente comparado con el grupo AL(círculos oscuros), (B) no se observaron diferencias durante el ayuno entre el grupo previamente sincronizado (rombos claros) y el grupo control de ayuno (rombos oscuros); (\*) indica diferencia estadística entre AL y RA,  $p < 0.001$ . Otras indicaciones como en la figura 13.



**Tabla 2.** Valores estadísticos obtenidos con el ANOVA de dos vías para medidas independientes, para el grupo ad libitum (AL) y el grupo sincronizado (RA) y los 6 puntos temporales.

NÚCLEO NTS	GRUPO		TIEMPO		G x T	
	F <sub>(1,60)</sub>	p<	F <sub>(5,60)</sub>	p<	F <sub>(5,60)</sub>	p<
Rostral	23.2	.001	7.84	.001	6.79	.001
Medial	157.3	.001	67.2	.001	78.8	.001
Caudal	73.4	.001	27.3	.001	31.2	.001
<b>PBN</b> Lateral	27.6	.001	19.4	.001	21.3	.001
Medial	7.81	NS	15.4	.001	28.8	.001
<b>AP</b>	17.7	.001	9.26	.001	6.51	.001
<b>DMX</b>	20.9	.001	13.9	.001	14.2	.001

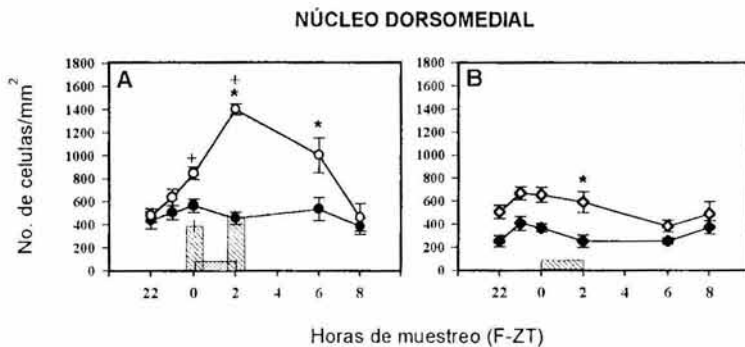
**Tabla 3.** Valores estadísticos obtenidos con el análisis de varianza de dos vías (ANOVA) para medidas independientes, para el grupo PE y su control A, en seis puntos temporales.

NÚCLEO NTS	GRUPO		TIEMPO		G x T	
	F <sub>(1,54)</sub>	p<	F <sub>(5,54)</sub>	p<	F <sub>(5,54)</sub>	p<
Rostral	1.02	NS	2.63	NS	3.34	NS
Medial	0.27	NS	0.37	NS	1.85	NS
Caudal	0.12	NS	1.88	NS	1.69	NS
<b>PBN</b>						
Lateral	2.00	NS	0.50	NS	0.99	NS
Medial	5.81	NS	1.36	NS	1.27	NS
<b>AP</b>	12.5	NS	3.80	NS	0.90	NS
<b>DMX</b>	23.4	<b>.01</b>	3.37	NS	0.51	NS

## Núcleos del hipotálamo

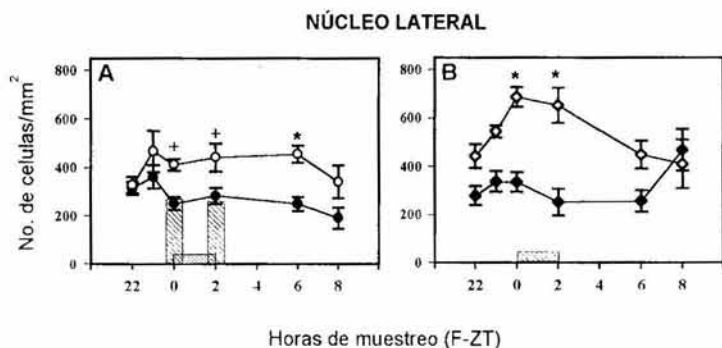
En los núcleos del hipotálamo que fueron estudiados se observó una clara inmunoreactividad a la proteína c-Fos.

En el núcleo DMH del grupo AL no se observaron fluctuaciones en el número de células c-Fos-IR. En el grupo RA se observó una clara fluctuación en el patrón temporal en el número de células c-Fos-IR, con un incremento significativo anticipando el alimento en F-ZT0, un aumento mayor en F-ZT2 que se mantuvo hasta F-ZT6. El análisis de varianza mostró un efecto significativo en el factor grupo y el factor tiempo, así como la interacción entre ambos (*Tabla 4*). El número de células c-Fos-IR del grupo RA en F-ZT0 y F-ZT2 fue estadísticamente diferente al compararlo con los grupos controles 22A ( $F_{(1,10)}=83.87$ ;  $p<0.001$ ) y 22A-R ( $F_{(1,10)}=45.37$ ;  $p<0.001$ ), respectivamente. En el grupo PE se observó un aumento de células c-Fos-IR en el DMH que fue significativamente distinto del grupo A (*Tabla 5*), (*Fig. 16*).



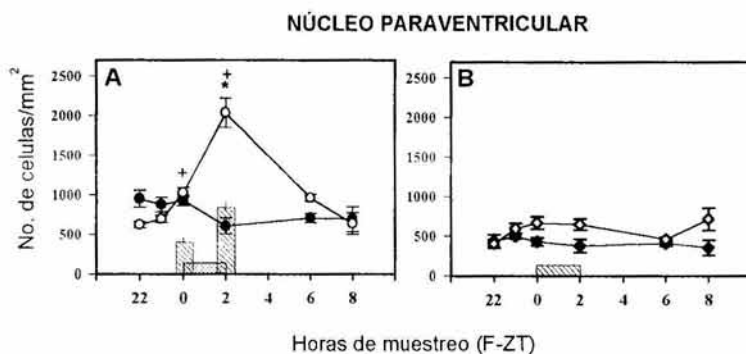
**Figura 16.** Patrón temporal en el número de células c-Fos-IR en el DMH, (A) en el grupo AL (círculos oscuros) y RA (círculos claros). En (B) el número de células c-Fos-IR del grupo PE (rombos claros) es diferente del grupo A (rombos oscuros), (\*) indica diferencia estadística entre AL y RA,  $p<0.001$ ; (+) RA distinto de 22A y de 22A-R,  $p<0.001$ . Otras indicaciones igual a la figura 13.

En el núcleo LH el número de células c-Fos-IR en el grupo AL no mostró fluctuación temporal; en cambio, la restricción de alimento generó un incremento en el número de células c-Fos-IR anticipando la llegada del sincronizador y que continuó después del evento alimenticio hasta F-ZT6. El número de células que expresan proteína c-Fos en el grupo RA fue estadísticamente diferente al mostrado por el grupo control AL, al comparar grupo, tiempo y la interacción entre ambos (Tabla 4). El número de células c-Fos-IR observadas en F-ZT0 y F-ZT2 en el grupo RA fue diferente al compararlos con los observados en los grupos controles 22A ( $F_{(1,10)}=21.38; p<0.001$ ) y 22A-R ( $F_{(1,10)}=13.02; p<0.001$ ) respectivamente (Fig. 17A). El grupo PE mostró una importante activación celular en la etapa de persistencia de la sincronización, durante las horas en que se esperaba el alimento en los puntos temporales F-ZT0 y F-ZT2, que es la fase de la llegada subjetiva del alimento. El grupo A no mostró fluctuaciones. Este número de células es estadísticamente significativo al compararlo con el grupo A en el factor grupo y la interacción grupo-tiempo (Tabla 5)  $p<0.001$ , (Fig. 17B).



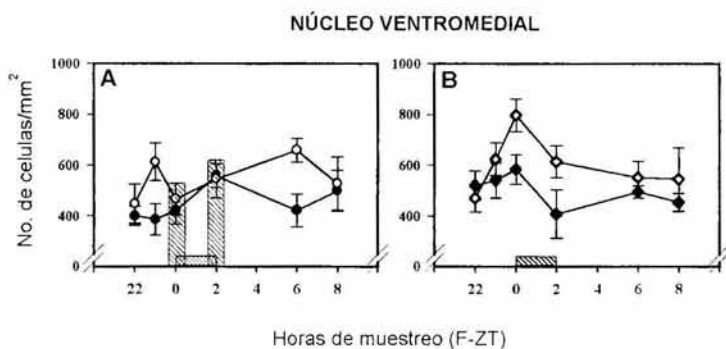
**Figura 17.** Patrón temporal en el número de células c-Fos-IR en el LH, (A) en el grupo AL (círculos oscuros) y RA (círculos claros). En (B) el número de células c-Fos-IR del grupo PE (rombos claros) es diferente del grupo A (rombos oscuros), (\*) AL vs RA ó A vs PE,  $p<0.001$ ; (+) RA vs 22A ó 22A-R  $P<0.01$ ). Otras indicaciones igual a la figura 13.

El número de células c-Fos-IR en el núcleo PVN de las ratas del grupo AL no mostró un patrón temporal de activación, sin embargo en las ratas del grupo RA se observó una respuesta posterior al alimento, caracterizada por un incremento de células c-Fos-IR en F-ZT2 diferente de los otros puntos temporales estudiados y del grupo control AL (Tabla 4). El número de células c-Fos-IR observadas en los puntos temporales F-ZT0 y F-ZT2 del grupo RA, fue diferente de lo esperado por el ayuno agudo 22A y el evento de realimentación del grupo 22A-R ( $F_{(1,10)}=58.32;p<0.001$ ) y ( $F_{(1,10)}= 40.46;p<0.001$ ) respectivamente (Fig. 18A). En este núcleo no se observó persistencia del patrón temporal observado durante la sincronización.



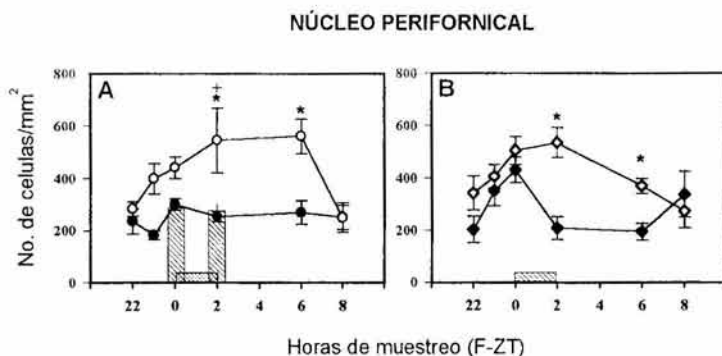
**Figura 18.** Patrón temporal del número de células c-Fos-IR en el PVN. En (A) grupo RA (círculos claros) y sus controles AL (círculos oscuros) y en (B) grupo PE (rombos claros) y A (rombos oscuros). (\*) indica diferencia estadística entre AL y RA,  $p<0.001$ ; (+) RA distinto de 22A y de 22A-R,  $p<0.001$ . Otras indicaciones igual a la figura 13.

El número de células c-Fos-IR en el núcleo VMH no mostró una diferencia entre los grupo RA y AL (*Tabla 4*). Tampoco se observó diferencia del grupo RA comparada con los grupos de 22A y 22A-R. Este núcleo mostró un patrón de fluctuación en el grupo PE con la mayor activación en los puntos temporales previos a la hora en la que se esperaba el alimento, aunque estadísticamente la diferencia no es significativa (*Tabla 5*) y (*Fig. 19*).



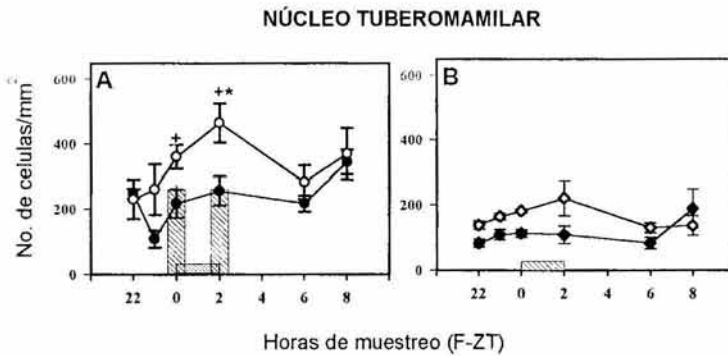
**Figura 19.** Patrón temporal del número de células c-Fos-IR en el VMH. (A) grupo RA (círculos claros) y sus controles AL (círculos oscuros) y en (B) grupo PE (rombos claros) y A (rombos oscuros). Otras indicaciones igual a la figura 13.

El número de células c-Fos-IR del núcleo PeF en el grupo AL no mostró fluctuación temporal. En el grupo RA el número de células c-Fos-IR aumentó a partir de 2h antes del momento de alimentación y mostró una respuesta al alimento observada en F-ZT2 y F-ZT6. El número de células c-Fos-IR del grupo RA fue estadísticamente diferente al compararlo con el grupo AL en el factor tiempo, grupo y en la interacción de ambos (*Tabla 4*). El número de células c-Fos-IR en F-ZT0 del grupo RA no es diferente del grupo de 22A, pero el número de células en F-ZT2 de RA fue estadísticamente diferente al compararlo con el grupo 22A-R ( $F_{(1,10)}=4.96; p<0.04$ ). El grupo de PE mostró una fluctuación en la actividad celular horas previas a la llegada subjetiva del alimento que fue estadísticamente diferente del grupo A (*Tabla 5*) (*Fig. 20*).



**Figura 20.** Patrón temporal del número de células c-Fos-IR en el núcleo PeF. (A) grupo RA (círculos claros) y sus controles AL (círculos oscuros) y en (B) grupo PE (rombos claros) y A (rombos oscuros), (\*) indica diferencia estadística entre AL y RA,  $p<0.001$ ; (+) RA distinto de 22A y de 22A-R,  $p<0.001$ . Otras indicaciones igual a la figura 13.

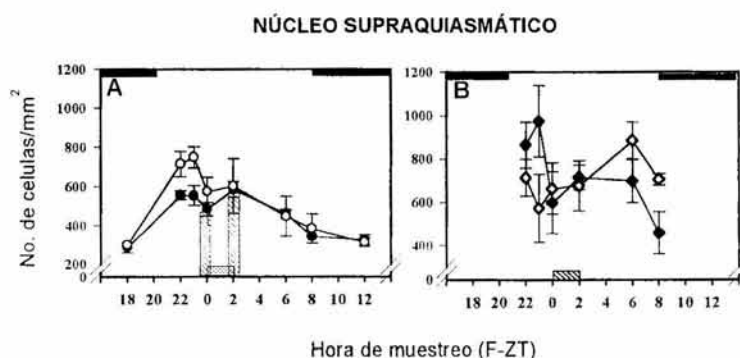
El núcleo TM del grupo AL mostró un patrón temporal de activación celular al iniciar la fase de oscuridad y de actividad con aumento en el número de células c-Fos-IR. En el grupo RA la sincronización por alimento generó un patrón temporal de expresión de células c-Fos-IR diferente del grupo AL que fue estadísticamente distinto tanto en el factor tiempo como grupo y en su interacción (Tabla 4). En los puntos temporales F-ZT0 y F-ZT2 del grupo RA el número de células c-Fos-IR es estadísticamente diferente al compararlos con los grupos 22A ( $F_{(1,10)}=14.44;p<0.003$ ) y 22A-R ( $F_{(1,10)}=6.31;p<0.03$ ) respectivamente. El número de células c-Fos-IR en AL no es diferente de que mostró el grupo de PE, no hubo un patrón temporal de persistencia de la sincronización (Fig. 21), aunque se observó una mayor c-Fos-IR en el grupo PE comparado con A.



**Figura 21.** (A) En el TM se observó un incremento de células c-Fos-IR en el grupo RA (círculos claros) anticipando y posterior al alimento, el número de células c-Fos-IR fue diferente comparado con el grupo AL (círculos oscuros). (B) no se observaron fluctuaciones durante el ayuno entre el grupo previamente sincronizado (rombos claros) y el grupo control de ayuno (rombos oscuros). Otras indicaciones como en la figura 13.



El NSQ mostró un ritmo diurno ajustado al ciclo luz-oscuridad con altos valores del número de células c-Fos-IR durante la fase de luz y bajos después de apagar la luz. No hubo diferencias estadísticas al comparar los grupos AL y RA (Tabla 4). El número de células de los puntos temporales F-ZT0 y F-ZT2 del grupo RA no fueron diferentes de los grupos controles 22A y 22A-R. En el grupo PE y A el número de células c-Fos-IR mostró el mismo patrón temporal de expresión de proteína c-Fos, con un aumento en el número celular c-Fos-IR en la fase de luz y una disminución en la fase de oscuridad (Fig. 22).



**Figura 22.** (A) En el NSQ se observa un patrón similar de activación del número de células c-Fos-IR en el grupo RA (círculos claros) y el grupo AL (círculos oscuros), (B) no se observaron diferencias durante el ayuno entre el grupo previamente sincronizado (rombos claros) y el grupo control de ayuno (rombos oscuros). Las barras sobre el eje superior de las x denotan el día (blanco) y noche (negro). Otras indicaciones como en figura 13.

**Tabla 4.** valores estadísticos obtenidos con un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) para medidas independientes, para el grupo RA y el control A.

NÚCLEO	GRUPO		TIEMPO		G x T	
	$F_{(1,58)} =$	p<	$F_{(5,58)} =$	p<	$F_{(5,58)} =$	p<
<b>DMH</b>	44.75	<b>0.01</b>	8.12	<b>0.01</b>	9.06	<b>0.01</b>
<b>LH</b>	29.37	<b>0.01</b>	1.29	NS	1.71	NS
<b>PeF</b>	24.92	<b>0.01</b>	2.77	<b>0.05</b>	2.50	<b>0.05</b>
<b>PVN</b>	12.00	<b>0.01</b>	9.38	<b>0.01</b>	21.22	<b>0.01</b>
<b>TM</b>	12.73	<b>0.01</b>	4.31	<b>0.01</b>	1.52	NS
<b>VMH</b>	8.05	<b>0.01</b>	1.27	NS	1.51	NS
<b>NSQ</b>	$F_{(1,68)} =$ 3.17	NS	$F_{(7,68)} =$ 8.09	<b>0.01</b>	0.71	NS

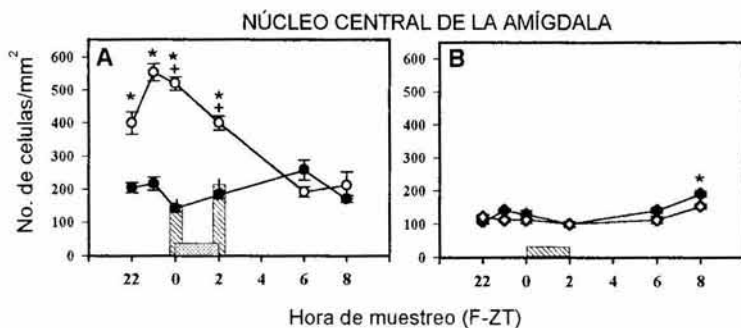
**Tabla 5.** valores estadísticos obtenidos con el análisis de varianza de dos vías (ANOVA) para medidas independientes, para los grupos de ayuno PE y su control A, en seis puntos temporales.

NÚCLEO	GRUPO		TIEMPO		G x T	
	F <sub>(1,58)</sub> =	p<	F <sub>(5,58)</sub> =	p<	F <sub>(5,58)</sub> =	p<
<b>DMH</b>	39.15	<b>0.01</b>	3.62	<b>0.5</b>	0.92	NS
<b>LH</b>	38.93	<b>0.01</b>	2.37	NS	3.12	<b>0.5</b>
<b>PeF</b>	12.58	<b>0.01</b>	3.66	<b>0.5</b>	2.44	<b>0.5</b>
<b>PVN</b>	16.47	<b>0.01</b>	1.48	NS	2.16	NS
<b>TM</b>	9.20	<b>0.5</b>	1.81	NS	1.53	NS
<b>VMH</b>	5.83	<b>0.5</b>	2.38	NS	1.05	NS
<b>NSQ</b>	0.01	NS	1.75	NS	1.27	NS

## Estructuras del sistema límbico

Para la cuantificación de células c-Fos-IR, en la amígdala se dividió en tres regiones, amígdala central (CeA), amígdala medial (MeA) y amígdala basolateral (BLA).

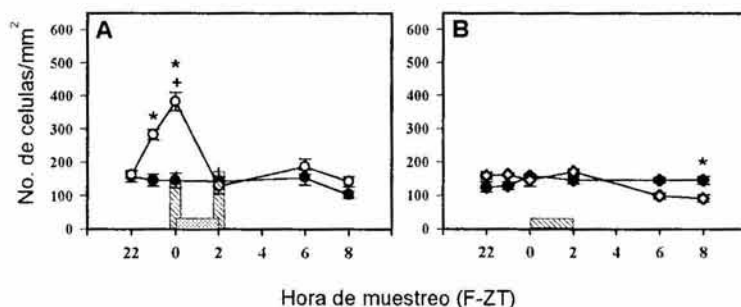
En el grupo AL el número de células c-Fos-IR en la CeA no mostró una fluctuación a través de los puntos temporales estudiados. El grupo RA mostró un incremento en el número de células c-Fos-IR en los tres puntos temporales antes de la llegada del alimento F-ZT22, F-ZT23 y F-ZT0, anticipando a este. Se pudo observar una disminución en el número de células c-Fos-IR en F-ZT2, pero siguió siendo significativamente mayor al grupo AL. Este núcleo mostró un claro ritmo asociado con el momento de la llegada del alimento. El ANOVA de dos vías mostró una diferencia estadísticamente significativa entre grupos, en el tiempo y en su interacción (*Tabla 6*). Al comparar el número de células c-Fos-IR de RA entre los puntos temporales F-ZT0 y F-ZT2 y el grupo 22A y 22A-R se observó una diferencia estadísticamente significativa ( $F_{(1,10)}=209.08$ ;  $p<0.001$ ) y ( $F_{(1,10)}=59.70$ ;  $p<0.001$ ) respectivamente (*Fig. 23A*). En el protocolo de persistencia, existió una diferencia en el número de células c-Fos-IR entre grupos (*Tabla 7*), pero no el patrón temporal del grupo sincronizado. El análisis *pos hoc* indicó un aumento en el número de células c-Fos-IR en los puntos cercanos al apagado de la luz, principalmente en F-ZT8.



**Figura 23.** Patrón temporal de la activación celular de la amígdala central, en A bajo sincronización por el alimento. Es claro el fenómeno de anticipación en el grupo RA (círculos claros), mostrando un fluctuación temporal asociada al alimento y distinto del grupo AL (círculos oscuros). En B los grupos de ayuno PE (rombos claros) y A (rombos oscuros) no mostraron fluctuaciones. Otras indicaciones como en figura 13.

En la MeA el número de células c-Fos-IR en el grupo AL no mostró un patrón temporal de activación; sin embargo, el grupo RA mostró una clara fluctuación temporal anticipando a la hora de alimentación, desde 2 horas antes de la llegada del alimento. Esta activación celular fue estadísticamente significativa al comparar el grupo RA y AL y en la interacción de los factores tiempo-grupo (Tabla 6). El número de células c-Fos-IR en el punto temporal F-ZT0 fue estadísticamente diferente del esperado para la condición de ayuno del grupo 22A ( $F_{(1,10)}=47.93; p<0.001$ ). Por el contrario, el número de células en F-ZT2 no fue diferente de 22A-R (Fig. 24A). En los grupos PE y A no hubo una fluctuación temporal aunque se observó entre grupos en F-ZT8 (Tabla 7) (Fig. 24B).

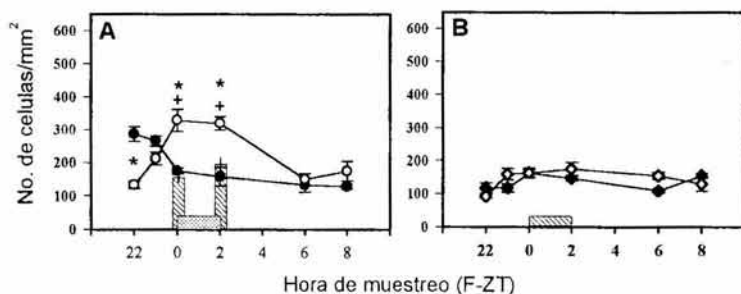
### NÚCLEO MEDIAL DE LA AMÍGDALA



**Figura 24.** Patrón temporal del número de células inmunoreactivas a c-Fos en el núcleo medial de la amígdala. En (A) la sincronización por alimento se observa la anticipación en el grupo RA (círculos claros), mostrando un fluctuación temporal asociada al alimento y distinto del grupo AL (círculos oscuros). (B) los grupos de ayuno no mostraron fluctuaciones, PE (rombos claros) y A (rombos oscuros), (\*) indica diferencia estadística entre AL y RA,  $p < 0.001$ ; (+) RA distinto de 22A y de 22A-R,  $p < 0.001$ . Otras indicaciones como en figura 13.

El número de células c-Fos-IR en la BLA en el grupo AL mostró una fluctuación de activación celular asociada al ciclo luz oscuridad con un aumento en las horas posteriores al prendido de la luz. El grupo RA mostró igualmente un patrón temporal de activación celular pero asociado a la anticipación al alimento con un incremento del número células c-Fos-IR en el punto previo a la llegada del alimento y esta activación se mantuvo hasta F-ZT2 con un decremento en los puntos posteriores. El ANOVA de dos vías indicó una diferencia entre grupos tiempo y la interacción de ambos (Tabla 6). La respuesta celular observada en el grupo RA en los puntos temporales F-ZT0 y F-ZT2 mostró una diferencia estadísticamente significativa con los grupos 22A ( $F_{(1,10)}=20.07; p < 0.001$ ) y 22A-R ( $F_{(1,10)}=28.43; p < 0.001$ ) (Fig. 25A). En el grupo PE y A no se observó un patrón temporal de expresión de c-Fos diferente entre grupos. Sin embargo, en el factor tiempo sí hay diferencia por una disminución del número de células c-Fos-IR en el punto temporal cercano al apagado de la luz de el grupo A (Tabla 7), (Figura 25B).

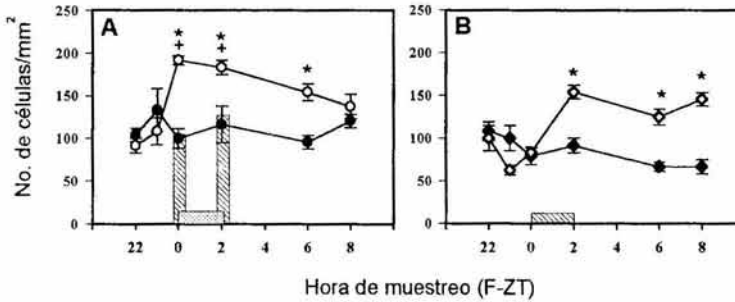
NÚCLEO BASOLATERAL DE LA AMÍGDALA



**Figura 25.** Número de células inmunoreactivas a c-Fos en el núcleo basolateral de la amígdala. (A) El grupo RA (círculos claros), mostró una fluctuación temporal asociada al alimento y diferente del grupo AL (círculos oscuros). (B) los grupos de ayuno no mostraron fluctuaciones, PE (rombos claros) y A (rombos oscuros), (\*) indica diferencia estadística entre AL y RA,  $p < 0.001$ ; (+) RA distinto de 22A y de 22A-R,  $p < 0.001$ . Otras indicaciones como en figura 13.

En el núcleo NBST el número de células c-Fos-IR del grupo RA el patrón de expresión de células c-Fos-IR mostró una fluctuación asociada al alimento aumentando justo antes de la llegada del mismo, es decir anticipando al alimento F-ZT0 y que se mantuvo elevada a lo largo de los demás puntos temporales hasta F-ZT6. El ANOVA de 2 vías mostró diferencias significativas entre grupos, tiempo, así como la interacción entre ambos (Tabla 6). El número de células c-Fos-IR en los grupos 22A y 22A-R fue estadísticamente diferente al compararlos con los puntos temporales F-ZT0 ( $F_{(1,10)}=7.36; p < 0.01$ ) y F-ZT2 ( $F_{(1,10)}=22.83; p < 0.001$ ), respectivamente (Fig. 26A). En el grupo A no se observó una fluctuación en el patrón de expresión de células c-Fos-IR. En cambio, en el grupo PE se observó un patrón de activación similar al observado durante la sincronización con alimento, aunque iniciando la activación en F-ZT2. El número de células c-Fos-IR al compararse con el grupo control A fue estadísticamente diferente (Tabla 7)(Figura 26B).

NÚCLEO DEL LECHO DE LA ESTRIA TERMINALIS

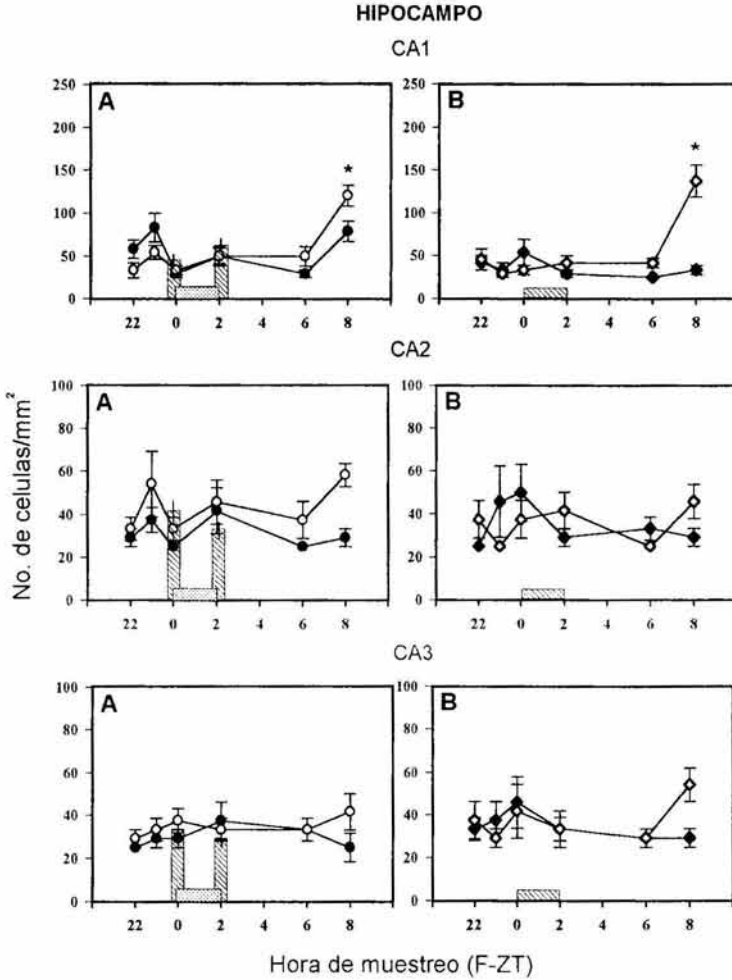


**Figura 26.** Patrón temporal del número de células *c-Fos-IR* en el núcleo NBST. (A) El grupo RA (círculos claros), mostró una fluctuación temporal asociada al alimento y distinto del grupo AL (círculos oscuros). (B) El grupo PE (rombos claros) y A (rombos oscuros), (\*) indica diferencia estadística entre AL y RA,  $p < 0.001$ ; (+) RA distinto de 22A y de 22A-R,  $p < 0.001$ . Otras indicaciones como en figura 13.

El análisis del Hipocampo se realizó en forma diferencial por regiones, de tal manera que se evaluó la activación de CA1, CA2 y CA3.

En las tres regiones se observó un mismo patrón temporal tanto para AL como RA (Fig. 27A), no se observaron diferencias entre grupos. Solamente en CA1 existió diferencia en el tiempo (Tabla 6). Igualmente entre los grupos de ayuno no se observaron diferencias entre los grupo PE y A (Fig. 27B). La respuesta en F-ZT0 y F-ZT2 fue la misma que la que se observó en los grupos 22A y 22A-R respectivamente. Únicamente fue evidente en casi todos los grupos un aumento en la *c-Fos-IR* en F-ZT8, que coincidió con el inicio de la actividad nocturna.

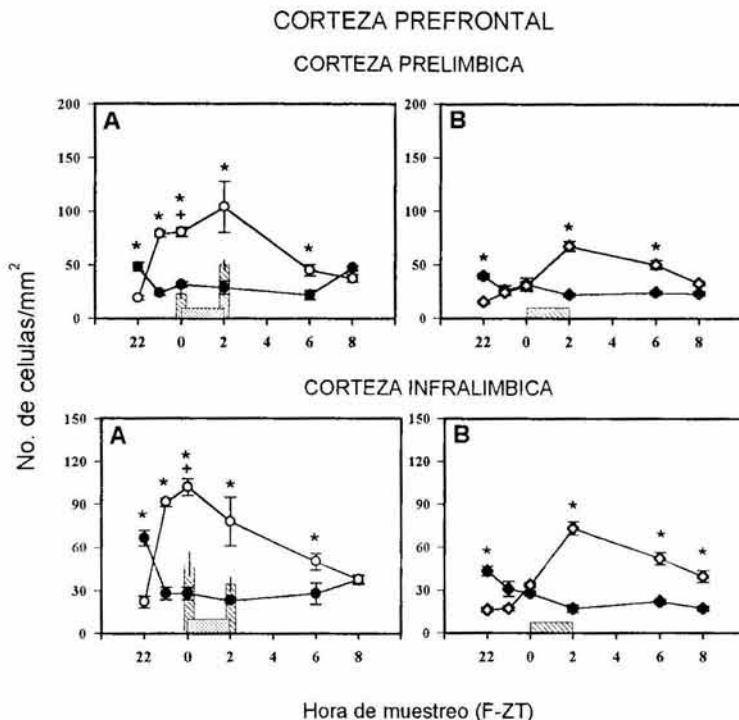




**Figura 27.** Patrón temporal del número de células *c-Fos-IR* de las tres regiones del hipocampo, (A) El grupo RA (círculos claros), mostró una fluctuación temporal que solo es significativa en CA1 diferente del grupo AL (círculos oscuros). (B) los grupos de ayuno no mostraron fluctuaciones, PE (rombos claros) y A (rombos oscuros). Otras indicaciones como en figura 13.

La corteza prefrontal se subdividió en prelímbica (CPL) e infralímbica (CIL). En ambas regiones, las ratas del grupo AL mostraron una fluctuación en el número de células c-Fos-IR con los puntos más altos al principio de la fase de luz F-ZT22. Las ratas del grupo RA mostraron un incremento en el número de células c-Fos-IR anticipando el alimento desde el punto temporal F-ZT23 alcanzando el máximo en F-ZT0 y disminuyendo en F-ZT6, aunque esta activación celular todavía fue diferente estadísticamente del grupo AL. El ANOVA de 2 vías indicó diferencias en el factor tiempo, grupo y en su interacción (*Tabla 6*). El número de células c-Fos-IR mostró una diferencia estadística al comparar el punto temporal de F-ZT0 del grupo RA con el grupo 22A (CIL,  $F_{(1,10)}=8.97$ ;  $p<0.01$ ; CPL,  $F_{(1,10)}=2.17$ ;  $p<0.001$ ).

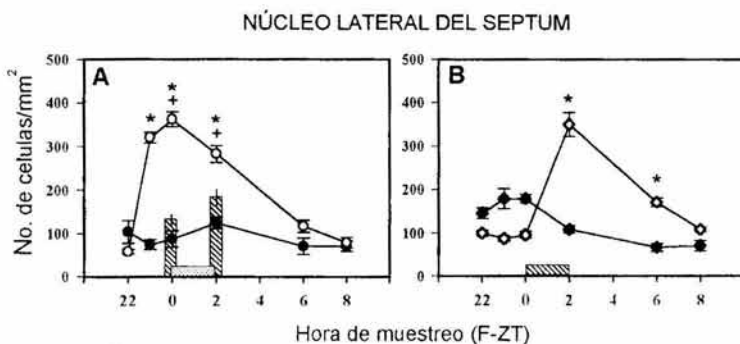
El número de células c-Fos-IR en el punto temporal F-ZT2 de el grupo RA no mostró diferencia estadística al compararlo con el grupo 22A-R (CIL,  $F_{(1,10)}=4.88$ ; NS, CPL,  $F_{(1,10)}=3.85$ ; NS) (*Fig. 28 A*). En las ratas del grupo A de ambas regiones de la CPF mostraron un patrón temporal de activación neuronal asociada a la alternancia luz-oscuridad igual al grupo AL. En las ratas del grupo PE el número de células c-Fos-IR mostró un patrón temporal que sugiere persistencia del patrón de sincronización, ya que mostró una distribución del número de células c-Fos-IR asociado con el momento en que se esperaba el alimento. (*Fig. 28B*).



**Figura 28.** Patrón temporal de la activación celular de la corteza Prefrontal, (A) En la sincronización por alimento es claro el fenómeno de anticipación en el grupo RA (círculos claros), mostrando una fluctuación temporal asociada al alimento y distinto del grupo AL (círculos oscuros). En B el grupo PE (rombos claros) mostró una fluctuación relacionada al momento subjetivo de alimentación diferente del grupo control A (rombos oscuros), (\*) indica diferencia estadística entre AL y RA,  $p < 0.001$ ; (+) RA distinto de 22A y de 22A-R,  $p = 0.001$ . Otras indicaciones como en figura 13.

En el núcleo SL el número de células c-Fos-IR en las ratas del grupo AL no mostró un patrón temporal de activación. Por el contrario, el número de células c-Fos-IR en las ratas del grupo RA mostró una importante fluctuación relacionada con el momento de alimentación, aumentando desde una hora antes de la llegada del alimento en F-ZT23 y F-ZT0, respuesta que disminuyó después del alimento (Fig. 29). Este patrón de activación fue estadísticamente significativo al compararlo con el grupo AL (Tabla 6) y también fue distinto de las respuestas del ayuno y

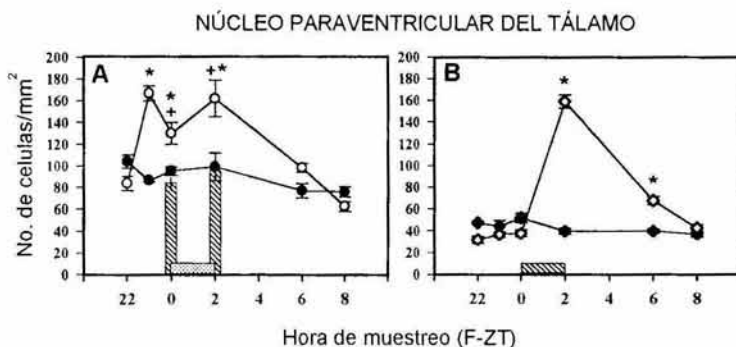
realimentación de los grupos 22A ( $F_{(1,10)}=139.05;p<0.001$ ) y 22A-R ( $F_{(1,10)}=7.75;p<0.01$ ) respectivamente. En las ratas del grupo PE se vió un aumento en el número de células c-Fos-IR con un patrón temporal similar al de la sincronización ya que este aumento en la actividad estuvo en relación con el momento que se esperaba el alimento y al compararlo con el grupo A fue estadísticamente distinto (Tabla 7).



**Figura 29.** Patrón temporal en el número de células c-Fos-IR en el SL, (A) en el grupo AL (círculos oscuros) y RA (círculos claros). En (B) el número de células c-Fos-IR del grupo PE (rombos claros) mostró un patrón de persistencia y fue diferente del grupo A (rombos oscuros), (\*) indica diferencia estadística entre AL y RA,  $p<0.001$ ; (+) RA distinto de 22A y de 22A-R,  $p<0.001$ . Otras indicaciones igual a la figura 13.

El núcleo PVT mostró un patrón de activación muy similar al observado en el séptum lateral, donde el número de células c-Fos-IR en el grupo AL no presentaron fluctuaciones. El número de células c-Fos-IR en grupo RA mostró un aumento desde 2 horas antes de presentarse el alimento en F-ZT23 y F-ZT0, activación que se mantuvo en F-ZT2. Esta activación celular fue estadísticamente distinta al compararla con la observada en el grupo AL (Tabla 6). El número de células c-Fos-IR de los puntos temporales F-ZT0 y F-ZT2 de las ratas del grupo RA fue diferente de los grupos 22A ( $F_{(1,10)}=8.84;p<0.01$ ) y 22A-R ( $F_{(1,10)}=12.78;p<0.01$ )(Fig. 30A). En el grupo PE se observó un aumento en el número de células c-Fos-IR con un patrón temporal que sugiere una persistencia de la sincronización, ya que este aumento en la actividad está en relación con el

momento en que se esperaba el alimento. El ANOVA mostró una diferencia estadística al compararlo con el grupo A en el factor grupo, tiempo y en la interacción de ambos (Tabla 7) (Fig. 30B).



**Figura 30.** Número de células c-Fos-IR en el SL (A) en el grupo AL (círculos oscuros) y RA (círculos claros). En (B) el número de células c-Fos-IR del grupo PE (rombos claros) es diferente del grupo A (rombos oscuros), (\*) indica diferencia estadística entre AL y RA,  $p < 0.001$ ; (+) RA distinto de 22A y de 22A-R,  $p < 0.001$ . Otras indicaciones igual a la figura 13.

**Tabla 5.** Valores estadísticos obtenidos con un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) para medidas independientes, para el grupo RA y el control A.

NÚCLEO AMÍGDALA	GRUPO		TIEMPO		G x T	
	F <sub>(1,60)</sub>	p<	F <sub>(5,60)</sub>	p<	F <sub>(5,60)</sub>	p<
Central	198.0	.001	19.35	.001	28.44	.001
Medial	45.9	.001	16.1	.001	13.2	.001
Basolateral	5.7	.001	10.8	.001	17.6	.001
NBST	18.6	.001	4.1	.001	6.36	.001
PVT	35.8	NS	18.1	.001	12.7	.001
SL	160.7	.001	39.6	.001	35.3	.001
CPL	38.57	.001	5.94	.001	13.92	.001
CIL	57.90	.001	5.98	.001	24.3	.001
Hipocampo Ca1	.13	NS	12.5	.001	3.64	.01
Ca2	8.52	NS	2.14	NS	.82	NS
Ca3	2.24	NS	.52	NS	.81	NS

**Tabla 6.** Valores estadísticos obtenidos con el análisis de varianza de dos vías (ANOVA) para medidas independientes, para el grupo PE y su control A, en seis puntos temporales

NÚCLEO AMÍGDALA	GRUPO		TIEMPO		G x T	
	F <sub>(1,60)</sub>	p<	F <sub>(5,60)</sub>	p<	F <sub>(5,60)</sub>	p<
Central	10.8	.01	15.74	.001	2.43	.05
Medial	.31	NS	4.37	.01	6.8	.001
Basolateral	2.11	NS	5.22	.001	2.96	.05
NBST	23.7	.001	5.86	.001	12.38	.001
PVT	85.91	.001	84.1	.001	103.0	.001
SL	13.13	.001	26.9	.001	49.9	.001
CPF	21.24	.001	9.64	.001	25.57	.001
CIL	47.03	.001	11.85	.001	47.9	.001
Hipocampo Ca1	12.4	.001	9.68	.001	11.37	.01
Ca2	.000	NS	.81	NS	1.94	NS
Ca3	.400	NS	1.06	NS	1.18	NS

## DISCUSIÓN GENERAL:

### *Estructuras del sistema nervioso central que se activan después de la ingestión de alimento.*

De acuerdo a la primera de nuestras hipótesis "las estructuras del sistema nervioso central de las ratas sincronizadas con alimento que muestren una expresión de la proteína c-Fos durante las horas posteriores a la ingestión serán estructuras que responden a señales digestivas y que pueden constituir la vía de sincronización al reloj sincronizado por el alimento".

Con base en esto, los resultados de la presente tesis muestran que durante la sincronización por el alimento existe un aumento de células c-Fos-IR después del evento de alimentación en todas las estructuras del tallo cerebral evaluadas y esta actividad no existe en condiciones de ayuno. La reducción en el número de neuronas c-Fos-IR, en estos núcleos fue probablemente generado, por un estado catabólico causado por el ayuno de 3 días. Como el patrón de activación celular observado en la sincronización no persiste en condiciones de ayuno, asumimos que la activación de células c-Fos-IR en todos estos núcleos es por el alimento y es una respuesta a las señales generadas por el alimento y participan exclusivamente con las vías de sincronización por el alimento.

El NTS es la mayor estructura en el sistema nervioso central a donde llega y hace relevo la información neural aferente proveniente principalmente del sistema gastrointestinal. La región caudal del NTS recibe aferente del estómago, del intestino y del hígado. Asumimos, por lo tanto, que el incremento de células c-Fos-IR observadas en F-ZT2 y F-ZT6 es una consecuencia de la distensión gástrica consecuente al consumo de la gran cantidad de alimento ingerido en dos horas. En estudios previos se ha reportado un incremento de células c-Fos-IR en el NTS después de una distensión del estómago producida por la insuflación de un balón gástrico (Fraser y Davison, 1993) o inducida por alimentación (Emond y cols., 2001). En este estudio el número de células c-Fos-IR en F-ZT2 y en F-ZT6 en el grupo RA fue diferente del esperado después de una alimentación regular,



tal como se observa en el grupo 22F-R. Estos resultados son consistentes con estudios previos que reportan un incremento de células c-Fos-IR en los núcleos del tallo cerebral después de la alimentación. (Emond y Weingarten. 2001; Olsen y cols. 1993). Sin embargo, las señales generadas en las ratas sincronizadas por el alimento fueron diferentes y más intensas que las que se producen por la activación visceral después de un alimento regular. En un estudio previo de nuestro grupo, reportamos que el estómago de ratas en sincronización desarrolla una capacidad de distensión que alcanza cerca de 200% por arriba de los estómagos de ratas en condiciones de AL después de una alimentación regular. Estos estómagos de ratas en el grupo RA mostraron un vaciamiento gástrico lento que permite un proceso de digestión y absorción por muchas horas (Martínez-Merlos y cols. 2004), y pueden reflejar procesos de ajuste ante esta manipulación para permitir mejor aprovechamiento del corto intervalo de alimentación. Estos procesos de ajuste se han descrito también en conejos neonatos que se alimentaron sólo una vez por día, por un periodo muy corto de succión (Escobar y cols. 2000). Es posible que este aumento en la distensión gástrica esté provocando la intensa activación de c-Fos-IR en células del NTS, por el aumento de la estimulación vagal aferente, tal como la describen Rinaman y cols.(1998) y McCann y Rogers (1992).

A pesar de que el número de células c-Fos-IR fue similar en todas las regiones del NTS en F-ZT2, en la región rostral fue más evidente la disminución del número de células inmunoreactivas en F-ZT6. La región rostral del NTS recibe aferentes de los nervios glosofaríngeo, facial, neumogástrico (vago) e hipogloso, que transmiten información sensorial y motora de la boca y lengua (Berthoud y Nuehuber. 2000). Así, la disminución de células c-Fos-IR en esta región durante F-ZT6 en animales del grupo RA, es probablemente debida a la reducción de señales orofaríngeas producidas por la conducta de alimentación.

El número de células c-Fos-IR en la AP aumentó después del momento de alimentación en F-ZT2 y F-ZT6 con un patrón similar al observado en el NTS. Sin embargo, la respuesta en F-ZT2 de las ratas del grupo RA no fue diferente de la respuesta esperada después de un episodio regular de alimentación contrario a lo

observado en el grupo 22F-R, sugiriendo que las señales que llegan al AP de las ratas del grupo RA son de la misma naturaleza que las generadas después de un evento regular de alimentación.

El Área Postrema es un órgano circunventricular que carece de barrera hematoencefálica, y responde principalmente a señales humorales de la periferia como la colecistocinina (CCK), y no responde a los mecanismos de distensión del estómago por un balón gástrico (Fraser y Davison. 1993, 1994). Esto sugiere fuertemente que bajo RA las señales humorales que se generan después del evento de alimentación son similares a las que generan por un evento regular de alimentación. En un estudio previo, se mostró que la lesión electrolítica del AP en ratas no produce efectos sobre la sincronización por alimento (Davison y cols. 2001), lo cual resalta la relevancia de la información neural como una vía de sincronización para el reloj sincronizado por el alimento.

En el PBN el número de células c-Fos-IR en RA mostró un patrón similar al que se observó en el NTS, con un aumento en F-ZT2 y en F-ZT6, y diferente a la respuesta observada después del evento de alimentación de las ratas del grupo de 22A-R. El PBN es un núcleo de relevo donde proyectan el NTS y AP (Berthoud. 2002; Herbert y cols. 1990). Así, la activación de células c-Fos-IR en las ratas del grupo RA fue probablemente debida a la información generada por la distensión gástrica y las señales orofaríngeas del NTS. El patrón de células c-Fos-IR fue similar en ambas regiones medial y lateral, probablemente porque ambas reciben las mismas aferencias del NTS y el AP (Herbert y cols. 1990). En un estudio previo se reportó que las lesiones con ácido iboténico del PBN produce una atenuación de la AA. Los autores concluyen que el PBN es una estructura de relevo de la periferia hacia el hipotálamo, y hacia otras regiones de el cerebro (Herbert y cols. 1990), por lo que las lesiones eliminaron parcialmente la información ascendente para sincronizar al RSA. (Davison y cols. 2000).

El DMX mostró una respuesta similar a la observada en los grupos 22A y 22A-R, que fue la respuesta esperada para un evento regular de alimentación. El DMX es la estructura principal de salida del sistema parasimpático hacia la periferia, y recibe aferentes directas del núcleo paraventricular hipotálmico (Buijs

y cols. 2001), esta estructura también mostró un aumento en el número de células c-Fos-IR después del momento de alimentación (Allingham y cols. 1998; Angeles-Castellanos y cols. 2004; Caba y cols. 2003). La información del PVN y NTS proyectan al DMX (Rinamar. 1998) y el DMX al sistema digestivo, a través del nervio vago para generar el inicio de los eventos de digestión. La respuesta del tracto digestivo promueve múltiples señales de retroalimentación neurales y humorales que contribuyen a una correcta coordinación de los eventos asociados con la digestión. Sin embargo, esta respuesta no fue diferente de las ratas del grupo RA de la respuesta mostrada por los grupos controles 22A y 22A-R.

En el PVN se observó una intensa activación de células c-Fos-IR después del consumo de alimento en las ratas del grupo RA. Esta respuesta no persiste en condiciones de ayuno, aunque durante el momento esperado de alimentación el grupo PE mostró un pequeño incremento de células c-Fos-IR, este patrón de activación fue estadísticamente diferente del grupo A. En estudios previos se ha indicado que el PVN es un núcleo que integra la información proveniente de la distensión gástrica y de sustratos que se generan durante la ingestión. También representa una importante vía de salida para el sistema nervioso autónomo modulando las funciones motoras durante la digestión, funciones de secreción gastrointestinal y pancreática a través de proyecciones hacia NTS y DMX (Buijs y cols. 2001; Rinamar. 1998). La distensión gástrica genera activación del PVN que ha sido observada a través de la expresión de la proteína c-Fos, liberación de noradrenalina y oxitocina (Caba y cols. 2003; Nelson y cols. 1998; Ueta y cols. 2000). Como se mencionó, las ratas bajo sincronización por alimento desarrollan una capacidad excepcional de distensión gástrica, que también se ha reportado previamente en conejos jóvenes (Escobar y cols.2000). Por lo que sugerimos que el aumento de células c-Fos-IR en el PVN observada en el grupo RA puede estar generado por la distensión gástrica por el alimento y que la respuesta disminuida que se observa en el grupo PE, corresponde a la persistencia del consumo de agua, como se ha reportado previamente (Escobar y cols. 2002).

En resumen nuestros resultados indican que los núcleos del tallo cerebral están involucrados en la transmisión de información gustativa y digestiva ya que son

activados después del momento de alimentación en el protocolo de sincronización. Esto también indica que el NTS, PBN y PVN muestran un incremento de células c-Fos-IR en respuesta a la sincronización por alimento diferente a la observada al grupo que se alimentó por una sola ocasión. La respuesta diferente pudo haber sido generada por la modificación de respuestas viscerales debido a mecanismos de ajuste del estómago, y de otros procesos digestivos. Además, las señales de retroalimentación del hipotálamo pueden también modular la respuesta de estos núcleos para optimizar la digestión de alimento bajo estas condiciones de restricción del alimento.

*Estructuras del sistema nervioso central que se activan antes de la ingestión de alimento.*

Con relación a nuestra segunda hipótesis donde mencionamos que "en ratas sincronizadas con alimento, la expresión de la proteína c-Fos durante horas previas al alimento indicará, aquellas estructuras asociadas a la conducta de anticipación y que, posiblemente constituyen vías de salida del reloj sincronizado por el alimento". Encontramos una importante activación de los núcleos de la amígdala CeA, MeA y BLA durante la anticipación al alimento que fue similar en las tres subdivisiones. Las conexiones anatómicas de estas estructuras sugieren una importante participación de la amígdala en la conducta de ingestión. De acuerdo a las conexiones específicas de cada uno de estos núcleos, especulamos que la activación celular observada pudiera relacionarse con diferentes eventos que se presentan durante la anticipación al alimento..

Basados en la relación de la MeA con las cortezas piriforme y entorrinal, y el complejo del hipocampo, los resultados sugieren que esta activación es generada por estímulos dependientes del sistema olfativo durante el forrajeo que acompaña a la AA. Esta conducta disminuyó en el momento de iniciarse la ingestión de alimento, por lo que proponemos que se trata de una estructura que participa en las salidas del RSA.

Debido a que la CeA establece conexiones con el LH, áreas corticales de asociación, incluyendo la corteza prefrontal y el sistema de activación del tallo cerebral tal como el área ventral tegmental (dopamina), *locus coeruleus* (noradrenalina) y núcleo dorsal del rafe (5-HT), se le ha relacionado con los sistemas de activación conductual (arousal). Este núcleo establece también conexiones recíprocas con núcleos del tallo cerebral. Recibe aferencias con información de salivación y de tipo orofaríngeo que llegan a través del NTS (Ter Horst y Streefland. 1994) y sus eferencias transmiten señales hacia las vísceras para mediar respuestas asociadas al alertamiento y conductas ingestivas (Petrovich y cols. 2002). De tal manera, los datos sugieren una participación de la CeA como parte de los mecanismos de activación conductual y visceral propios de la conducta de anticipación. De la cual se desprende que esta estructura participe como parte de las vías de salida del RSA.

Por otro lado, la BLA mostró también un patrón de activación inmediatamente antes del alimento y durante todo el intervalo de alimentación. Ya que la amígdala basolateral mantiene conexión con la corteza primaria del gusto y con el hipotálamo. La BLA recibe información del sabor directamente del NTS y PBN, mantiene conexiones recíprocas con áreas del hipotálamo (Cardinal y cols. 2002), de particular relevancia se ha reportado que la BLA y la CeA se encuentran involucrados en la valoración hedónica del alimento (Kesner y cols. 1989; Salinas y cols. 1996). Además las conexiones anatómicas que este núcleo posee con el hipotálamo en particular con el LH sugieren que se encuentra involucrado el inicio de la conducta de alimentación (Elmqvist y cols. 1999).

Por sus conexiones, consideramos que la activación del BLA previa a la alimentación pudo asociarse a la activación de sistemas para el inicio de la alimentación y que la activación posterior durante la alimentación pudo generarse por las sensaciones gustativas asociadas a la ingestión.

Otros efectos anticipando el alimento observados en este estudio fue la activación del TM y el PeF durante las horas previas y después del acceso al alimento. Ambas estructuras están localizadas en el hipotálamo posterior y se encuentran relacionadas con el sistema de activación conductual (arousal), (Haas

y Panula. 2003; Willie y cols. 2001). El área perifornical del hipotálamo lateral fue descrita recientemente como una región importante en el inicio de la activación conductual, ahí se encuentran las neuronas productoras de orexinas que se han involucrado en este fenómeno (Willie y cols. 2001). Estas neuronas proyectan hacia el cerebro anterior y regiones del tallo cerebral (Moore y cols. 2001). Basándose en la localización de los receptores de orexina se ha propuesto que este sistema está involucrado en la regulación de los ciclos sueño-vigilia, actividad locomotora así como la homeostasis energética y la conducta de alimentación (Preti. 2002; Willie y cols. 2001). De lo anterior, suponemos que la activación del PeF anticipando el alimento puede estar asociado por un lado a los mecanismos de alertamiento y por el otro, a los mecanismos para iniciar la ingestión. El TM es un núcleo caracterizado por ser un grupo de neuronas histaminérgicas que proyecta al tallo cerebral, hipotálamo y corteza cerebral (Inagaki y cols. 1990). Estudios recientes implican al TM como un posible mediador de la transición entre el sueño y la vigilia por su papel en el arousal (Lin y cols. 1988, 1989). Un estudio previo (Inzunza y cols. 2000) describió una intensa activación neuronal en el TM relacionada a la activación conductual en ratas que anticipan a uno de dos momentos de alimentación diarios. Nuestros datos coinciden con los encontrados en este estudio y podemos especular que el incremento de c-Fos-IR en el TM puede estar relacionado con el estado de activación conductual de las ratas durante la anticipación y durante la alimentación por lo que proponemos que es una estructura más involucrada con las manifestaciones de AA (Angeles-Castellanos y cols. 2004).

*Estructuras del sistema nervioso central que se activan en condiciones de persistencia de la sincronización por alimento.*

La tercera hipótesis que planteamos en este trabajo fue que "en ratas sincronizadas con alimento, la persistencia de patrones de expresión de la proteína c-Fos en ayuno, indicará estructuras en donde se presentan oscilaciones sostenidas y que pudieran ser sustrato del reloj". En este trabajo encontramos estructuras que cumplen esta consigna; también se observó que se trata de estructuras especialmente involucradas con mecanismos de motivación por un lado, y por el otro, estructuras involucradas directamente con el control homeostático del metabolismo energético.

Entre aquellas involucradas con mecanismos de motivación encontramos que la CPF, NBST, SL y PVT mostraron un patrón de activación muy similar durante la sincronización, caracterizado por incremento de c-Fos-IR en horas previas al acceso al alimento, activación que se mantiene durante las dos horas de alimentación. Esta respuesta semejante en todas estas estructuras puede ser debida a que mantienen una interconexión compartiendo información y además que se les ha implicado en el procesamiento de las conductas emotivas (Cardinal y cols. 2002; Ghashghaei y Barbas. 2002).

La CPF mostró un patrón de activación que persistió en condiciones de ayuno en F-ZT2. La CPF es la corteza que recibe información del sabor, olfato e impulsos somato-sensoriales generados por la textura del alimento en la boca, que son estímulos que son típicamente reconocidos como reforzadores primarios. La CPF tiene un papel especial en la generación de las conductas emotivas y motivacionales como resultado del análisis de estos estímulos sensoriales, así como ante la expectancia del alimento (Rolls. 2004). De acuerdo a estos datos, proponemos que la activación que muestra la CPF en este estudio puede estar generada por el estado motivacional y de expectancia en el que se encuentran los animales durante la sincronización. La actividad de persistencia que muestra esta estructura durante el ayuno sugiere que tiene la capacidad de participar en un sistema de estimación de tiempo y se encuentra participando con los mecanismos del reloj sincronizado por el alimento.

En un trabajo previo, aunque no en esta misma región si no en la corteza periforme, se demostró la existencia de genes reloj *per1* y *per2* con una expresión rítmica asociada con el ciclo luz-oscuridad. Cuando se sincronizó a los animales con alimento, la acrofase de expresión de estos dos genes mostró un adelanto ajustándose con el momento de alimentación (Wakamatsu y cols. 2001). En este mismo trabajo, al igual que los resultados de esta tesis, el NSQ no se afectó por la sincronización por alimento sugiriendo que la fase de activación y expresión de genes reloj en esta estructura y en otras puede estar directamente asociada con la expresión circadiana del reloj sincronizado por el alimento (Angeles-Castellanos y cols. 2004; Wakamatsu y cols. 2001).

En el NBST la expresión de c-Fos-IR mostró un patrón de activación en fase con la llegada del alimento que persistió durante el ayuno con un patrón temporal similar al impuesto por el alimento. El NBST es una estructura del cerebro anterior que modula una serie de eventos fisiológicos y motivacionales, entre los que se incluyen neuroendocrinos, autonómicos y respuestas conductuales de diferente tipo como estrés, conducta de ingestión de alimento, reproducción (Figueiredo y cols. 2003; Walker y cols. 2001, 2003). Estos procesos en los que participa el NBST presentan un control de tipo circadiano, ya que en un estudio previo se encontró evidencia anatómica y electrofisiológica de que este núcleo recibe influencia del NSQ y que muestra un ritmo sincronizado de actividad neuronal eléctrica (Yamazaki y cols. 1998; Leak y Moore. 2001), con fase y periodo impuesto por el NSQ. Tales evidencias de conexión del NBST con sistemas del SNC, involucradas con el estrés y procesos motivacionales, entre ellos importantemente con la amígdala, ponen al NBST en una posición de influencia específica sobre ritmos fisiológicos y conductuales. En un estudio reciente se demostró que el NBST muestra una expresión rítmica del gen reloj *per2* en ratas bajo ciclo luz-oscuridad en sincronización con el ritmo de expresión de este mismo gen en el NSQ. Cuando se destruye el NSQ el ritmo de expresión de este gen en el NBST desaparece, lo cual sugiere que es dependiente del NSQ o que se encuentra acoplado a éste (Amir y cols. 2004). En el presente estudio demostramos que cuando los animales se sincronizaron por el alimento, el NBST



sincroniza su actividad neuronal a la fase de alimentación, esto observado por la expresión de proteína c-Fos. Sobre todo encontramos que su actividad se desacopla del NSQ, ya que este último no se afectó con el protocolo de sincronización por alimento. Con lo anterior, podemos sugerir que el NBST puede estar formando parte importante de los mecanismos del reloj sincronizado por el alimento e independiente del NSQ.

El SL mostró una activación similar al de la CPF durante la sincronización y una persistencia de este patrón sincronizado durante el ayuno. Esta estructura es una parte integrativa del sistema límbico, y mantiene gran cantidad de interconexiones con áreas límbicas corticales, con áreas mesencefálicas y el tallo cerebral. Se ha involucrado en el control de una variedad de procesos fisiológicos y conductuales relacionados con funciones cognoscitivas (aprendizaje y memoria), emociones, miedo, agresión y estrés, así como regulación autonómica del consumo de agua y alimento, fiebre y osmoregulación entre otras. Las principales neuronas del SL son GABA-érgicas y reciben estimulación de la corteza prefrontal, de la amígdala y NBST. Este núcleo proyecta entre otros hacia el LH (Alonso y Köhler. 1984) y por ello pensamos que su activación puede estar generada por una serie de eventos relacionados con el estado motivacional que produce la restricción del alimento, entre ellos estrés.

El PVT mostró una sincronización en la expresión de c-Fos-IR al momento de la llegada del alimento y además mostró un patrón de persistencia de la sincronización durante el ayuno. Este núcleo es una estructura multisensorial y recibe información de diferentes núcleos del tallo cerebral, CPF, amígdala y núcleos hipotalámicos incluyendo el NSQ (Groenewegen y Berendse. 1994). Este núcleo se encuentra implicado en el control de algunos aspectos de los estados de sueño-vigilia, que sugieren que la inervación que recibe de el *locus coeruleus* y del núcleo del rafe puede estar generando la expresión de c-Fos durante la fase de actividad en animales diurnos y nocturnos (Novak y Núñez. 1998; Novak y cols. 2000). Esto sugiere que la actividad que mostró este núcleo durante la sincronización por alimento puede estar generada por la activación conductual que muestran los animales antes de la llegada del alimento. Además de que el PVT es

una importante interfase entre el sistema límbico y el NSQ y se ha considerado como una importante vía de sincronización no-fótica (Moga y Moore. 2000), que pudiera estar mediando la sincronización por alimento.

El DMH mostró un ligero incremento de células c-Fos-IR en las horas previas y un incremento significativo después del consumo de alimento y este patrón de activación persistió en condiciones de ayuno. El DMH es considerado una estructura intermediaria entre los núcleos de la zona medial del hipotálamo, debido a las proyecciones aferentes y eferentes entre el VMH y LH (Bernardis y Billinger.1998) y los altos niveles de neuronas glucoresponsivas por lo cual se le considera un integrador de funciones metabólicas (Berthoud. 2002). Además, con trazadores neuronales se han podido identificar proyecciones de primer orden entre el NSQ y el DMH ( Deurveilher y cols. 2002), lo cual sugiere que puede ser una importante vía de salida para la transmisión de la ritmicidad circadiana. Los datos presentes indican que bajo restricción de alimento el DMH se desacopla del NSQ y muestra un patrón de activación celular con una relación de fase con el alimento.

El LH también mostró un patrón de activación celular similar al DMH, pero en esta estructura la activación en ayuno mostró una activación celular en persistencia de la sincronización que fue significativa. Kurumiya y Kawamura en 1991 reportaron actividad eléctrica multiunitaria en el LH de ratas que fueron sincronizadas por el alimento y registradas por varios ciclos después en ayuno, sugiriendo una importante relación del LH y el reloj sincronizado por el alimento. Además el LH se caracteriza por abundantes fibras y neuronas que proyectan a la corteza, el tallo y neuronas autonómicas de la médula espinal por lo que se le considera como una estructura de integración que transmite información del balance energético a estructuras extra hipotálamicas (McMinn y cols. 2000). Ambas estructuras, el DMH y LH, juegan un importante papel integrativo en la transmisión y procesamiento de señales metabólicas y la conducta de alimentación y, tomando en cuenta estas evidencias, nosotros sugerimos que ambas estructuras pueden ser elementos importantes en el mecanismo del reloj sincronizado por el alimento aunque no se puede descartar que pudieran constituir un elemento de las vías de salida.

## CONCLUSIONES.

- El reloj sincronizado por el alimento se encuentra constituido por un sistema multiestructural, donde algunas estructuras participan en las vías de sincronización, otras con los mecanismos del reloj y finalmente otras en las vías de salida según los resultados de esta tesis (ver modelo *Figura 31*).
- La sincronización por alimento induce la actividad de estructuras centrales que clásicamente se han involucrado con la regulación de la homeostasis energética y consumo de alimento, así como también estructuras involucradas con la respuesta hedónica que genera el alimento.
- Algunas respuesta observadas en este trabajo pudieran estar generadas por mecanismos de adecuación al protocolo de alimentación y no necesariamente estar involucradas con el reloj del alimento, sino como meras respuestas de ajuste ante la condición alimenticia.

De acuerdo a las hipótesis propuestas, se concluye que un modelo multiestructural para el RSA en el cual estructuras del tallo cerebral y el PVN participan como posibles vías de entrada, una serie de estructuras límbicas y de hipotálamo serían osciladores con capacidad de mantener estos ritmos sincronizados por el alimento, por lo menos nueve ciclos. Finalmente, algunas estructuras mostraron estar asociadas a la activación conductual que preceden al alimento, esto es la actividad de anticipación.

## MODELO DEL RELOJ SINCRONIZADO POR EL ALIMENTO

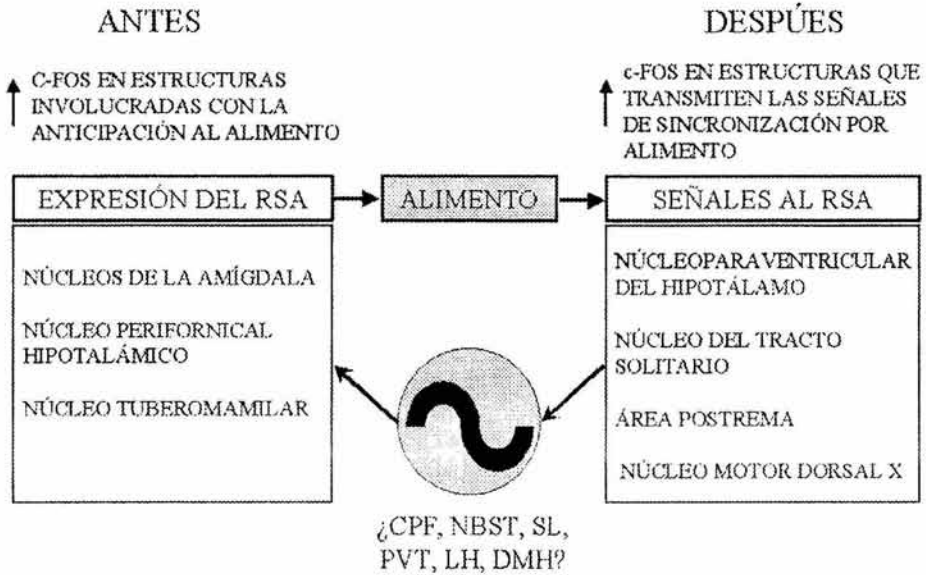


Figura 31. Propuesta para un modelo del RSA basado en la actividad celular observada por c-Fos-IR. Para este modelo se consideraron elementos de la vía de sincronización aquellas estructuras que mostraron activación después de la llegada del alimento. mecanismos del reloj aquellas estructuras que mostraron activación celular en ayuno semejante al observado durante la sincronización, y vías de salida y transmisión aquellas que mostraron activación antes de la llegada del alimento.

## REFERENCIAS

- Abe M, Herzog ED, Yamazaki S, Straume M, Tei H, Sakaki Y, Menaker M, and Block GD.** Circadian rhythms in isolated brain regions. *J. Neuroscience* 22:350-356 2002.
- Aguilar-Roblero R, García- Hernández F, Aguilar R, Arankowsky-Sandoval G and Drucker-Colin R.** Suprachiasmatic nucleus transplants functions as endogenous oscillator only in constant darkness. *Neurosci. Lett.* 69:47-52, 1986.
- Aguilar-Roblero R, Morin L and Moore RY.** Morphological correlates of circadian rhythms restoration induced by transplantation of the suprachiasmatic nucleus in hamster. *Experimental Neurology.* 130:250-260, 1994.
- Ahn S and Phillips AG.** Modulation by central and basolateral amygdalar nuclei of dopaminergic correlates of feeding to satiety in the rat nucleus accumbens and medial prefrontal cortex. *J. Neurosci.* 22:10958-10965, 2002.
- Alheid GF.** Amygdala and extended amygdala. In: Paxinos G, editor. *The rat nervous system*, San Diego: Academic Press; 495-578, 1995.
- Allingham K, von Saldern C, Brennan PA, Distel H and Hudson R.** Endogenous expression of c-Fos in hypothalamic nuclei of neonatal rabbits coincides with their circadian pattern of suckling-associated arousal. *Brain Res.* 783:210-218, 1998.
- Alonso A and Kohler C.** A study of the reciprocal connections between the septum and the entorhinal area using anterograde and retrograde axonal transport methods in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 225:327-343, 1984.
- Amir S, Waddington E, Robinson B and Stewart J.** A circadian rhythm in the expression of PERIOD2 protein reveal a novel scn-controlled oscillator in the oval nucleus of the bed nucleus of the stria terminalis. *Neurosci.* 24:781-790, 2004.
- Ángeles-Castellanos M, Aguilar-Roblero R, and Escobar C.** c-Fos expression in the hypothalamic nuclei of food-entrained rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 286: R159-R165, 2004.
- Aschoff J.** Freerunning and entrained circadian rhythms. *Handbook of Behavioral Neurobiology.* Vol. 4: *Biological Rhythms* (Jurgen Aschoff, Ed) New York: Plenum Press. 81-93, 1981.

- Attoub S, Moizo I, Sobhani I, Laigneau JP, Lewin MJ and Bado A.** The H3 receptor is involved in cholecystokinin inhibition of food intake in rat. *Life Sci.* 69:469-478, 2001.
- Baird JP, Travers SP and Travers JB.** Integration of gastric distension and gustatory responses in the parabrachial nucleus. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 281:R1581-593, 2001.
- Beck B.** KO<sup>+</sup> and organization of peptidergic feeding behavior mechanisms. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 25:143-158, 2001.
- Bernardis LL and Billinger LL.** The dorsomedial hypothalamic nucleus revisited: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 218:284-306, 1998.
- Berthoud HR and Neuhuber WL.** Functional and chemical anatomy of afferent vagal system. *Auton. Neurosci.* 85:1-17, 2000.
- Berthoud HR.** Multiple neural system controlling food intake and body weight. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 26:393-428, 2002.
- Berthoud HR.** Anatomy and function of sensory hepatic nerves. *Anat. Rec.* 280:827-857, 2004.
- Bittencourt JC and Elias CF.** Melanin-concentrating hormone and neuropeptide EI projections from the lateral hypothalamic area and zona incerta to the medial septal nucleus and spinal cord: a study using multiple neuronal tracer. *Brain Res.* 805:1-19, 1998.
- Bolles RC and De Lorge J.** The rat's adjustment to a-diurnal feeding cycles. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 55:760-762, 1962.
- Bolles RC and Stokes LW.** Rat's anticipation of diurnal and a-diurnal feeding. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 60(2):290-294, 1965.
- Broberger C, Johansen J, Johansson C, Schalling M and Hokfelt T.** The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:15043-15048, 1998.
- Broberger C.** hypothalamic cocaine and amphetamine-regulated transcript (CART) neurons: histochemical relationship to thyrotropin-releasing hormone, melanin-concentrating hormone, orexin/hypocretin and neuropeptide Y. *Brain Res.* 848:101-113, 1999.
- Broberger C and Hokfelt T.** Hypothalamic and vagal neuropeptide circuitries regulating food intake. *Physiol. Behav.* 74:669-682, 2001.

- Buijs RM, Chun SJ, Niiijima A, Romijn HJ and Nagai K.** Parasympathetic and sympathetic control of the pancreas: a role for the suprachiasmatic nucleus and other hypothalamic centers that are involved in the regulation of food intake. *J. Comparative Neurology.* 432:405-423, 2001.
- Caba M, Ravirosa MJ, and Silver R.** Suckling and genital stroking induces Fos expression in hypothalamic oxytocinergic neurons of rabbit pups. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 143:119-128, 2003.
- Canteras NS, Simerly RB and Swanson LW.** Organization of projections from the ventromedial nucleus of the hypothalamus: a *Phaseolus vulgaris*-leucoagglutinin study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 348:41-79, 1994.
- Canteras NS, Simerly RB and Swanson LW.** Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 360:213-245, 1995.
- Cardinal R, Parkinson JA, Hall J and Everitt BJ.** Emotional and motivation: the role of the amygdala, ventral striatum, and prefrontal cortex. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 26:321-356, 2002.
- Cechetto DF and Saper CB.** Neurochemical organization of the hypothalamic projection to the spinal cord in the rat. *J. Comp. Neurol.* 272:579-604, 1988.
- Challet E, Solberg LC and Turek FW.** Entrainment in calorie-restricted mice: conflicting zeitgebers and free-running conditions. *Am. J. Physiol. Rregulatory. Integrative Comp. Physiol.* 274: R1751-R1761, 1998
- Challet E, Caldelas I, Graff C, and Pevet P.** Synchronization of the molecular clockwork by light- and food-related cues in mammals. *Biol. Chem.* 384:711-719, 2003.
- Cowley MA, Pronchuk N, Fan W, Dinulescu DM, Colmers WF and Cone RD.** Integration of NPY, AGRP, and melanocortin signals in the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence of a cellular basis for the adipostat. *Neuron* 24:155-163, 1999.
- Damiola F, Le Minh N, Preitner N, Kornmann B, Fleury-Olela F and Schibler U.** Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissue from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev.* 14:2950-2961, 2000.
- Davidson AJ and Stephan FK.** Plasma glucagon, glucose, insulin and motilin in rats anticipating daily meals. *Physiol. Behav.* 66:309-315, 1999.

- Davidson AJ, Cappendijk SL and Stephan FK.** Feeding-entrained circadian rhythms are attenuated by lesions of the parabrachial region in rats. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 278: R1296-R1304, 2000.
- Davidson AJ, Aragona BJ and Stephan FK.** Persistence of meal-entrained circadian rhythms following area postrema lesions in the rat. *Physiol. Behav.* 74:349-354, 2001.
- Davidson AJ, Stokkan K, Yamazaki S, and Menaker M.** Food-anticipatory activity and liver per 1-luc activity in diabetic transgenic rats. *Physiol. Behav.* 76:21-26, 2002.
- Davidson AJ, Poole AS, Yamazaki S, and Menaker M.** Is the Food-entrainable circadian oscillator in the digestive system?. *Genes. Brain and Behavior.* 2:32-39, 2003.
- DeurveilherS, Burns J and Semba K.** Indirect projections from the suprachiasmatic nucleus to the ventrolateral preoptic nucleus: a dual tract-tracing study in rat. *European J. Neurosci.* 16:1195-1213, 2002.
- Díaz-Muñoz M, Vazquez O, Aguilar-Roblero R and Escobar C.** Anticipatory changes in liver metabolism, entrainment of insulin, glucagon and corticosterone in food restricted rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 279: R2048-R2056, 2000.
- Elias CF, Lee C, Kelly J, Aschkenasi C, Ahima RS, Couceyro PR, Kuhar MJ, Saper CB and Elmquist JK.** Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron.* 21:1375-1385, 1998.
- Elmquist JK, Maratos-Flier E, Saper CB and Flier JS.** Unraveling the central nervous system pathways underlying responses to leptin. *Nat. Neurosci.* 1:445-450, 1998.
- Elmquist JK, Elias CF and Saper CB.** From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron.* 22:221-232, 1999.
- Emond MH and Weingarten HP.** Fos-like immunoreactivity in vagal and hypoglossal nuclei in different feeding states: a quantitative study. *Physiol. Behav.* 58:459-465, 1995.
- Emond M, Schwartz GJ and Moran TH.** Meal-related stimuli differentially induce c-Fos activation in the nucleus of the solitary tract. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 280:R1315-21, 2001.



- Escobar C, Díaz-Muñoz M, Encinas F and Aguilar-Roblero R.** Persistence of metabolic rhythmicity during fasting and its entrainment by restricted feeding schedules in rats. *Am. J. Physiol. Regulatory. Integrative Comp. Physiol.* 274:R1309-R1316, 1998.
- Escobar C, Hudson R, Martínez-Gomez M and Aguilar-Roblero R.** Metabolic correlates of the circadian pattern of suckling-associated arousal in young rabbits. *J. Comp. Physiol. A* 186:33-38, 2000.
- Escobar C, Mendoza JY, Salazar-Juarez A, Avila J, Hernandez-Munoz R, Diaz-Munoz M and Aguilar-Roblero R.** Rats made cirrhotic by chronic CCl4 treatment still exhibit anticipatory activity to a restricted feeding schedule. *Chronobiol. Int.* 19:1073-1086, 2002.
- Figueiredo HF, Bodie BL, Tauchi M, Dolgas CM and Herman JP.** Stress integration after acute and chronic predator stress: differential activation of central stress circuitry and sensitization of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Endocrinology.* 144:5249-5258, 2003.
- Follenius M, Brandenberg G and Hietter B.** Diurnal cortisol peaks and their relationship to meal. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 55:157-161, 1982.
- Fraser KA and Davison JS.** Meal-induced c-fos expression in brain stem is not dependent on cholecystokinin release. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 265:R235-R239, 1993.
- Fraser KA and Davison JS.** Gastric distention induced c-fos immunoreactivity in the rat brain stem. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 713:164-166, 1994.
- Fulwiler CE and Saper CB.** Cholecystokinin-immunoreactive innervation of the ventromedial hypothalamus in the rat: possible substrate for autonomic regulation of feeding. *Neurosci. Lett.* 53:289-296, 1985.
- Ghashghaei HT and Barbas H.** Pathways for emotion: interactions of prefrontal and anterior temporal pathways in the amygdala of the rhesus monkey. *Neuroscience.* 115:1261-1279, 2002.
- Greenberg HE, Sica AL, Scharf SM and Ruggiero DA.** Expression of c-fos in the rat brainstem after chronic intermittent hypoxia. *Brain Res.* 816:638-645, 1999.
- Groenewegen HJ and Berendse HW.** The specificity of the 'nonspecific' midline and intralaminar thalamic nuclei. *Trends Neurosci.* 17:52-57, 1994.
- Gruart A, Delgado JM, Escobar C y Aguilar-Roblero R.** Los relojes que gobiernan la vida. Fondo de cultura Económica, colección la ciencia par todos, 2002.

- Haas H and Panula P.** The role of histamine and the tuberomammillary nucleus in the nervous system. *Nature Rev.* 4:121-130, 2003.
- Herbert H, Moga MM, and Saper CB.** Connections of the parabrachial nucleus with the nucleus of the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat. *J. Comp. Neurol.* 293:540-580, 1990.
- Hermann GE, McCann MJ and Rogers RC.** Activation of the bed nucleus of the stria terminalis increases gastric motility in the rat. *J. Auton. Nerv. Syst.* 30:123-128, 1990.
- Hironaka S, Shirakawa T, Toki S, Kinoshita K and Oguchi H.** Feeding-induced c-fos expression in the nucleus of the solitary tract and dorsal medullary reticular formation in neonatal rats. *Neurosci. Lett.* 293:175-178, 2000.
- Honma K, Honma S and Hiroshige T.** Feeding-associated corticosterone peak in rats under various feeding cycles. *Am. J. of Physiol.* 246:R721-R726, 1984.
- Honma S, Honma K, Nagasaka T and Hiroshige T.** The ventromedial hypothalamic nucleus is not essential for the prefeeding corticosterone peak in rats under restricted daily feeding. *Physiol. Behav.* 39:211-215, 1987.
- Hurley KM, Herbert H, Moga MM and Saper CB.** Efferent projections of the infralimbic cortex of the rat. *J. Comp. Neurol.* 308:249-276, 1991.
- Inzunza O, Serón-Ferré MJ, Bravo H, and Torrealba F.** Tuberomammillary nucleus activation anticipates feeding under a restricted schedule in rats. *Neurosci. Lett.* 293:139-142, 2000.
- Ishikawa A and Nakamura S.** Convergence and interaction of hippocampal and amygdalar projections within the prefrontal cortex in the rat. *J. Neurosci.* 23:9987-9995, 2003.
- Jansen AS, Hoffman JL and Loewy AD.** CNS sites involved in sympathetic and parasympathetic control of the pancreas: a viral tracing study. *Brain Res.* 766:29-38, 1997.
- Kalra SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Horvath TL and Kalra PS.** Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocrinol. Rev.* 20:68-100, 1999.
- Kesner RP, Walser RD and Winzenried G.** Central but not basolateral amygdala mediates memory for positive affective experiences. *Behav. Brain Res.* 33:189-195, 1989.

- Klarsfeld A, Laufer R, Fontaine B, Devillers-Thiery A, Dubreuil C and Changeux JP.** Regulation of muscle AChR alpha subunit gene expression by electrical activity: involvement of protein kinase C and Ca<sup>2+</sup>. *Neuron*. 2:1229-1236, 1989.
- Konturek SJ, Konturek JW, Pawlik T and Brzozowski T.** Brain gut and its role in the control of food intake. *J. Physiol. Pharmacol.* 55:137-154: 2004.
- Kornhauser JM, Mayo KE and Takahashi JS.** Light, immediate-early genes, and circadian rhythms. *Behav. Genet.* 26:221-240, 1996.
- Krieger DT and Herbert H.** Comparison of synchronization of circadian corticosterone rhythms by photoperiod and food. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75:1577-1581, 1978.
- Krieger DT.** Regulation of circadian periodicity of plasma corticosteroid concentrations and of body temperature by time of food presentation. In *Biological Rhythms and Their Central Mechanisms*, M Suda, O Hayaishi and H Nakagawa, eds, pp 247-259, Elsevier/ North-Holland Biomedical Press Amsterdam, New York, Oxford, 1979.
- Krieger DT.** Ventromedial hypothalamic lesions abolish food-shifted circadian adrenal and temperature rhythmicity. *Endocrinology* 106:649-654, 1980.
- Kurumiya S and Kawamura H.** Damped oscillation of the lateral hypothalamic multineuronal activity synchronized to daily feeding schedule in rats with suprachiasmatic nucleus lesions. *J Bio Rhythms* 6:115-127, 1991.
- Laskiewicz J, Krolczyk G, Zurowski G, Sobocki J, Matyja A and Thor PJ.** Effects of vagal neuromodulation and vagotomy on control of food intake and body weight in rats. *J. Physiol. Pharmacol.* 54:603-610, 2003.
- Leak RK and Moore RY.** Topographic organization of suprachiasmatic nucleus projection neurons. *J. Comp. Neurol.* 433:312-334, 2001.
- Leibowitz S and Alexander J.** Hypothalamic serotonin in control of eating behavior, meal size, and body weight. *Biol. Psychiatry.* 44:851-864, 1998.
- Li C, Chen P and Smith MS.** Identification of neural input to the arcuate nucleus (ARH) activated during lactation: implication in the activation of neuropeptide Y neurons. *Brain Res.* 824:267-276, 1999.
- Lin JS, Sakai K and Jouvet M.** Evidence for histaminergic arousal mechanisms in the hypothalamus of cat. *Neuropharmacology.* 27:111-122, 1988.

- Lin JS, Sakai K, Vanni-Mercier G and Jouvet M.** 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, 1989.
- Ludwig DS, Tritos NA, Mastaitis JW, Kulkarni R, Kokkotou E, Elmquist J, Lowell B, Flier JS and Maratos-Flier E.** Melatonin-concentrating hormone overexpression in transgenic mice leads to obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 107:379-386, 2001.
- Martinez-Merlos MT, Angeles-Castellanos M, Díaz-Muñoz M, Aguilar-Roblero R, Mendoza J, Escobar C.** Dissociation between adipose tissue signals, behaviour and the food-entrained oscillator. *J. Endocrinol.* 181:53-63, 2004.
- McCann MJ and Rogers RC.** Impact of antral mechanoreceptor activation on the vago-vagal reflex in the rat: functional zonation of responses. *J. Physiol.* 453:401-411, 1992.
- McDonald AJ.** Topographical organization of amygdaloid projections to the caudatoputamen, nucleus accumbens, and related striatal-like areas of the rat brain. *Neuroscience.* 44:15-33, 1991.
- McMinn JE, Baskin DG, and Schwartz MW.** Neuroendocrine mechanisms regulating food intake and body weight. *Obesity reviews* 1:37-46, 2000.
- Mei N and Lucchini S.** Current data and ideas on digestive sensitivity. *J. Auton. Nerv. Syst.* 41:15-18, 1992.
- Mistberger RE and Rechtschaffen A.** Recovery of anticipatory activity to restricted feeding in rats with ventromedial hypothalamic lesions. *Physiol. Behav.* 33:227-235, 1984.
- Mistberger RE and Rusak B.** Food-anticipatory circadian rhythms in rats with paraventricular and lateral hypothalamic ablations. *J. Biol. Rhythms* 3:277-291, 1988.
- Mistberger RE and Mumby DG.** The limbic system and food-anticipatory circadian rhythms in the rat: Ablation and dopamine blocking studies. *Behav. Brain Res.* 47:159-168, 1992.
- Mistberger RE, McCann MJ and Rogers RC.** Impact of antral mechanoreceptor activation on the vago-vagal reflex in the rat: functional zonation of responses. *J. Physiol.* 453:401-411, 1992.
- Mistberger RE.** Circadian food-anticipatory activity: formal models and physiological mechanisms. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 18:171-195, 1994.

- Mogan MM and Moore RY.** Efferent projections of the paraventricular thalamic nucleus in the rat. *J. Comp. Neurol.* 359:221-138, 1995.
- Montarolo PG, Goelet P, Castellucci VF, Morgan J, Kandel ER and Schacher S.** A critical period for macromolecular synthesis in long-term heterosynaptic facilitation in *Aplysia*. *Science.* 234:1249-1254, 1986.
- Moore RY and Eichler ME.** Loss of circadian corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Research.* 42:201-206. 1972.
- Moore RY.** Circadian timing: En Zigmond, Bloom, et al. *Fundamental Neuroscience.* Academia Press. Cap. 45: 1189-1209,1998.
- Moore RY, Abrahamson EA, and Van Den Pol A.** The hypocretin neuron system: an arousal system in the human brain. *Arch. Ital. Biol.* 139:195-205, 2001.
- Morgan JI and Curran T.** Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes *fos* and *jun*. *Annu. Rev. Neurosci.* 14:421-451, 1991.
- Moriarty P, Dimaline R, Thompson DG and Dockray GJ.** Characterization of cholecystokininA and cholecystokininB receptors expressed by vagal afferent neurons. *Neuroscience.* 79:905-913, 1997.
- Nader K, Schafe GE and Le Doux JE.** Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature.* 406:722-726, 2000.
- Nelson EE, Albert JR, Tian Y and Verbalis JG.** Oxitocin is elevated in plasma of 10-day-old rats following gastric distension. *Dev Brain Res* 111:301-303, 1998.
- Nishijo H, Ono T, Uwano T, Kondoh T and Torii K.** Hypothalamic and amygdalar neuronal responses to various tastant solutions during ingestive behavior in rats. *J.Nutr.* 130(suppl9:954S-959S, 2000.
- Norgren R.** Taste pathways to hypothalamus and amygdala. *J. Comp. Neurol.* 166:17-30, 1976.
- Novak CM and Nunez AA.** Daily rhythms in Fos activity in the rat ventrolateral preoptic area and midline thalamic nuclei. *Am. J. Physiol.* 275:R1620-R1626, 1998.
- Novak CM, Smale and Nuñez AA.** Rhythms in Fos expression in brain areas related to the sleep-wake cycle in the diurnal *Arvicanthis niloticus*. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 278:R1267-R1274, 2000.

- O'Doherty J, Rolls ET, Francis S, Bowtell R, McGlone F, Kobal G, Renner B and Ahne G.** Sensory-specific satiety-related olfactory activation of the human orbitofrontal cortex. *Neuroreport* 11:399-403, 2000.
- Olds J.** Brain stimulation and the motivation of behavior. *Prog. Brain Res.* 45:401-426, 1976.
- Olsen BR, Freilino M, Hoffman GE, Sved AF, Stricker EM, and Verbalis JG.** c-Fos expression in rats brain stem nuclei in response to treatment that alter food intake and gastric motility. *Mol. Cell Neurosci.* 4:93-106, 1993.
- Oomura Y and Yoshimatsu H.** Neural network of glucose monitoring system. *J. Auton. Nerv. Syst.* 10:359-372, 1984.
- Paxinos G, Watson C.** *The rat brain in stereotaxic coordinates.* New York, Academic Press, 1998.
- Petrovich GD, Setlow B, Holland PC and Gallagher M.** Amygdalo-hypothalamic circuit allows learned cues to override satiety and promote eating. *J. Neurosci.* 22:8748-8753, 2002.
- Pittendrigh C.** Circadian system: Entrainment. *Handbook of Behavioral Neurobiology.* Vol. 4: Biological Rhythms (Jurgen Aschoff, Ed) New York: Plenum Press. 95-124, 1981.
- Pittendrigh C.** Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. *Ann. Rev. Physiol.* 55:17-54, 1993.
- Preti A.** Orexins (hypocretins): their role in appetite and arousal. *Curr Opin Investig Drugs* 3:1199-206, 2002.
- Riche D, De Pommery J and Menetrey D.** Neuropeptides and catecholamines in efferent projections of the nuclei of the solitary tract in the rat. *J. Comp. Neurol.* 293:399-424, 1990.
- Richter CP.** Experimental production of cycles in behaviour and physiology in animals. *Acta Med. Scand.* 152 (suppl 307): 36-37, 1995.
- Rinaman L, Bake E, Hoffman GE, Stricker EM, and Verbalis JG.** Medullary c-Fos activation in rats after ingestion of a satiating meal. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 275:R268-R268, 1998.
- Rinaman L.** Oxytocinergic inputs to the nucleus of the solitary tract and dorsal motor nucleus of the vagus in neonatal rats. *J Com Neurol* 399:101-119, 1998.

- Ritter S, Dinh TT and Zhang Y.** Localization of hindbrain glucoreceptive sites controlling food intake and blood glucose. *Brain Res.* 856:37-47, 2000.
- Rolls E.** The functions of the orbitofrontal cortex. *Brain and Cognition* 55:11-29, 2004.
- Sakata T, Yoshimatsu H and Kurokawa M.** Hypothalamic neuronal histamine: implications of its homeostatic control of energy metabolism. *Nutrition* 13:403-411, 1997.
- Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaky I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ and Yanagisawa M.** Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92:573-585, 1998.
- Salinas JA and McGaugh JL.** The amygdala modulates memory for changes in reward magnitude: involvement of the amygdaloid GABAergic system. *Behav. Brain Res.* 80:87-98, 1996.
- Saper CB, Swanson LW and Cowan WM.** The efferent connections of the ventromedial nucleus of the hypothalamus of the rat. *J. Comp. Neurol.* 169:209-442, 1976.
- Saper CB.** Central autonomic system. In: Paxinos G, editor. The rat nervous system. San Diego: Academy Press; 107-135, 1995.
- Saper CB.** Hypothalamic connections with the cerebral cortex. *Prog. Brain Res.* 126:38-48, 2000.
- Schaffhauser AO, Stricker-Krongrad A, Brunner L, Cumin F, Gerald C, Whitebread S, Criscione L and Hofbauer KG.** Inhibition of food intake by neuropeptide Y Y5 receptor antisense oligodeoxynucleotides. *Diabetes.* 46:1792-1798, 1997.
- Schwartz MW, Woods SC, Porte Jr D, Seeley RJ and Baskin DG.** Central nervous system control of food intake. *Nature* 404:661-671, 2000.
- Sheng M and Greenberg ME.** The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron.* 4:477-485, 1990.
- Simerly RB.** Anatomical substrates of hypothalamic integration. In: Paxinos G, editor. The rat nervous system. San Diego: Academy Press; 353-376, 1995.
- Spector AC.** Gustatory function in the parabrachial nuclei: implications from lesion studies in rat. *Rev. Neurosci.* 6:143-175, 1995

- Stephan FK, and Zucker I.** Circadian rhythms in drinking and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 69:1583-1586, 1972.
- Stephan FK, Schwann JM and Sisk CL.** Anticipation of 24-hr feeding schedules in rats with lesions of the suprachiasmatic nucleus. *Behav and Neural Biol* 25:346-363, 1979.
- Stephan FK, Schwann JM and Sisk CL.** Entrainment of circadian rhythms by feeding schedules in rats with suprachiasmatic lesions. *Behav and Neural Biol* 25:545-554, 1979.
- Stephan FK.** Limits of entrainment to periodic feeding in rats with suprachiasmatic lesions. *J. of Comp. Physiol.* 143: 401-410, 1981.
- Stephan FK.** Food-entrainable oscillators in mammals. In *Circadian Clocks*, edited by JS Takahashi, FW Turek and RY Moore, , pp 223-246. Kluwer Academic/Plenum Publishers New York, 2001.
- Strubbe JH and van Dijk G.** The temporal organization of ingestive behaviour and its interaction with regulation of energy balance. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 26:485-498, 2002.
- Swanson LW and Sawchenko PE.** Paraventricular nucleus: a site for the integration of neuroendocrine and autonomic mechanisms. *Neuroendocrinology* 31:410-417, 1980.
- Ter Horst GJ and Streefland C.** Ascending projections of the solitary tract nucleus. In *Nucleus of the solitary tract*, Edited by Robin I and Barraco A, pp 93-104. CRC press, Inc., Boca Raton, Florida 1994.
- Thompson RH, Canteras NS and Swanson LW.** Organization of projections from the dorsomedial nucleus of the hypothalamus: a PHA-L study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 376:143-173, 1996.
- Thompson RH and Swanson LW.** Organization of input to the dorsomedial nucleus of the Hypothalamus: a reexamination with Fluorogold and PHAL in the rat. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 27:89-118, 1998.
- Tritos NA, Vicent D, Gillette J, Ludwig DS, Flier ES and Maratos-Flier E.** Functional interaction between melanin-concentrating hormone, neuropeptide Y, and anorectic neuropeptides in the rat hypothalamus *Diabetes* 47:1687-1692, 1998.
- Turek F.** Circadian Rhythms. Recent progress in hormones research. 49; 49-87, 1994.



- Ueta Y, Kannan H, Higuci T, Negoro H, Yamaguchi K and Yamashita H.** Activation of gastric afferents increases noradrenaline release in the paraventricular nucleus and plasma oxytocin level. *J. Auton. Nerv. System.* 78:69-76, 2000.
- Van Cauter F, Kerkhofs M, Caufriez N, Van Onderbergen A, Thorner M and Copinschi G.** A quantitative estimation of growth hormone secretion in normal man: reproductibility and relation to sleep and time of day. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 74:1441-1450, 1992.
- Vrang N, Tang-Christensen M, Larsen PJ and Kristensen P.** Recombinant CART peptide induces c-Fos expression in central areas involved in control of feeding behaviour. *Brain Res.* 818:499-509, 1999.
- Wakamatsu H, Yoshinobu Y, Aida R, Moriya T, Akiyama M, and Shibata S.** Restricted-feeding-induced anticipatory activity rhythm is associated with a phase-shift of the expression of mPer1 mRNA in the cerebral cortex and hippocampus but not in the suprachiasmatic nucleus of mice. *Euro. J. Neurosci.* 13:1190-1196, 2001.
- Walker CD, Toufexis DJ and Burlet A.** Hypothalamic and limbic expression of CRF and vasopressin during lactation: implications for the control of ACTH secretion and stress hyporesponsiveness. *Prog. Brain Res.* 133:99-110, 2001.
- Walker DL, Toufexis DJ and Davis M.** Role of the bed nucleus of the stria terminalis versus the amygdala in fear, stress, and anxiety. *Eur. J. Pharmacol.* 463:199-216, 2003.
- Wang Y, Cummings SL, Gietzen DW** Temporal-spatial of c-fos expression in the rat brain in response to indispensable amino acid deficiency I. The initial recognition phase. *Molecular Brain Res* 40:27-34, 1996.
- Watts AG.** Understanding the neural control of ingestive behaviors: helping to separate cause from effect with dehydration-associated anorexia. *Horm. Behav.* 37:261-283, 2000.
- Weingarten HP and Powley TL.** Ventromedial hypothalamic lesions elevate basal and cephalic phase gastric acid output. *Am. J. Physiol.* 239:G221-G229, 1980.
- Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, and Yanagisawa M.** To eat or to sleep? Orexin in the regulation of feeding and wakefulness. *Annu. Rev. Neurosci.* 24:429-458, 2001.

**Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, Ueda M, Block G, Sakaki Y, Menaker M and Tei H.** Ressetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* 288:682-685, 2000.

**Yokosuka M, Xu B, Pu S, Kalra PS and Kalra SP.** Neural substrates for leptin and neuropeptide Y (NPY) interaction: hypothalamic sites associated with inhibition of NPY-induced food intake. *Physiol. Behav.* 64:331-8, 1998.

## **ANEXOS**

### **ARTICULOS PUBLICADOS DE LOS RESULTADOS DE ESTA TESIS**

## c-Fos expression in hypothalamic nuclei of food-entrained rats

Manuel Angeles-Castellanos,<sup>1</sup> Raúl Aguilar-Roblero,<sup>2</sup> and Carolina Escobar<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Anatomía, Facultad de Medicina, <sup>2</sup>Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México City DF 04510, México

Submitted 22 April 2003; accepted in final form 18 August 2003

**Angeles-Castellanos, Manuel, Raúl Aguilar-Roblero, and Carolina Escobar.** c-Fos expression in hypothalamic nuclei of food-entrained rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286: R158–R165, 2004. First published August 21, 2003; 10.1152/ajpregu.00216.2003.—The present study aimed to identify the hypothalamic nuclei involved with food entrainment by using c-Fos-like immunoreactivity (c-Fos-IR) as a marker of functional activation. We studied rats entrained 3 wk to restricted feeding schedules (RF), their ad libitum (AL) controls, and the persistence of c-Fos-IR temporal patterns in entrained-fasted rats. In addition, we included 22-h fasting and 22-h fasting-refeeding groups as controls of fasting and refeeding acute effects. Diurnal patterns of c-Fos-IR were observed in the tuberomammillary nucleus (TM) and supraoptic nucleus (SCN) in AL rats. In all nuclei, except the SCN and ventromedial nucleus (VMH), restricted feeding schedules imposed a temporal pattern of increased c-Fos-IR around mealtime. An increase in c-Fos-IR before and after meal time was observed in dorsomedial nucleus (DMH), lateral nucleus (LH), perifornical area (PeF), and TM, and a marked increase was observed in the paraventricular nucleus (PVN) after feeding. Food-entrained c-Fos-IR patterns persisted after 3 days in fasting in DMH, LH, and PeF. Present data suggest that FEO might not rely on a single nucleus and rather may be a distributed system constituted of interacting nuclei in which the PVN is mainly involved with the response to signals elicited by food ingestion and, therefore, with the entraining pathway. We can suggest that the PeF and TM may be involved with the arousal state during food anticipation and the DMH and LH with the time-keeping mechanism of FEO or its output.

circadian rhythms; entrainment; food-entrained oscillator; food anticipatory activity

CIRCADIAN RHYTHMS IN MAMMALS are predominantly entrained to the day-night cycle, but under restricted feeding schedules (RFS) several rhythms are entrained to mealtime (34). When food is restricted to a few hours daily, animals develop increased locomotor activity 2–3 h preceding food access, which has been termed food anticipatory activity (FAA). Associated with this behavioral activation, serum corticosterone, free fatty acids, and core temperature shift their phase in anticipation of the daily meal (15, 21). This food entrainment has been linked to the expression of a circadian oscillator because FAA is only entrained when food is provided in a circadian range, free runs for several cycles during constant-fasting conditions, and exhibits transients in response to phase shifts of food access (34).

The supraoptic nucleus in the hypothalamus (SCN) has been identified as the light-entrained oscillator (LEO), whereas the mechanisms underlying the food-entrained oscillator (FEO) remain elusive. Food entrainment depends on a circadian oscillator independent of the SCN, because FAA is elicited in

animals with bilateral lesions of the SCN (33). In an attempt to characterize the FEO, several groups have produced lesions in potential anatomic substrates of this oscillator and explored its effect on the expression of FAA. In food-entrained rats, bilateral lesions of the ventromedial hypothalamic nucleus (VMH) did not prevent FAA or the preceding corticosterone peak (19, 24). Likewise, bilateral lesions of the lateral nucleus (LH) and the paraventricular nucleus (PVN) failed to abolish FAA (23), and similar negative results were obtained after lesion of the limbic system (26) and brain stem areas (9, 10). However, a recent study described that RFS induced phase control of mPer rhythmicity in the cerebral cortex and hippocampus, suggesting a possible link of both structures with FAA (37).

Recent studies have pointed out the importance of peripheral oscillators as possible components of FEO (8, 40) and have directed special attention to the liver as a possible peripheral clock. However, we reported that rats made cirrhotic with a chronic CCl<sub>4</sub> treatment exhibit FAA that persisted in fasting conditions (17), indicating that the expression of FAA does not depend on an intact liver. Similar effects were reported in rats made diabetic with a single dose of streptozotocin (11), discarding the relevance of the pancreas and insulin secretion as part of this oscillator.

Because the identification of a single structure as substrate of FEO has proven unsuccessful, it has been suggested that the FEO may be constituted by a distributed and possibly redundant system of peripheral organs interacting with central nervous structures involved with ingestive behavior and energy balance (15, 34). However, the possible elements of this oscillator, associated with either the input of the entraining signals, the time-keeping mechanisms, or rhythmicity transmission, remain to be identified.

The immunohistochemical expression of c-Fos-like proteins in the nervous system is considered a marker of neuronal activation (28). The logic of this methodology is based on the demonstration that the expression of this protein is increased in neurons after extracellular electrical or chemical stimulation (28). Thus c-Fos-like expression has been extensively used to identify neurons activated by experimental treatments, including metabolic events and food ingestion (2, 14, 36).

The present study was aimed to identify the hypothalamic nuclei involved with food entrainment by using c-Fos immunoreactivity (c-Fos-IR) as a marker of functional activation. In a first stage, we characterized the temporal profile of c-Fos-IR in the hypothalamus of food-entrained rats [restricted feeding (RF)] and their ad libitum controls (AL), and in a second stage we explored whether temporal patterns of c-Fos-IR observed in food-entrained rats persisted during fasting. We hypothesized

Address for reprint requests and other correspondence: C. Escobar, Departamento de Anatomía, Edificio B 4° piso, Facultad de Medicina, UNAM, Ciudad Universitaria, México DF 04510, México (E-mail: cescobar@ifisiol.unam.mx).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

that a significant increase in c-Fos-IR for time points preceding food access would point out structures involved with the expression of FAA, as part of either the clock's mechanisms or its output pathway. An increase in c-Fos-IR after food ingestion would point out structures responding to food-related cues and thus be involved with the entraining pathway of the FEO. For the persistence group, we hypothesized that in fasting conditions a significant increase in c-Fos-IR during the expected mealtime would point out constituents of an endogenous time-keeping mechanism or of its output pathway.

## MATERIALS AND METHODS

**Subjects and housing conditions.** Adult male Wistar rats weighing 250–300 g were obtained from the general bioterium of the Medical Faculty in the Universidad Nacional Autónoma de México. Animals were maintained in a 12:12-h light-dark cycle [LD; lights on at 0700 = Zeitgeber time 0 (ZT0)], with regulated temperature ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ), free access to tap water, and regular laboratory rat diet (Rodent Laboratory Chow 5001), unless otherwise stated. Rats were acclimated to environmental conditions for at least 1 wk before starting the experimental procedures. Animal handling was conducted according to the national guide for care and use of animal experimentation (Decreto ley de protección a los animales del Distrito Federal, Gaceta Oficial del Distrito Federal, 26/02/02), which complies with the guiding principles for research of the American Physiological Society.

**Groups and food entrainment.** A first stage of the experiment explored the c-Fos-IR associated with food entrainment. Rats were randomly assigned to one of four feeding conditions for 3 wk and were housed in groups of the same condition in transparent acrylic cages ( $40 \times 50 \times 20$  cm). The AL group had free access to food; this group allowed for the observation of the expected c-Fos-IR under regular feeding conditions. The RF group was maintained under RFS with food available daily for 2 h (1200–1400, ZT5–ZT7). To determine that observed effects were not due to either an acute 22-h food deprivation interval or the fasting-refeeding conditions, two additional control groups were included (each  $n = 6$ ). For a 22-h fasting control (22F), rats were maintained with free food access for 3 wk; on the last day of the experiment food was removed at 1400 (ZT7), and after 22 h of food deprivation (at 1200, ZT5) six rats were perfused. Another six rats (22F-R) were left 22 h in fasting and then re-fed for 2 h (ZT5–ZT7) and were then perfused and processed for immunohistochemistry.

The second stage of the experiment explored the persistence of the entrained c-Fos-IR pattern after 3 days in fasting conditions. Rats were assigned to one of two groups. The persistence group (RF-F) was food entrained for 3 wk similar to the RF group, then allowed free food access for 5 days, and left food deprived for 3 days (food was removed at ZT7). This procedure allowed us to assess the persistence of FAA on an 8-day interval and allowed us to discard the expression of an hourglass clock. A fasting control group (Fast) was allowed free food access for 3 wk and then was left food deprived for 3 days.

For all groups, rats were perfused and brains were obtained on the last day of each feeding protocol at ZT3, ZT4, ZT5, ZT7, ZT11, or ZT13 ( $n = 6$  per group and time). In addition, to obtain a circadian curve for the SCN as a positive control, additional rats from the AL and RF groups were perfused at ZT17 and ZT23.

Because it is estimated that the intracellular cascade of events to produce peak levels of the protein c-Fos takes  $\sim 45$  min (38), tissue was labeled and data are presented according to the approximate releasing stimulus time. The day of perfusion, animals of the ZT5 point in the RF group remained unfed until anesthetized and processed.

**Histology and immunohistochemistry.** Rats were anesthetized with an overdose of pentobarbital sodium (Sedal-Vet, 65 mg/ml) and were perfused transcardially with  $\sim 250$  ml of 0.9% saline followed by 250 ml of fixative 4% paraformaldehyde, 1.4% lysine, and 0.2% sodium

m-periodate (PLP) in PBS (0.1 M, pH 7.2). Brains were removed, postfixed for 1 h in PLP, and cryoprotected in 10, 20, and 30% sucrose for 24 h.

Brains were frozen and cut at  $-18^\circ\text{C}$  in horizontal sections of 40  $\mu\text{m}$  to have complete slides of the brain, including the brain stem (to be used in another study). Sections were serially collected in four sets.

One set was stained with cresyl violet acetate (Nissl), and a second set was processed for immunohistochemistry for c-Fos. The sections were incubated for 72 h at  $4^\circ\text{C}$  in primary antibody (rabbit anti-Fos) diluted 1:2,500 in PBS, 1% goat serum, and 0.3% Triton X-100 (PBSGT). Tissue was then incubated in biotinylated secondary antibody (goat anti-rabbit; Vector Laboratories) 1:200 in PBSGT for 2 h at room temperature, followed by incubation in avidin-biotin complex (0.9% avidin and 0.9% biotin solutions; Vector Laboratories) in PBSGT for 2 h at room temperature. Tissue was then reacted in diaminobenzidine (0.5 mg/ml, in Trizma buffer 7.2) with hydrogen peroxide (35  $\mu\text{l}$ , 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Between each step, tissue was rinsed three times for 10 min in PBS. Tissue was mounted on gelatin-coated slides, and label was intensified with osmium tetroxide 0.1% for 30 s (Baker Analyzed), dehydrated with alcohol, cleared with xylene, and placed under a coverslip with Permount.

**Cell count.** To quantify c-Fos expression in hypothalamic nuclei, four representative sections were selected in accordance with the stereotaxic atlas from Paxinos and Watson (30). A first ventral section (interaaural 0.78 mm) was selected to quantify c-Fos-IR in the SCN. A second section (interaaural 0.90 mm) contained the VMH, LH, the dorsomedial nuclei (DMH), and the tuberomammillary nuclei (TM). A third section (interaaural 1.18) contained the perifornical area of the lateral hypothalamus (PeF); and a more dorsal section (interaaural 1.90 mm) was used to sample the PVN. Images of the corresponding Nissl sections were acquired to identify and define the area for each nucleus. Images of the immunohistochemical preparation were obtained using a computerized image analysis system (MCID Image Analyser Imaging Research) attached to an Olympus light microscope (BHT). A grid of  $4 \times 4$ , 40- $\mu\text{m}$  squares ( $1,600 \mu\text{m}^2$ ) was superimposed on the center of each nucleus, and only c-Fos-IR cells in the left side of each section were manually counted at a  $\times 10$  magnification. To minimize the number of false positives, background optic density (OD) was established in a nearby region lacking c-Fos-IR. When the observer marked a c-Fos-IR cell, the program indicated its OD, and stained cells that reached or surpassed three times the background OD were considered positive and were counted, whereas cells under this staining threshold were not considered. The examiner who performed all counts was not aware of the treatment received by the individual animals.

**Data analysis.** Number of cells for each sampled area were transformed to cells per square millimeter. Data were classified by groups and time and are represented as means  $\pm$  SE. Data between the AL and RF group, as well as data for RF-F vs. Fast, were compared with a two-way ANOVA for independent measures with a factor for group (2 levels) and a factor for time (6 levels). In addition, a one-way ANOVA was used to determine significant oscillations in the temporal pattern (6 levels) in each group. All ANOVAs were followed by a Tukey post hoc test with significant values set at  $P < 0.01$ . Values from the 22F and the 22F-R group were compared with the ZT5 and the ZT7 values of the RF group, respectively, with a one-way ANOVA for independent measures. Statistical analysis was performed with Statistica version 4.5 (StatSoft, 1993).

## RESULTS

**c-Fos-IR associated with RFS.** A clear c-Fos-IR was observed in all hypothalamic nuclei here reported (see Fig. 1). In the AL group, DMH, LH, PVN, VMH, and PeF did not show significant fluctuations throughout time in the number of c-Fos-IR cells (Figs. 2A, 3A, 4A, 5A, and 6A); however, effects of sampling time were observed in the TM (Fig. 7A) and SCN (Fig. 8A). The SCN exhibited a diurnal rhythm adjusted to the

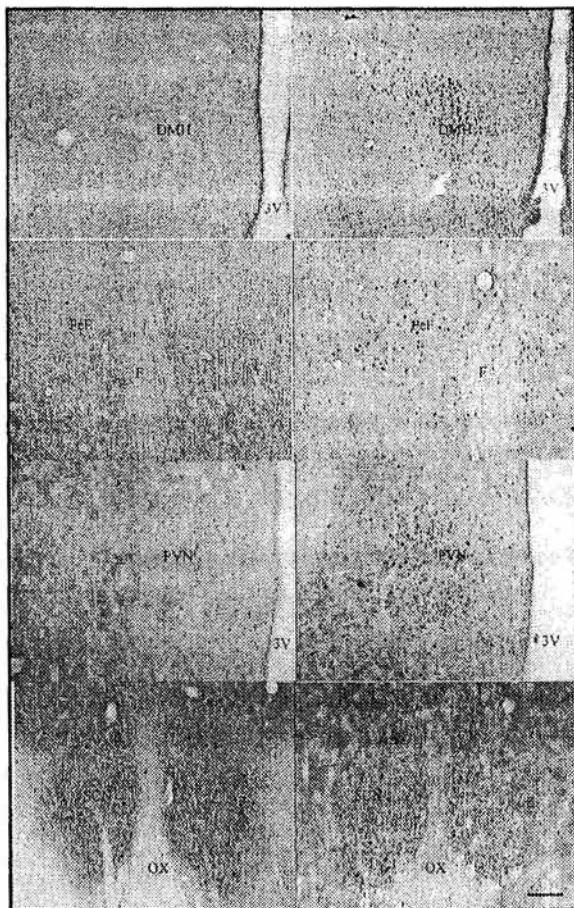
LD cycle, with higher values during the early morning and lowest values after lights off, whereas the TM showed a decrease of c-Fos-IR cells at ZT4 and a gradual increase toward the night. The one-way ANOVA revealed only significant effects due to time in the TM and in the SCN ( $P < 0.01$ ; Table 1).

RFS imposed a different c-Fos-IR temporal pattern in several hypothalamic nuclei compared with AL. The DMH, LH, PeF, and TM nuclei showed an increase in the number of c-Fos-IR cells 1 h before food access and a remarkably increased c-Fos-IR after meal time (Figs. 2A, 3A, 6A, and 7A). The PVN showed a marked increase in c-Fos-IR cells but only immediately after feeding (Fig. 4A). In the TM, a second increase of activity was observed after lights off. In contrast,

the VMH and the SCN did not show a different c-Fos-IR pattern between the RF and the AL (Figs. 5A and 8A). In the SCN, RF rats exhibited a c-Fos-IR pattern linked with the LD cycle. The one-way ANOVA revealed a significant effect of time in the DMH, PeF, PVN, and SCN (Table 1). The two-way ANOVA evidenced a significant main effect between the AL and RF groups in all nuclei; a significant main effect due to variations in time in the DMH, PeF, PVN, TM, and SCN; and a significant group-time interaction in the DMH, PeF, and PVN (Table 2).

Because RFS impose a cycle of 2-h feeding/22-h fasting, data from the RF group at ZT5 and ZT7 were compared with the 22F and 22 F-R groups, respectively. The statistical comparison revealed a significant difference between 22F and RFS

Fig. 1. Microphotograph illustrating representative c-Fos-immunoreactive (c-Fos-IR) cells in hypothalamic sections of a rat allowed ad libitum feeding (left) and a food-entrained rat (right) at 14 h (ZT7). DMH, dorsomedial nucleus; F, fornix; OX, optic chiasm; PeF, perifornical area; PVN, paraventricular nucleus; SCN, supra-chiasmatic nucleus; 3V, third ventricle. Scale bar corresponds to 40  $\mu$ m.



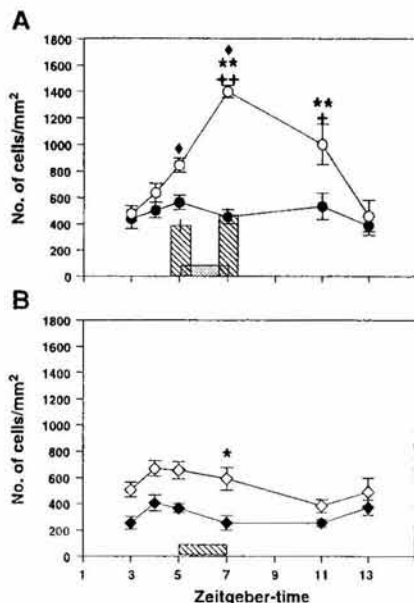


Fig. 2. Temporal pattern of the number of c-Fos-IR cells in the DMH of food-entrained rats (RF;  $\circ$ ) and their ad libitum controls (AL;  $\bullet$ ) (A) and of food-entrained, fasted rats (RF-F;  $\circ$ ) and their fasting controls (Fast;  $\bullet$ ) (B). The 22 fasted controls (22F) and the fasted-refed (22F-R) controls are represented in A as a hatched bar at 12 h and 14 h, respectively. Horizontal bar on the abscissa represents mealtime in A and expected mealtime in B. Values are means  $\pm$  SE. Significant difference between AL and RF: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ . Significant difference between time points in the same group: + $P < 0.05$ , ++ $P < 0.01$ . Significant difference between the RF time point and the 22F or 22F-R controls: ♦ $P < 0.01$ .

at ZT7 in the DMH ( $F_{1,10} = 83.87$ ;  $P < 0.001$ ), the LH ( $F_{1,10} = 21.38$ ;  $P < 0.001$ ), the PVN ( $F_{1,10} = 58.32$ ;  $P < 0.001$ ), and the TM ( $F_{1,10} = 14.44$ ;  $P < 0.003$ ), which confirmed that in these nuclei c-Fos-IR activation was different from the fasting condition. In addition, the comparison between the 22F-R group and the c-Fos-IR at ZT7 indicated significant difference between both groups in the DMH ( $F_{1,10} = 45.37$ ;  $P < 0.001$ ), the LH ( $F_{1,10} = 13.02$ ;  $P < 0.004$ ), the PeF ( $F_{1,10} = 4.96$ ;  $P < 0.04$ ), the PVN ( $F_{1,10} = 40.46$ ;  $P < 0.001$ ), and the TM ( $F_{1,10} = 6.31$ ;  $P < 0.03$ ). This comparison confirmed that effects observed in the RF group were due and specific to the food-entrainment protocol.

**c-Fos-IR in fasted rats.** The fasted groups exhibited c-Fos-IR expression in all nuclei. In the DMH, PVN, and TM, general cell counts were lower than in the AL and RF conditions (Figs. 2B, 4B, and 7B). In the Fast group, no significant fluctuations were observed throughout time; the VMH and PeF exhibited a decrease in the number of c-Fos-IR cells at ZT7 (Figs. 5B and 6B), in addition, in LH and TM, activity tended to increase, starting the activity phase (Figs. 3B and 7B). The SCN exhibited a pattern linked to the LD cycle characterized

by higher c-Fos-IR cell counts during the light phase and a decrease after lights off (Fig. 8B); however, it was distorted due to the influence of 48 h in fasting. The one-way ANOVA only indicated a significant main effect due to time in the PeF (Table 1).

The RF-F group exhibited in all nuclei, with the exception of the SCN and VMH, which displayed a different c-Fos-IR temporal pattern from that observed in the Fast group, with increased values at the expected meal time. This pattern was especially evident in the LH, which showed a clear increase before and during expected mealtime. For the RF-F group, the one-way ANOVA revealed a significant time effect in the LH, PeF, and PVN (Table 1). In addition, for all nuclei but the SCN, the two-way ANOVA showed a significant difference between the RF-F and Fast groups, a significant time variation in the DMH and PeF, and a significant group-time interaction in the LH and PeF (Table 3).

#### DISCUSSION

Present data indicate that several hypothalamic nuclei exhibit a specific c-Fos-IR temporal pattern associated with RFS and may be involved with the FEO's mechanisms. They also indicate that, specifically in the SCN and the VMH, the

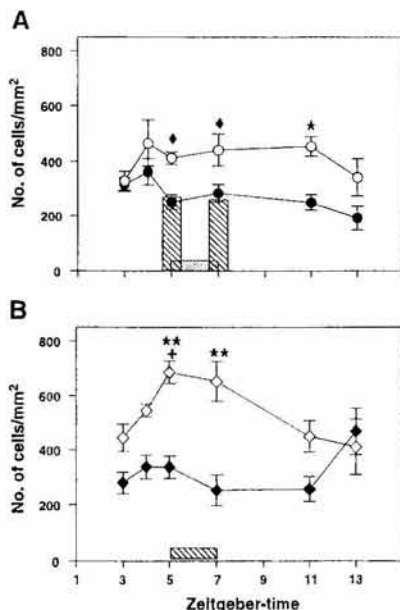


Fig. 3. Temporal pattern of the number of c-Fos-IR cells in the lateral hypothalamus in RF ( $\circ$ ) and AL ( $\bullet$ ) rats (A) and in RF-F ( $\circ$ ) and Fast ( $\bullet$ ) rats (B). Values are means  $\pm$  SE. A significant cellular activation was associated with mealtime and expected mealtime during fasting. Significant difference between AL and RF: \*\* $P < 0.01$ . Significant difference between time points in the same group: + $P < 0.05$ . Significant difference between the RF time point and the 22F or 22F-R controls: ♦ $P < 0.01$ . Other indications as in Fig. 2.

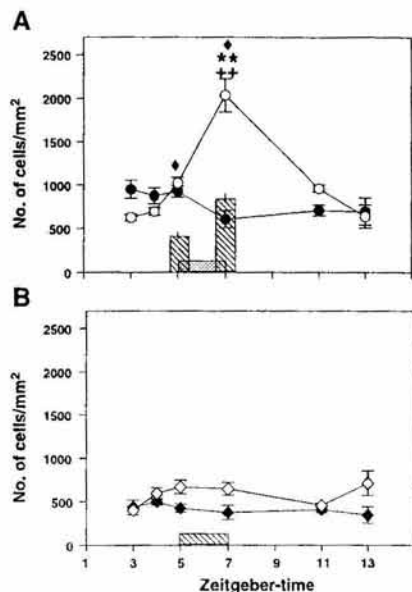


Fig. 4. Temporal pattern of the number of c-Fos-IR cells in PVN in RF (○) and AL (●) rats (A) and in RF-F (○) and Fast (●) rats (B). Values are means  $\pm$  SE. A significant response was observed after food ingestion. Significant difference between AL and RF: \*\* $P < 0.01$ . Significant difference between time points in the same group: + $P < 0.01$ . Significant difference between the RF time point and the 22F or 22F-R controls, ♦ $P < 0.01$ . Other indications as in Fig. 2.

temporal pattern of cellular activity remains phase tight to the LD cycle and is not modified due to RFS. Thus SCN and VMH may not be involved with the FEO's mechanisms.

Our initial hypothesis proposed that hypothalamic structures would respond with a differential pattern, depending on their involvement with specific mechanisms of FEO. Structures involved with FAA expression would show increased c-Fos-IR at time points preceding food access. If involved with the clock's mechanism, the activation pattern would persist in fasting conditions. An increase in c-Fos-IR after food ingestion would point out structures responding to food-related cues, and we would thus assume their role in the FEO's entraining pathway. However, data in this study point out a more complex pattern and do not allow for the assumption of such deterministic conclusions.

Food entrainment produced increased c-Fos-IR in the DMH, LH, PVN, TM, and PeF in anticipation of food access, and in the same structures an even stronger activation was observed after mealtime. Cellular activation due to RFS was different from that observed in AL, 22F, and 22FR groups, which confirmed that this activation was specific for the food-entrained condition. In addition, in nearly all nuclei, increased values were observed during fasting around the expected mealtime, but this was only significant for the LH and PeF, and for the LH, the temporal pattern was even more evident than that

observed during RFS. To better understand how the present structures can be linked to the FEO, these data must be examined according to the known role of each nucleus in metabolic balance and feeding behavior.

In the DMH, a slight increase in c-Fos-IR was observed in anticipation of mealtime and a significant increase after food intake. This pattern of activation persisted in fasting conditions, although with lower intensity. The DMH is considered an intermediary structure among hypothalamic nuclei of the medial zone due to its intrahypothalamic afferent and efferent projections (3), and because of the high levels of glucose receptors it is regarded as an integrator of metabolic functions (4). In addition, anatomic tracers have shown first-order synaptic projections between the SCN and DMH (13), suggesting that it may be an important output pathway for the transmission of circadian rhythmicity. Present data indicate that under RFS the DMH uncouples from the SCN and exhibits a pattern of cellular activation phase related to the mealtime. A similar pattern as in the DMH was observed in the LH, but in this structure the persistence response was significantly enhanced. Kurumiya and Kawamura (22) reported food entrainment of multiunitary activity in the LH, which persisted for several cycles in fasting, suggesting an important relationship between the LH and the FEO. In addition, the LH is distinguished by abundance of fibers and cell bodies that project to the cerebral cortex, the brain stem, and autonomic cells in the spinal cord, and thus is considered an integrative structure that transmits energy

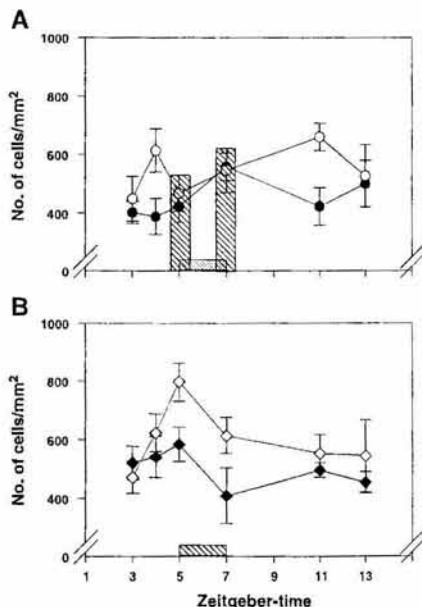


Fig. 5. Temporal pattern of the number of c-Fos-IR cells in the ventromedial hypothalamic nucleus in RF (○) and AL (●) rats (A) and in RF-F (○) and Fast (●) rats (B). Values are means  $\pm$  SE. Restricted feeding schedules produced no significant cellular activation. Other indications as in Fig. 2.



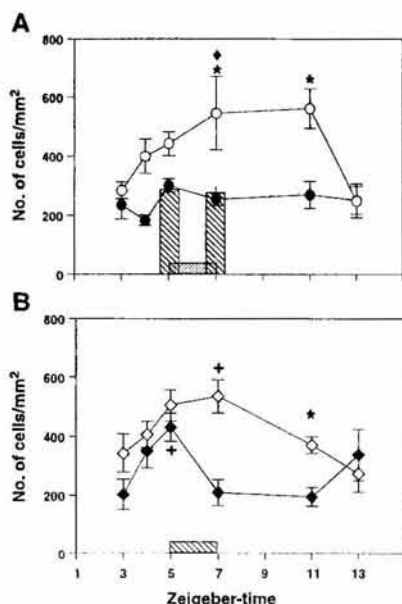


Fig. 6. Temporal pattern of the number of c-Fos-IR cells in the perifornical area in RF ( $\circ$ ) and AL ( $\bullet$ ) rats (A) and in RF-F ( $\circ$ ) and Fast ( $\bullet$ ) rats (B). Values are means  $\pm$  SE. A significant cellular activation was associated with mealtime and expected mealtime during fasting as observed in the lateral nucleus. Significant difference between AL and RF. \* $P < 0.05$ . Significant difference between time points in the same group: + $P < 0.05$ . Significant difference between the RF time point and the 22F or 22F-R controls,  $\blacklozenge P < 0.01$ . Other indications as in Fig. 2.

balance information to extrahypothalamic sites (23). Because both structures, DMH and LH, play an important integrative role in transmitting and processing metabolic signals and feeding behavior, and taking into account present evidence, we suggest that both may be elements of the FEO's clock mechanisms or that they may be elements of the clock's output.

Another relevant effect observed in this study was the intense activation of the TM and PeF during the hours before and after food access as well as during persistence. Both structures are located in the posterior hypothalamus and have been related to a behavioral arousal system (18, 39). The PeF of the lateral hypothalamus was recently described as an important arousal-promoting region containing orexigenic neurons (39) that project widely to forebrain and brain stem regions (27). Due to the location of orexin receptors, this system is thought to regulate sleep-wake cycles, locomotor activity, and energy homeostasis and feeding behavior (31, 39). In addition, a previous study (20) described an intense neuronal activation in the TM related to the arousal state in rats anticipating one of two daily meals. Our data are in agreement with this study, and we may speculate that an increase of c-Fos-IR in the TM and PeF may be related to the arousal state in rats during anticipation, during feeding, and while expecting food access in fasting.

The SCN and the VMH did not show significant cellular activation in association with food entrainment. Our data are in agreement with previous studies that have described entrainment by feeding schedules of the clock gene *per1* mRNA in peripheral tissues and central nervous structures but no phase control in the SCN (8, 37). Also, it has been well documented that animals with a bilateral lesion of the SCN are still able to entrain to feeding schedules and exhibit FAA (33). However, it is important to point out that RFS rats exhibited higher c-Fos-IR values than AL rats, which indicates a modulation of SCN activity by feeding schedules as previously described (7). Although, the VMH is a hypothalamic structure that has been linked to feeding behavior, in the literature we find evidence that extensive lesions of the VMH do not disrupt or hinder either metabolic food entrainment or the display of FAA (19, 24). As previously described, Kurumiya and Kawamura (22) reported entrainment of the temporal pattern of electrical multiunitary activity in the VMH and lateral LH in food-entrained rats. This food-entrained pattern persisted in the LH up to 4 days in total food deprivation (constant conditions), but dampened in the VMH. Present data are in agreement with previous findings and confirm that the VMH and SCN are not elements of FEO.

Significant and intense cellular activation was observed in the PVN after food intake in food-entrained rats. This response

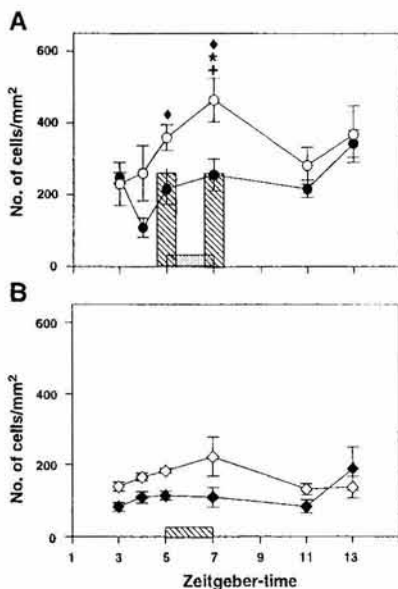


Fig. 7. Temporal pattern of the number of c-Fos-IR cells in the tuberomammillary nucleus in RF ( $\circ$ ) and AL ( $\bullet$ ) rats (A) and in RF-F ( $\circ$ ) and Fast ( $\bullet$ ) rats (B). Increased c-Fos-IR was observed around mealtime and during the early night. Values are means  $\pm$  SE. Significant difference between AL and RF. \* $P < 0.05$ . Significant difference between time points in the same group: + $P < 0.05$ . Significant difference between the RF time point and the 22F or 22F-R controls,  $\blacklozenge P < 0.01$ . Other indications as in Fig. 2.

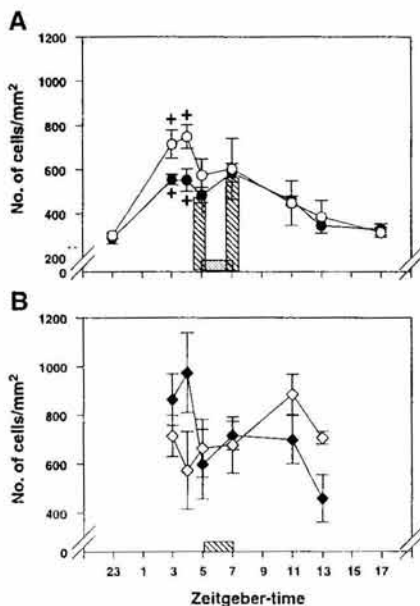


Fig. 8. Temporal pattern of the number of c-Fos-IR cells in the SCN in RF (○) and AL (●) rats (A) and in RF-F (○) and Fast (●) rats (B). Temporal patterns were related with the light dark cycle and not with mealtime. Values are means  $\pm$  SE. Significant difference between time points in the same group:  $\dagger P < 0.01$ . Other indications as in Fig. 2.

did not persist in fasting conditions, although during the expected mealtime a slight increase of c-Fos-IR was observed and this pattern was statistically different from the control Fast group. Previous studies indicate that the PVN integrates the information of stomach fill and the availability of substrates and represents an important output pathway to the autonomic nervous system, modulating digestive motor functions, gastrointestinal secretion, and pancreatic function via oxytocinergic projections to the nucleus of the solitary tract and the dorsal

Table 1. One-way ANOVA *F* values for the main effect of time in AL and RF, RF-F and Fast groups

Nucleus	AL $F_{3,24}$	RF $F_{3,24}$	RF-F $F_{3,24}$	Fast $F_{3,24}$
DMH	0.55	12.3†	2.41	1.97
LH	1.61	1.04	3.48†	1.88
PeF	1.23	2.88*	2.73*	3.28†
PVN	2.09	26.7†	3.39†	0.51
TM	5.16†	2.03	1.56	1.96
VMH	1.76	0.86	2.51	0.86
SCN	$F_{3,24} = 8.96†$	$F_{3,24} = 3.81†$	1.06	2.41

AL, ad libitum; RF, restricted feeding; RF-F, RF-fasting; Fast, fasting; DMH, dorsomedial nucleus; LH, lateral nucleus; PeF, perifornical area; PVN, paraventricular nucleus; TM, tuberomammillary nucleus; VMH, ventromedial nucleus; SCN, supra-chiasmatic nucleus. \* $P < 0.05$ ; † $P < 0.01$ .

Table 2. *F* values obtained with the two-way ANOVA for independent measures, for the group entrained to feeding schedules, and its ad libitum controls

Nucleus	Group $F_{1,58}$	Time $F_{5,38}$	$G \times T$ $F_{5,38}$
DMH	44.75†	8.12†	9.06†
LH	29.37†	1.29	1.71
PeF	24.92†	2.77*	2.50*
PVN	12.00†	9.38†	21.22†
TM	12.73†	4.31†	1.52
VMH	8.05†	1.27	1.51
SCN	$F_{1,58} = 3.17$	$F_{7,68} = 8.09†$	0.71

$G \times T$ , group-time interaction. \* $P < 0.05$ ; † $P < 0.001$ .

motor nucleus of the vagus (5, 32). Gastric load and distension elicit cellular activation in the PVN observed through c-Fos expression, norepinephrine, and oxytocin release (6, 29, 35). We have observed that food-entrained rats (unpublished data) and young rabbits (16) develop an exceptional capacity to distend their stomach, and this stomach distension coincides with increased c-Fos IR in the PVN (2, 6). Thus we can suggest that the intense c-Fos-IR response observed in the RF group was due to stomach distension after food ingestion, and the lower c-Fos-IR observed in the RF-F group corresponds to persistence of water intake, as previously described (17). As a result, it is possible that this gut-PVN axis may play an important role in the FEO's entraining pathway.

The fact that a previous study producing bilateral lesions of PVN and LH was unable to disrupt FAA expression (25) gives support to a multistructural model of the FEO built up by several nuclei in the central nervous system. This is further supported by a study that reported oscillating clock genes in several hypothalamic nuclei (1) and a study that demonstrated independence of clock gene's rhythmicity in the periphery from FAA expression. This later study evidenced that behavioral food entrainment relies on central mechanisms and not on a peripheral clock (12).

Because present data are based on the sampling of a single horizontal section for each nucleus, its interpretation must be addressed with limitations, especially for those nuclei that contain many neuronal phenotypes, although this study provides evidence that several hypothalamic nuclei exhibit cellular activation patterns related and specific to food entrainment. The specific c-Fos-IR patterns under RFS and in fasting suggest that the PVN may be involved with the entraining pathway, the PeF and TM with the arousal state, and the DMH and LH with the clock's mechanisms of FEO or its output. In addition, present data

Table 3. *F* values obtained with the two-way ANOVA for independent measures, for the RF-F group and its fasted controls

Nucleus	Group $F_{1,38}$	Time $F_{5,38}$	$G \times T$ $F_{5,38}$
DMH	39.15†	3.62*	0.92
LH	38.93†	2.37	3.12*
PeF	12.58†	3.66*	2.44*
PVN	16.47†	1.48	2.16
TM	9.20*	1.81	1.53
VMH	5.83*	2.38	1.05
SCN	0.01	1.75	1.27

\* $P < 0.05$ ; † $P < 0.001$ .

indicate that the FEO may be a distributed system of interacting structures. Further characterization of the FEO's mechanisms will need an integrative approach in which other extrahypothalamic structures are taken into account.

## GRANTS

This study was supported by Grants CONACyT 33033-N and DGAPA IN-204800.

## REFERENCES

- Abe M, Herzog ED, Yamazaki S, Straume M, Tei H, Sakaki Y, Menaker M, and Block GD. Circadian rhythms in isolated brain regions. *J Neurosci* 22: 350–356, 2002.
- Allingham K, von Saldern C, Brennan PA, Distel H, and Hudson R. Endogenous expression of c-Fos in hypothalamic nuclei of neonatal rabbits coincides with their circadian pattern of suckling-associated arousal. *Brain Res* 783: 210–218, 1998.
- Bernardis LL and Billinger LL. The dorsomedial hypothalamic nucleus revisited: 1998 update. *Proc Soc Exp Biol Med* 218: 284–306, 1998.
- Berthoud HR. Multiple neural system controlling food intake and body weight. *Neurosci Biobehav Rev* 26: 393–428, 2002.
- Buijs RM, Chun SJ, Nijima A, Romijn HJ, and Nagai K. Parasympathetic and sympathetic control of the pancreas: a role for the suprachiasmatic nucleus and other hypothalamic centers that are involved in the regulation of food intake. *J Comp Neurol* 432: 405–423, 2001.
- Caba M, Ravirossa MJ, and Silver R. Suckling and genital stroking induces Fos expression in hypothalamic oxytocinergic neurons of rabbit. *Brain Res Dev Brain Res* 143: 119–128, 2003.
- Challet E, Solberg LC, and Turek FW. Entrainment in calorie-restricted mice: conflicting zeitgebers and free-running conditions. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 274: R1751–R1761, 1998.
- Damiola F, Le Minh N, Preitner N, Kornmann B, Fleury-Otola F, and Schibler U. Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissue from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev* 14: 2950–2961, 2000.
- Davidson AJ, Cappendijk SL, and Stephan FK. Feeding-entrained circadian rhythms are attenuated by lesions of the parabrachial region in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278: R1296–R1304, 2000.
- Davidson AJ, Aragón BJ, and Stephan FK. Persistence of meal-entrained circadian rhythms following area postrema lesions in the rat. *Physiol Behav* 74: 349–354, 2001.
- Davidson AJ, Stokkan K, Yamazaki S, and Menaker M. Food-anticipatory activity and liver per-1-luc activity in diabetic transgenic rats. *Physiol Behav* 76: 21–26, 2002.
- Davidson AJ, Poole AS, Yamazaki S, and Menaker M. Is the food-entrained circadian oscillator in the digestive system? *Genes Brain Behav* 2: 32–39, 2003.
- Deurveilher S, Burns J, and Semba K. Indirect projections from the suprachiasmatic nucleus to the ventrolateral preoptic nucleus: a dual tract-tracing study in rat. *Eur J Neurosci* 16: 1195–1213, 2002.
- Emond MH and Weingarten HP. Fos-like immunoreactivity in vagal and hypoglossal nuclei in different feeding state: a quantitative study. *Physiol Behav* 58: 459–465, 1995.
- Escobar C, Diaz-Muñoz M, Encinas F, and Aguilar-Roblero R. Persistence of metabolic rhythmicity during fasting and its entrainment by restricted feeding schedules in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 274: R1309–R1316, 1998.
- Escobar C, Hudson R, Martínez-Gómez M, and Aguilar-Roblero R. Metabolic correlates of the circadian pattern of suckling-associated arousal in young rabbits. *J Comp Physiol [A]* 186: 33–38, 2000.
- Escobar C, Mendoza JY, Salazar-Juarez A, Avila J, Hernandez-Munoz R, Diaz-Munoz M, and Aguilar-Roblero R. Rats made cirrhotic by chronic CCl4 treatment still exhibit anticipatory activity to a restricted feeding schedule. *Chronobiol Int* 19: 1073–1086, 2002.
- Haas H and Panula P. The role of histamine and the tuberomammillary nucleus in the nervous system. *Nature Rev* 4: 121–130, 2003.
- Honma S, Honma K, Nagasaka T, and Hirshige T. The ventromedial hypothalamic nucleus is not essential for the prefeeding corticosterone peak in rats under restricted daily feeding. *Physiol Behav* 39: 211–215, 1987.
- Inzunza O, Serón-Ferré MJ, Bravo H, and Torrealba F. Tuberomammillary nucleus activation anticipates feeding under a restricted schedule in rats. *Neurosci Lett* 293: 139–142, 2000.
- Krieger DT. Regulation of circadian periodicity of plasma corticosteroid concentrations and of body temperature by time of food presentation. In: *Biological Rhythms and Their Central Mechanism*, edited by Suda M, Hayaishi O, and Nakagawa H. New York: Elsevier/North-Holland Biomedical, 1979, p. 247–259.
- Kurumiya S and Kawamura H. Damped oscillation of the lateral hypothalamic multineuronal activity synchronized to daily feeding schedule in rats with suprachiasmatic nucleus lesions. *J Biol Rhythms* 6: 115–127, 1991.
- McMin JE, Baskin DG, and Schwartz MW. Neuroendocrine mechanisms regulating food intake and body weight. *Obesity Rev* 1: 37–46, 2000.
- Mistlberger RE and Rechtschaffen A. Recovery of anticipatory activity to restricted feeding in rats with ventromedial hypothalamic lesions. *Physiol Behav* 33: 227–235, 1984.
- Mistlberger RE and Rusak B. Food-anticipatory circadian rhythms in rats with paraventricular and lateral hypothalamic ablations. *J Biol Rhythms* 3: 277–291, 1988.
- Mistlberger RE and Mumbly DG. The limbic system and food-anticipatory circadian rhythms in the rat: ablation and dopamine blocking studies. *Behav Brain Res* 47: 159–168, 1992.
- Moore RY, Abrahamson EA, and Van Den Pol A. The hypocretin neuron system: an arousal system in the human brain. *Arch Ital Biol* 139: 195–205, 2001.
- Morgan JI and Curran T. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes *fos* and *jun*. *Annu Rev Neurosci* 14: 421–451, 1991.
- Nelson EE, Albert JR, Tian Y, and Verbalis JG. Oxytocin is elevated in plasma of 10-day-old rats following gastric distension. *Dev Brain Res* 111: 301–303, 1998.
- Paxinos G and Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. New York: Academic, 1998.
- Prete A. Orexins (hypocretins): their role in appetite and arousal. *Curr Opin Invest Drugs* 3: 1199–1206, 2002.
- Rinaman L. Oxytocinergic inputs to the nucleus of the solitary tract and dorsal motor nucleus of the vagus in neonatal rats. *J Comp Neurol* 399: 101–119, 1998.
- Stephan FK, Schwann JM, and Sisk CL. Entrainment of circadian rhythms by feeding schedules in rats with suprachiasmatic lesions. *Behav Neural Biol* 25: 545–554, 1979.
- Stephan FK. Food-entrainable oscillators in mammals. In: *Circadian Clocks*, edited by Takahashi JS, Turek FW, and Moore RY. New York: Kluwer Academic/Plenum, 2001, p. 223–246.
- Ueta Y, Kannan H, Higuchi T, Negoro H, Yamaguchi K, and Yamashita H. Activation of gastric afferents increases noradrenaline release in the paraventricular nucleus and plasma oxytocin level. *J Auton Nerv Syst* 78: 69–76, 2000.
- Vrang N, Tang-Christensen M, Larsen PJ, and Kristensen P. Recombinant CART peptide induces c-Fos expression in central areas involved in control of feeding behaviour. *Brain Res* 818: 499–509, 1999.
- Wakamatsu H, Yoshinobu Y, Aida R, Moriya T, Akiyama M, and Shibata S. Restricted-feeding-induced anticipatory activity rhythm is associated with a phase-shift of the expression of mPer1 mRNA in the cerebral cortex and hippocampus but not in the suprachiasmatic nucleus of mice. *Eur J Neurosci* 13: 1190–1196, 2001.
- Wang Y, Cummings SL, and Gietzen DW. Temporal-spatial pattern of c-fos expression in the rat brain in response to indispensable amino acid deficiency I. The initial recognition phase. *Mol Brain Res* 40: 27–34, 1996.
- Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, and Yanagisawa M. To eat or to sleep? Orexin in the regulation of feeding and wakefulness. *Annu Rev Neurosci* 24: 429–458, 2001.
- Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, Ueda M, Block G, Sakaki Y, Menaker M, and Tei H. Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* 288: 682–685, 2000.

## c-Fos expression in hypothalamic nuclei of food-entrained rats

Manuel Angeles-Castellanos,<sup>1</sup> Raúl Aguilar-Roblero,<sup>2</sup> and Carolina Escobar<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Anatomía, Facultad de Medicina, <sup>2</sup>Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México City DF 04510, México

Submitted 22 April 2003; accepted in final form 18 August 2003

**Angeles-Castellanos, Manuel, Raúl Aguilar-Roblero, and Carolina Escobar.** c-Fos expression in hypothalamic nuclei of food-entrained rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286: R158–R165, 2004. First published August 21, 2003; 10.1152/ajpregu.00216.2003.—The present study aimed to identify the hypothalamic nuclei involved with food entrainment by using c-Fos-like immunoreactivity (c-Fos-IR) as a marker of functional activation. We studied rats entrained 3 wk to restricted feeding schedules (RF), their ad libitum (AL) controls, and the persistence of c-Fos-IR temporal patterns in entrained-fasted rats. In addition, we included 22-h fasting and 22-h fasting-refeeding groups as controls of fasting and refeeding acute effects. Diurnal patterns of c-Fos-IR were observed in the tuberomammillary nucleus (TM) and suprachiasmatic nucleus (SCN) in AL rats. In all nuclei, except the SCN and ventromedial nucleus (VMH), restricted feeding schedules imposed a temporal pattern of increased c-Fos-IR around mealtime. An increase in c-Fos-IR before and after meal time was observed in dorsomedial nucleus (DMH), lateral nucleus (LH), perifornical area (PeF), and TM, and a marked increase was observed in the paraventricular nucleus (PVN) after feeding. Food-entrained c-Fos-IR patterns persisted after 3 days in fasting in DMH, LH, and PeF. Present data suggest that FEO might not rely on a single nucleus and rather may be a distributed system constituted of interacting nuclei in which the PVN is mainly involved with the response to signals elicited by food ingestion and, therefore, with the entraining pathway. We can suggest that the PeF and TM may be involved with the arousal state during food anticipation and the DMH and LH with the time-keeping mechanism of FEO or its output.

circadian rhythms; entrainment; food-entrained oscillator; food anticipatory activity

CIRCADIAN RHYTHMS IN MAMMALS are predominantly entrained to the day-night cycle, but under restricted feeding schedules (RFS) several rhythms are entrained to mealtime (34). When food is restricted to a few hours daily, animals develop increased locomotor activity 2–3 h preceding food access, which has been termed food anticipatory activity (FAA). Associated with this behavioral activation, serum corticosterone, free fatty acids, and core temperature shift their phase in anticipation of the daily meal (15, 21). This food entrainment has been linked to the expression of a circadian oscillator because FAA is only entrained when food is provided in a circadian range, free runs for several cycles during constant-fasting conditions, and exhibits transients in response to phase shifts of food access (34).

The suprachiasmatic nucleus in the hypothalamus (SCN) has been identified as the light-entrained oscillator (LEO), whereas the mechanisms underlying the food-entrained oscillator (FEO) remain elusive. Food entrainment depends on a circadian oscillator independent of the SCN, because FAA is elicited in

animals with bilateral lesions of the SCN (33). In an attempt to characterize the FEO, several groups have produced lesions in potential anatomic substrates of this oscillator and explored its effect on the expression of FAA. In food-entrained rats, bilateral lesions of the ventromedial hypothalamic nucleus (VMH) did not prevent FAA or the preceding corticosterone peak (19, 24). Likewise, bilateral lesions of the lateral nucleus (LH) and the paraventricular nucleus (PVN) failed to abolish FAA (23), and similar negative results were obtained after lesion of the limbic system (26) and brain stem areas (9, 10). However, a recent study described that RFS induced phase control of mPer rhythmicity in the cerebral cortex and hippocampus, suggesting a possible link of both structures with FAA (37).

Recent studies have pointed out the importance of peripheral oscillators as possible components of FEO (8, 40) and have directed special attention to the liver as a possible peripheral clock. However, we reported that rats made cirrhotic with a chronic CCl<sub>4</sub> treatment exhibit FAA that persisted in fasting conditions (17), indicating that the expression of FAA does not depend on an intact liver. Similar effects were reported in rats made diabetic with a single dose of streptozotocin (11), discarding the relevance of the pancreas and insulin secretion as part of this oscillator.

Because the identification of a single structure as substrate of FEO has proven unsuccessful, it has been suggested that the FEO may be constituted by a distributed and possibly redundant system of peripheral organs interacting with central nervous structures involved with ingestive behavior and energy balance (15, 34). However, the possible elements of this oscillator, associated with either the input of the entraining signals, the time-keeping mechanisms, or rhythmicity transmission, remain to be identified.

The immunohistochemical expression of c-Fos-like proteins in the nervous system is considered a marker of neuronal activation (28). The logic of this methodology is based on the demonstration that the expression of this protein is increased in neurons after extracellular electrical or chemical stimulation (28). Thus c-Fos-like expression has been extensively used to identify neurons activated by experimental treatments, including metabolic events and food ingestion (2, 14, 36).

The present study was aimed to identify the hypothalamic nuclei involved with food entrainment by using c-Fos immunoreactivity (c-Fos-IR) as a marker of functional activation. In a first stage, we characterized the temporal profile of c-Fos-IR in the hypothalamus of food-entrained rats [restricted feeding (RF)] and their ad libitum controls (AL), and in a second stage we explored whether temporal patterns of c-Fos-IR observed in food-entrained rats persisted during fasting. We hypothesized

Address for reprint requests and other correspondence: C. Escobar, Departamento de Anatomía, Edificio B 4° piso, Facultad de Medicina, UNAM, Ciudad Universitaria, México DF 04510, México (E-mail: cesobar@ifisiol.unam.mx).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

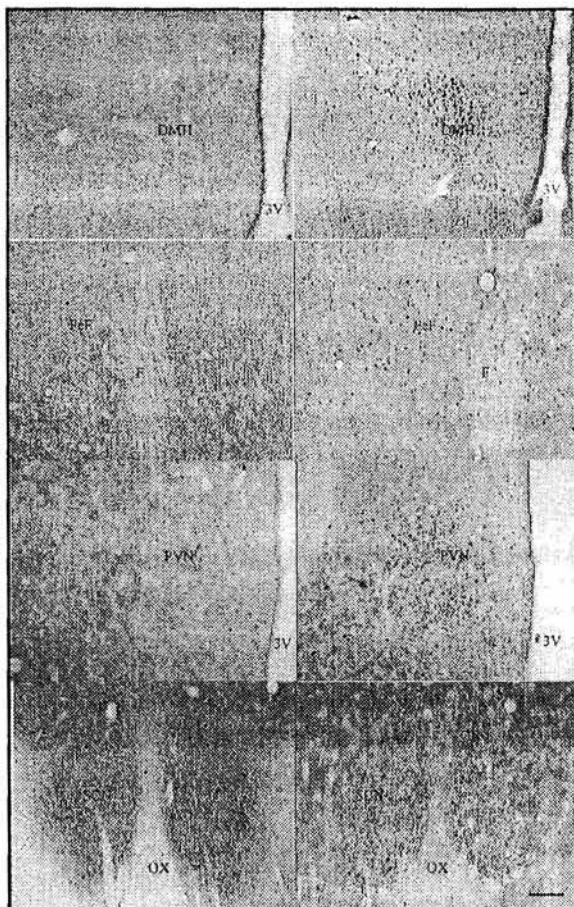
LD cycle, with higher values during the early morning and lowest values after lights off, whereas the TM showed a decrease of c-Fos-IR cells at ZT4 and a gradual increase toward the night. The one-way ANOVA revealed only significant effects due to time in the TM and in the SCN ( $P < 0.01$ ; Table 1).

RFS imposed a different c-Fos-IR temporal pattern in several hypothalamic nuclei compared with AL. The DMH, LH, PeF, and TM nuclei showed an increase in the number of c-Fos-IR cells 1 h before food access and a remarkably increased c-Fos-IR after meal time (Figs. 2A, 3A, 6A, and 7A). The PVN showed a marked increase in c-Fos-IR cells but only immediately after feeding (Fig. 4A). In the TM, a second increase of activity was observed after lights off. In contrast,

the VMH and the SCN did not show a different c-Fos-IR pattern between the RF and the AL (Figs. 5A and 8A). In the SCN, RF rats exhibited a c-Fos-IR pattern linked with the LD cycle. The one-way ANOVA revealed a significant effect of time in the DMH, PeF, PVN, and SCN (Table 1). The two-way ANOVA evidenced a significant main effect between the AL and RF groups in all nuclei; a significant main effect due to variations in time in the DMH, PeF, PVN, TM, and SCN; and a significant group-time interaction in the DMH, PeF, and PVN (Table 2).

Because RFS impose a cycle of 2-h feeding/22-h fasting, data from the RF group at ZT5 and ZT7 were compared with the 22F and 22 F-R groups, respectively. The statistical comparison revealed a significant difference between 22F and RFS

Fig. 1. Microphotograph illustrating representative c-Fos-immunoreactive (c-Fos-IR) cells in hypothalamic sections of a rat allowed ad libitum feeding (left) and a food-entrained rat (right) at 14 h (ZT7). DMH, dorsomedial nucleus; F, fomis; OX, optic chiasm; PeF, perifornical area; PVN, paraventricular nucleus; SCN, suprachiasmatic nucleus; 3V, third ventricle. Scale bar corresponds to 40  $\mu$ m.



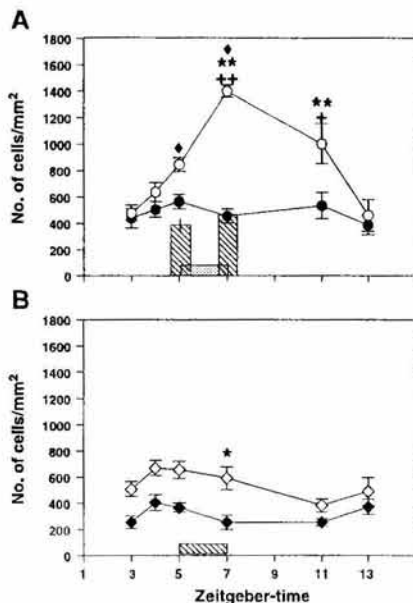


Fig. 2. Temporal pattern of the number of c-Fos-IR cells in the DMH of food-entrained rats (RF;  $\circ$ ) and their ad libitum controls (AL;  $\bullet$ ) (A) and of food-entrained, fasted rats (RF-F;  $\circ$ ) and their fasting controls (Fast;  $\bullet$ ) (B). The 22 fasted controls (22F) and the fasted-refed (22F-R) controls are represented in A as a hatched bar at 12 h and 14 h, respectively. Horizontal bar on the abscissa represents mealtime in A and expected mealtime in B. Values are means  $\pm$  SE. Significant difference between AL and RF: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ . Significant difference between time points in the same group: + $P < 0.05$ , ++ $P < 0.01$ . Significant difference between the RF time point and the 22F or 22F-R controls, +\* $P < 0.01$ , \*\*+ $P < 0.01$ .

at ZT7 in the DMH ( $F_{1,10} = 83.87$ ;  $P < 0.001$ ), the LH ( $F_{1,10} = 21.38$ ;  $P < 0.001$ ), the PVN ( $F_{1,10} = 58.32$ ;  $P < 0.001$ ), and the TM ( $F_{1,10} = 14.44$ ;  $P < 0.003$ ), which confirmed that in these nuclei c-Fos-IR activation was different from the fasting condition. In addition, the comparison between the 22F-R group and the c-Fos-IR at ZT7 indicated significant difference between both groups in the DMH ( $F_{1,10} = 45.37$ ;  $P < 0.001$ ), the LH ( $F_{1,10} = 13.02$ ;  $P < 0.004$ ), the PeF ( $F_{1,10} = 4.96$ ;  $P < 0.04$ ), the PVN ( $F_{1,10} = 40.46$ ;  $P < 0.001$ ), and the TM ( $F_{1,10} = 6.31$ ;  $P < 0.03$ ). This comparison confirmed that effects observed in the RF group were due and specific to the food-entrainment protocol.

**c-Fos-IR in fasted rats.** The fasted groups exhibited c-Fos-IR expression in all nuclei. In the DMH, PVN, and TM, general cell counts were lower than in the AL and RF conditions (Figs. 2B, 4B, and 7B). In the Fast group, no significant fluctuations were observed throughout time; the VMH and PeF exhibited a decrease in the number of c-Fos-IR cells at ZT7 (Figs. 5B and 6B), in addition, in LH and TM, activity tended to increase, starting the activity phase (Figs. 3B and 7B). The SCN exhibited a pattern linked to the LD cycle characterized

by higher c-Fos-IR cell counts during the light phase and a decrease after lights off (Fig. 8B); however, it was distorted due to the influence of 48 h in fasting. The one-way ANOVA only indicated a significant main effect due to time in the PeF (Table 1).

The RF-F group exhibited in all nuclei, with the exception of the SCN and VMH, which displayed a different c-Fos-IR temporal pattern from that observed in the Fast group, with increased values at the expected meal time. This pattern was especially evident in the LH, which showed a clear increase before and during expected mealtime. For the RF-F group, the one-way ANOVA revealed a significant time effect in the LH, PeF, and PVN (Table 1). In addition, for all nuclei but the SCN, the two-way ANOVA showed a significant difference between the RF-F and Fast groups, a significant time variation in the DMH and PeF, and a significant group-time interaction in the LH and PeF (Table 3).

#### DISCUSSION

Present data indicate that several hypothalamic nuclei exhibit a specific c-Fos-IR temporal pattern associated with RFS and may be involved with the FEO's mechanisms. They also indicate that, specifically in the SCN and the VMH, the

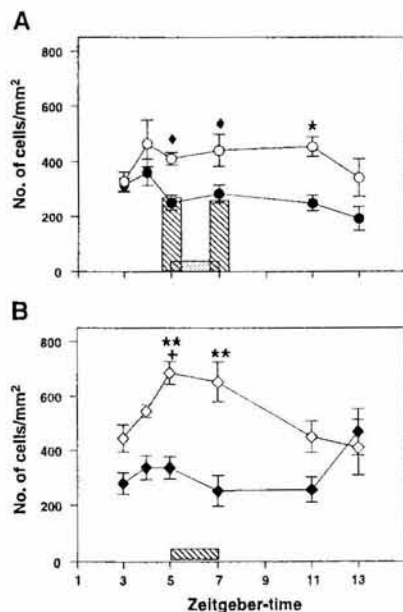


Fig. 3. Temporal pattern of the number of c-Fos-IR cells in the lateral hypothalamus in RF ( $\circ$ ) and AL ( $\bullet$ ) rats (A) and in RF-F ( $\circ$ ) and Fast ( $\bullet$ ) rats (B). Values are means  $\pm$  SE. A significant cellular activation was associated with mealtime and expected mealtime during fasting. Significant difference between AL and RF: \*\* $P < 0.01$ . Significant difference between time points in the same group: + $P < 0.05$ , ++ $P < 0.01$ . Significant difference between the RF time point and the 22F or 22F-R controls, +\* $P < 0.01$ , \*\*+ $P < 0.01$ . Other indications as in Fig. 2.

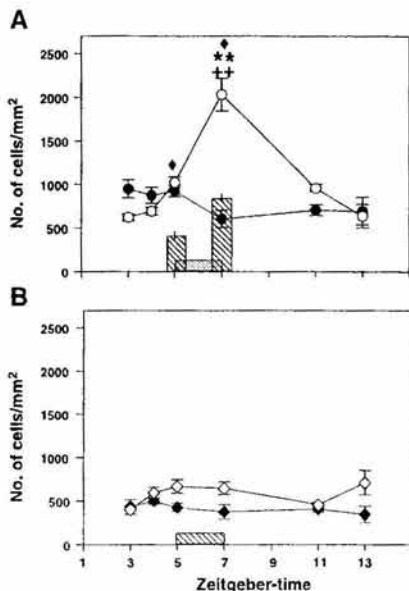


Fig. 4. Temporal pattern of the number of c-Fos-IR cells in PVN in RF (○) and AL (●) rats (A) and in RF-F (○) and Fast (●) rats (B). Values are means  $\pm$  SE. A significant response was observed after food ingestion. Significant difference between AL and RF: \*\* $P < 0.01$ . Significant difference between time points in the same group: ++ $P < 0.01$ . Significant difference between the RF time point and the 22F or 22F-R controls, ♦ $P < 0.01$ . Other indications as in Fig. 2.

temporal pattern of cellular activity remains phase tight to the LD cycle and is not modified due to RFS. Thus SCN and VMH may not be involved with the FEO's mechanisms.

Our initial hypothesis proposed that hypothalamic structures would respond with a differential pattern, depending on their involvement with specific mechanisms of FEO. Structures involved with FAA expression would show increased c-Fos-IR at time points preceding food access. If involved with the clock's mechanism, the activation pattern would persist in fasting conditions. An increase in c-Fos-IR after food ingestion would point out structures responding to food-related cues, and we would thus assume their role in the FEO's entraining pathway. However, data in this study point out a more complex pattern and do not allow for the assumption of such deterministic conclusions.

Food entrainment produced increased c-Fos-IR in the DMH, LH, PVN, TM, and PeF in anticipation of food access, and in the same structures an even stronger activation was observed after mealtime. Cellular activation due to RFS was different from that observed in AL, 22F, and 22FR groups, which confirmed that this activation was specific for the food-entrained condition. In addition, in nearly all nuclei, increased values were observed during fasting around the expected mealtime, but this was only significant for the LH and PeF, and for the LH, the temporal pattern was even more evident than that

observed during RFS. To better understand how the present structures can be linked to the FEO, these data must be examined according to the known role of each nucleus in metabolic balance and feeding behavior.

In the DMH, a slight increase in c-Fos-IR was observed in anticipation of mealtime and a significant increase after food intake. This pattern of activation persisted in fasting conditions, although with lower intensity. The DMH is considered an intermediary structure among hypothalamic nuclei of the medial zone due to its intrahypothalamic afferent and efferent projections (3), and because of the high levels of glucose receptors it is regarded as an integrator of metabolic functions (4). In addition, anatomic tracers have shown first-order synaptic projections between the SCN and DMH (13), suggesting that it may be an important output pathway for the transmission of circadian rhythmicity. Present data indicate that under RFS the DMH uncouples from the SCN and exhibits a pattern of cellular activation phase related to the mealtime. A similar pattern as in the DMH was observed in the LH, but in this structure the persistence response was significantly enhanced. Kurumiya and Kawamura (22) reported food entrainment of multiunitary activity in the LH, which persisted for several cycles in fasting, suggesting an important relationship between the LH and the FEO. In addition, the LH is distinguished by abundance of fibers and cell bodies that project to the cerebral cortex, the brain stem, and autonomic cells in the spinal cord, and thus is considered an integrative structure that transmits energy

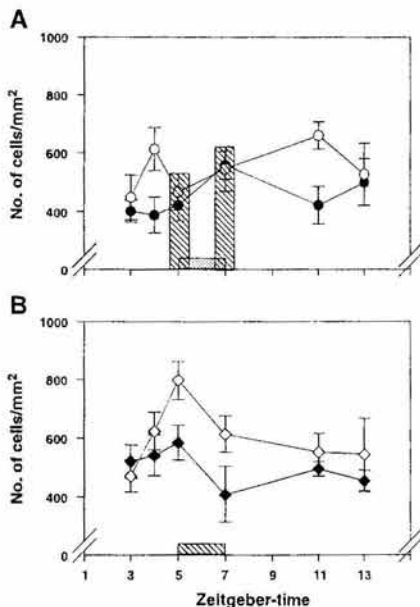


Fig. 5. Temporal pattern of the number of c-Fos-IR cells in the ventromedial hypothalamic nucleus in RF (○) and AL (●) rats (A) and in RF-F (○) and Fast (●) rats (B). Values are means  $\pm$  SE. Restricted feeding schedules produced no significant cellular activation. Other indications as in Fig. 2.

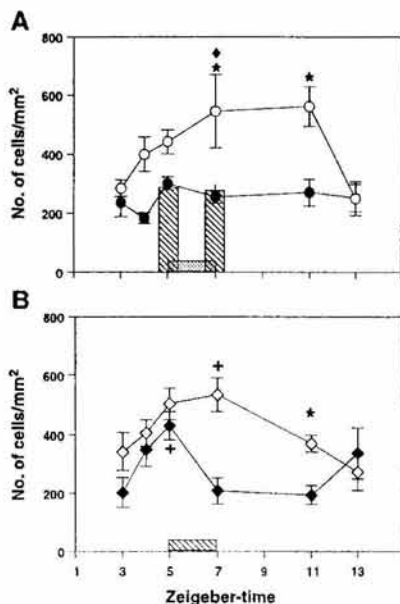


Fig. 6. Temporal pattern of the number of c-Fos-IR cells in the perifornical area in RF (○) and AL (●) rats (A) and in RF-F (○) and Fast (●) rats (B). Values are means  $\pm$  SE. A significant cellular activation was associated with mealtime and expected mealtime during fasting as observed in the lateral nucleus. Significant difference between AL and RF: \* $P < 0.05$ . Significant difference between time points in the same group: + $P < 0.05$ . Significant difference between the RF time point and the 22F or 22F-R controls,  $\blacklozenge P < 0.01$ . Other indications as in Fig. 2.

balance information to extrahypothalamic sites (23). Because both structures, DMH and LH, play an important integrative role in transmitting and processing metabolic signals and feeding behavior, and taking into account present evidence, we suggest that both may be elements of the FEO's clock mechanisms or that they may be elements of the clock's output.

Another relevant effect observed in this study was the intense activation of the TM and PeF during the hours before and after food access as well as during persistence. Both structures are located in the posterior hypothalamus and have been related to a behavioral arousal system (18, 39). The PeF of the lateral hypothalamus was recently described as an important arousal-promoting region containing orexigenic neurons (39) that project widely to forebrain and brain stem regions (27). Due to the location of orexin receptors, this system is thought to regulate sleep-wake cycles, locomotor activity, and energy homeostasis and feeding behavior (31, 39). In addition, a previous study (20) described an intense neuronal activation in the TM related to the arousal state in rats anticipating one of two daily meals. Our data are in agreement with this study, and we may speculate that an increase of c-Fos-IR in the TM and PeF may be related to the arousal state in rats during anticipation, during feeding, and while expecting food access in fasting.

The SCN and the VMH did not show significant cellular activation in association with food entrainment. Our data are in agreement with previous studies that have described entrainment by feeding schedules of the clock gene *per1* mRNA in peripheral tissues and central nervous structures but no phase control in the SCN (8, 37). Also, it has been well documented that animals with a bilateral lesion of the SCN are still able to entrain to feeding schedules and exhibit FAA (33). However, it is important to point out that RFS rats exhibited higher c-Fos-IR values than AL rats, which indicates a modulation of SCN activity by feeding schedules as previously described (7). Although, the VMH is a hypothalamic structure that has been linked to feeding behavior, in the literature we find evidence that extensive lesions of the VMH do not disrupt or hinder either metabolic food entrainment or the display of FAA (19, 24). As previously described, Kurumiya and Kawamura (22) reported entrainment of the temporal pattern of electrical multiunitary activity in the VMH and lateral LH in food-entrained rats. This food-entrained pattern persisted in the LH up to 4 days in total food deprivation (constant conditions), but dampened in the VMH. Present data are in agreement with previous findings and confirm that the VMH and SCN are not elements of FEO.

Significant and intense cellular activation was observed in the PVN after food intake in food-entrained rats. This response

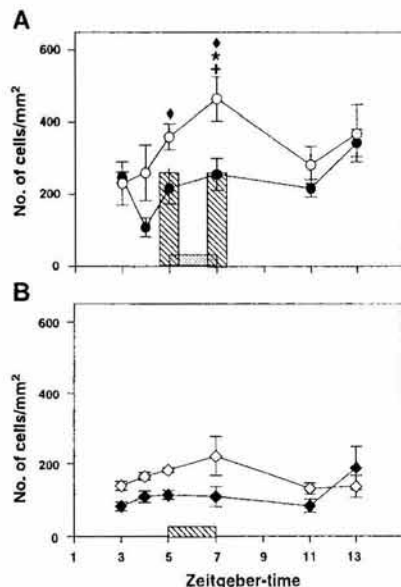


Fig. 7. Temporal pattern of the number of c-Fos-IR cells in the tuberomammillary nucleus in RF (○) and AL (●) rats (A) and in RF-F (○) and Fast (●) rats (B). Increased c-Fos-IR was observed around mealtime and during the early night. Values are means  $\pm$  SE. Significant difference between AL and RF: \* $P < 0.05$ . Significant difference between time points in the same group: + $P < 0.05$ . Significant difference between the RF time point and the 22F or 22F-R controls,  $\blacklozenge P < 0.01$ . Other indications as in Fig. 2.



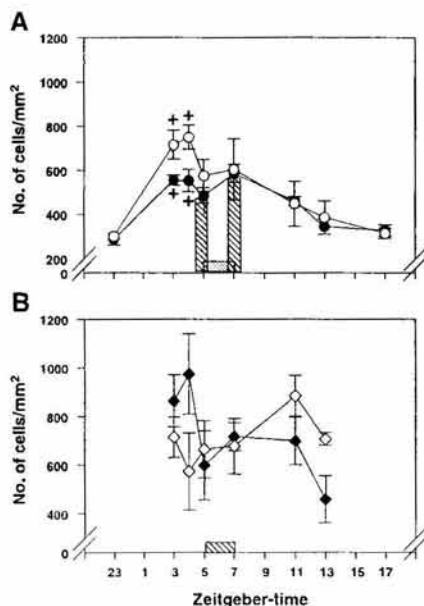


Fig. 8. Temporal pattern of the number of c-Fos-IR cells in the SCN in RF (○) and AL (●) rats (A) and in RF-F (○) and Fast (●) rats (B). Temporal patterns were related with the light dark cycle and not with mealtime. Values are means  $\pm$  SE. Significant difference between time points in the same group: † $P$  < 0.01. Other indications as in Fig. 2.

did not persist in fasting conditions, although during the expected mealtime a slight increase of c-Fos-IR was observed and this pattern was statistically different from the control Fast group. Previous studies indicate that the PVN integrates the information of stomach fill and the availability of substrates and represents an important output pathway to the autonomic nervous system, modulating digestive motor functions, gastrointestinal secretion, and pancreatic function via oxytocinergic projections to the nucleus of the solitary tract and the dorsal

Table 1. One-way ANOVA  $F$  values for the main effect of time in AL and RF, RF-F and Fast groups

Nucleus	AL $F_{5,28}$	RF $F_{5,28}$	RF-F $F_{5,28}$	Fast $F_{5,28}$
DMH	0.55	12.3†	2.41	1.97
LH	1.61	1.04	3.48†	1.88
PeF	1.23	2.88*	2.73*	3.28†
PVN	2.09	26.7†	3.39†	0.51
TM	5.16†	2.03	1.56	1.96
VMH	1.76	0.86	2.51	0.86
SCN	$F_{5,34}=8.96†$	$F_{5,34}=3.81†$	1.06	2.41

AL, ad libitum; RF, restricted feeding; RF-F, RF-fasting; Fast, fasting; DMH, dorsomedial nucleus; LH, lateral nucleus; PeF, perifornical area; PVN, paraventricular nucleus; TM, tuberomammillary nucleus; VMH, ventromedial nucleus; SCN, supra-chiasmatic nucleus. \* $P$  < 0.05; † $P$  < 0.01.

Table 2.  $F$  values obtained with the two-way ANOVA for independent measures, for the group entrained to feeding schedules, and its ad libitum controls

Nucleus	Group $F_{1,58}$	Time $F_{5,58}$	G $\times$ T $F_{5,58}$
DMH	44.75†	8.12†	9.06†
LH	29.37†	1.29	1.71
PeF	24.92†	2.77*	2.50*
PVN	12.00†	9.38†	21.22†
TM	12.73†	4.31†	1.52
VMH	8.05†	1.27	1.51
SCN	$F_{1,68}=3.17$	$F_{7,68}=8.09†$	0.71

G  $\times$  T, group-time interaction. \* $P$  < 0.05; † $P$  < 0.001.

motor nucleus of the vagus (5, 32). Gastric load and distension elicit cellular activation in the PVN observed through c-Fos expression, norepinephrine, and oxytocin release (6, 29, 35). We have observed that food-entrained rats (unpublished data) and young rabbits (16) develop an exceptional capacity to distend their stomach, and this stomach distension coincides with increased c-Fos IR in the PVN (2, 6). Thus we can suggest that the intense c-Fos-IR response observed in the RF group was due to stomach distension after food ingestion, and the lower c-Fos-IR observed in the RF-F group corresponds to persistence of water intake, as previously described (17). As a result, it is possible that this gut-PVN axis may play an important role in the FEO's entraining pathway.

The fact that a previous study producing bilateral lesions of PVN and LH was unable to disrupt FAA expression (25) gives support to a multistructural model of the FEO built up by several nuclei in the central nervous system. This is further supported by a study that reported oscillating clock genes in several hypothalamic nuclei (1) and a study that demonstrated independence of clock gene's rhythmicity in the periphery from FAA expression. This later study evidenced that behavioral food entrainment relies on central mechanisms and not on a peripheral clock (12).

Because present data are based on the sampling of a single horizontal section for each nucleus, its interpretation must be addressed with limitations, especially for those nuclei that contain many neuronal phenotypes, although this study provides evidence that several hypothalamic nuclei exhibit cellular activation patterns related and specific to food entrainment. The specific c-Fos-IR patterns under RFS and in fasting suggest that the PVN may be involved with the entraining pathway, the PeF and TM with the arousal state, and the DMH and LH with the clock's mechanisms of FEO or its output. In addition, present data

Table 3.  $F$  values obtained with the two-way ANOVA for independent measures, for the RF-F group and its fasted controls

Nucleus	Group $F_{1,58}$	Time $F_{5,58}$	G $\times$ T $F_{5,58}$
DMH	39.15†	3.62*	0.92
LH	38.93†	2.37	3.12*
PeF	12.58†	3.66*	2.44*
PVN	16.47†	1.48	2.16
TM	9.20*	1.81	1.53
VMH	5.83*	2.38	1.05
SCN	0.01	1.75	1.27

\* $P$  < 0.05; † $P$  < 0.001.

indicate that the FEO may be a distributed system of interacting structures. Further characterization of the FEO's mechanisms will need an integrative approach in which other extrahypothalamic structures are taken into account.

## GRANTS

This study was supported by Grants CONACyT 33033-N and DGAPA IN-204800.

## REFERENCES

- Abe M, Herzog ED, Yamazaki S, Straume M, Tei H, Sakaki Y, Menaker M, and Block GD. Circadian rhythms in isolated brain regions. *J Neurosci* 22: 350–356, 2002.
- Allingham K, von Saldern C, Brennan PA, Distel H, and Hudson R. Endogenous expression of c-Fos in hypothalamic nuclei of neonatal rabbits coincides with their circadian pattern of suckling-associated arousal. *Brain Res* 783: 210–218, 1998.
- Bernardis LL and Billinger LL. The dorsomedial hypothalamic nucleus revisited: 1998 update. *Proc Soc Exp Biol Med* 218: 284–306, 1998.
- Berthoud HR. Multiple neural system controlling food intake and body weight. *Neurosci Biobehav Rev* 26: 393–428, 2002.
- Buijs RM, Chun SJ, Nijima A, Romijn HJ, and Nagai K. Parasympathetic and sympathetic control of the pancreas: a role for the suprachiasmatic nucleus and other hypothalamic centers that are involved in the regulation of food intake. *J Comp Neurol* 432: 405–423, 2001.
- Caba M, Ravirosa MJ, and Silver R. Suckling and genital stroking induces Fos expression in hypothalamic oxytocinergic neurons of rabbit. *Brain Res Dev Brain Res* 143: 119–128, 2003.
- Challet E, Solberg LC, and Turek FW. Entrainment in calorie-restricted mice: conflicting zeitgebers and free-running conditions. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 274: R1751–R1761, 1998.
- Damiola F, Le Minh N, Preitner N, Kornmann B, Fleury-Olefa F, and Schibler U. Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissue from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev* 14: 2950–2961, 2000.
- Davidson AJ, Cappendijk SL, and Stephan FK. Feeding-entrained circadian rhythms are attenuated by lesions of the parabrachial region in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278: R1296–R1304, 2000.
- Davidson AJ, Aragona BJ, and Stephan FK. Persistence of meal-entrained circadian rhythms following area postrema lesions in the rat. *Physiol Behav* 74: 349–354, 2001.
- Davidson AJ, Stokkan K, Yamazaki S, and Menaker M. Food-anticipatory activity and liver per-1-luc activity in diabetic transgenic rats. *Physiol Behav* 76: 21–26, 2002.
- Davidson AJ, Poole AS, Yamazaki S, and Menaker M. Is the food-entrainable circadian oscillator in the digestive system? *Genes Brain Behav* 2: 32–39, 2003.
- Deurveilher S, Burns J, and Semba K. Indirect projections from the suprachiasmatic nucleus to the ventrolateral preoptic nucleus: a dual tract-tracing study in rat. *Eur J Neurosci* 16: 1195–1213, 2002.
- Emond MH and Weingarten HP. Fos-like immunoreactivity in vagal and hypoglossal nuclei in different feeding state: a quantitative study. *Physiol Behav* 85: 459–465, 1995.
- Escobar C, Diaz-Munoz M, Encinas F, and Aguilar-Roblero R. Persistence of metabolic rhythmicity during fasting and its entrainment by restricted feeding schedules in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 274: R1309–R1316, 1998.
- Escobar C, Hudson R, Martinez-Gomez M, and Aguilar-Roblero R. Metabolic correlates of the circadian pattern of suckling-associated arousal in young rabbits. *J Comp Physiol [A]* 186: 33–38, 2000.
- Escobar C, Mendoza JY, Salazar-Juarez A, Avila J, Hernandez-Munoz R, Diaz-Munoz M, and Aguilar-Roblero R. Rats made cirrhotic by chronic CCl4 treatment still exhibit anticipatory activity to a restricted feeding schedule. *Chronobiol Int* 19: 1073–1086, 2002.
- Haas H and Panula P. The role of histamine and the tuberomammillary nucleus in the nervous system. *Nature Rev* 4: 121–130, 2003.
- Honma S, Honma K, Nagasaka T, and Hirishige T. The ventromedial hypothalamic nucleus is not essential for the prefeeding corticosterone peak in rats under restricted daily feeding. *Physiol Behav* 39: 211–215, 1987.
- Inzunza O, Serón-Ferré MJ, Bravo H, and Torrealba F. Tuberomammillary nucleus activation anticipates feeding under a restricted schedule in rats. *Neurosci Lett* 293: 139–142, 2000.
- Krieger DT. Regulation of circadian periodicity of plasma corticosteroid concentrations and of body temperature by time of food presentation. In: *Biological Rhythms and Their Central Mechanism*, edited by Suda M, Hayashi O, and Nakagawa H. New York: Elsevier/North-Holland Biomedical, 1979, p. 247–259.
- Kurumiya S and Kawamura H. Damped oscillation of the lateral hypothalamic multineuronal activity synchronized to daily feeding schedule in rats with suprachiasmatic nucleus lesions. *J Biol Rhythms* 6: 115–127, 1991.
- McMinn JE, Baskin DG, and Schwartz MW. Neuroendocrine mechanisms regulating food intake and body weight. *Obesity Rev* 1: 37–46, 2000.
- Mistlberger RE and Rechtschaffen A. Recovery of anticipatory activity to restricted feeding in rats with ventromedial hypothalamic lesions. *Physiol Behav* 33: 227–235, 1984.
- Mistlberger RE and Rusak B. Food-anticipatory circadian rhythms in rats with paraventricular and lateral hypothalamic ablations. *J Biol Rhythms* 3: 277–291, 1988.
- Mistlberger RE and Mumbly DG. The limbic system and food-anticipatory circadian rhythms in the rat: ablation and dopamine blocking studies. *Behav Brain Res* 47: 159–168, 1992.
- Moore RY, Abrahamson EA, and Van Den Pol A. The hypocretin neuron system: an arousal system in the human brain. *Arch Ital Biol* 139: 195–205, 2001.
- Morgan JI and Curran T. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes *fos* and *jun*. *Annu Rev Neurosci* 14: 421–451, 1991.
- Nelson EE, Albert JR, Tian Y, and Verbalis JG. Oxytocin is elevated in plasma of 10-day-old rats following gastric distension. *Dev Brain Res* 111: 301–303, 1998.
- Paxinos G and Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. New York: Academic, 1998.
- Preit A. Orexins (hypocretins): their role in appetite and arousal. *Curr Opin Invest Drugs* 3: 1199–1206, 2002.
- Rinaman L. Oxytocinergic inputs to the nucleus of the solitary tract and dorsal motor nucleus of the vagus in neonatal rats. *J Comp Neurol* 399: 101–119, 1998.
- Stephan FK, Schwann JM, and Sisk CL. Entrainment of circadian rhythms by feeding schedules in rats with suprachiasmatic lesions. *Behav Neural Biol* 25: 545–554, 1979.
- Stephan FK. Food-entrainable oscillators in mammals. In: *Circadian Clocks*, edited by Takahashi JS, Turek FW, and Moore RY. New York: Kluwer Academic/Plenum, 2001, p. 223–246.
- Ueta Y, Kannan H, Higuchi T, Negoro H, Yamaguchi K, and Yamashita H. Activation of gastric afferents increases norepinephrine release in the paraventricular nucleus and plasma oxytocin level. *J Auton Nerv Syst* 78: 69–76, 2000.
- Vrang N, Tang-Christensen M, Larsen PJ, and Kristensen P. Recombinant CART peptide induces c-Fos expression in central areas involved in control of feeding behaviour. *Brain Res* 818: 499–509, 1999.
- Wakamatsu H, Yoshinobu Y, Aida R, Moriya T, Akiyama M, and Shibata S. Restricted-feeding-induced anticipatory activity rhythm is associated with a phase-shift of the expression of mPer1 mRNA in the cerebral cortex and hippocampus but not in the suprachiasmatic nucleus of mice. *Eur J Neurosci* 13: 1190–1196, 2001.
- Wang Y, Cummings SL, and Gietzen DW. Temporal-spatial pattern of c-fos expression in the rat brain in response to indispensable amino acid deficiency 1. The initial recognition phase. *Mol Brain Res* 40: 27–34, 1996.
- Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, and Yanagisawa M. To eat or to sleep? Orexin in the regulation of feeding and wakefulness. *Annu Rev Neurosci* 24: 429–458, 2001.
- Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, Ueda M, Block G, Sakaki Y, Menaker M, and Tei H. Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* 288: 682–685, 2000.

Fecha: Thu, 18 Nov 2004 09:00:16 -0500 (EST)

De: [mtrang@the-aps.org](mailto:mtrang@the-aps.org)

Responder-A: [mtrang@the-aps.org](mailto:mtrang@the-aps.org)

Asunto: R-00590-2004.R2 , FOOD ENTRAINMENT MODIFIES THE C-FOS  
EXPRESSION PATTERN IN BRAIN STEM NUCLEI OF RATS

Para: [cescobar@ifisiol.unam.mx](mailto:cescobar@ifisiol.unam.mx)

Dear Dr. Escobar:

Thank you for uploading your accepted manuscript (R-00590-2004.R2) to Article in Press. These online publications are transmitted to the online journal site on a weekly schedule. You can visit the site usually within a week after the receipt of this e-mail to see the published article. It is citable by the DOI, 10.1152/ajpregu.00590.2004, which can also be found at the top of the title page.

You may view the postings at:

<http://ajpregu.physiology.org/papbyrecent.shtml>

You will notice that this submission has been assigned a sequential R designation. This is just a way for the system to create another instance of the record. It will not be processed as a revision.

Please share this information with your co-authors so that they will know that your article is being published. If you have not yet sent the materials for print production, please send these quickly so that we can schedule your manuscript for the next available print issue.

Once your article has been published online, the source files you provide will be placed into print production. Our time from acceptance to print publication is about 4 months. When your article has been copy edited, you will receive an email RapidProof of your paginated article. The reprint order form is on the last two pages of the proof. You will then be able to order reprints and determine your publication charges.

We appreciate your contribution to AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. We look forward to receiving more manuscripts from your group in the future.

Sincerely,

Margaret Reich  
Director of Publications  
APS

Gil Ebner  
Peer Review Manager  
APS Journals

FOOD ENTRAINMENT MODIFIES THE C-FOS EXPRESSION PATTERN IN  
BRAIN STEM NUCLEI OF RATS.

Manuel Ángeles-Castellanos<sup>1</sup>, Jorge Mendoza<sup>1</sup>, Mauricio Díaz-Muñoz<sup>2</sup> and  
Carolina Escobar<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Anatomía, Facultad de Medicina.

<sup>2</sup>Instituto de Neurobiología, Juriquilla.

Universidad Nacional Autónoma de México, México DF 04510

FOOD ENTRAINMENT AND BRAIN STEM

Correspondence Address:

Carolina Escobar  
Departamento de Anatomía  
Edificio B 4º piso  
Facultad de Medicina, UNAM  
Ciudad Universitaria  
México DF 04510  
México

Tel: (525) 56-23-24-22  
Fax: (525) 56-23-24-25  
Email: cescobar@ifc.unam.mx

## **ABSTRACT:**

When food is restricted to a few hours daily, animals increase their locomotor activity 2-3 hours preceding food access, which has been termed food anticipatory activity (FAA). Food entrainment has been linked to the expression of a circadian food entrained oscillator (FEO) and the anatomical substrate of this oscillator seems to depend on diverse neural systems and peripheral organs. Previously we have described a differential involvement of hypothalamic nuclei in the food entrained process. For the food-entrainment pathway the communication between the gastrointestinal system and central nervous system is essential. The visceral synaptic input to the brain stem arrives to the dorsal vagal complex and is transmitted directly from the nucleus of the solitary tract (NST) or via to the parabrachial nucleus (PBN) to hypothalamic nuclei and other areas of the forebrain. The present study was aimed to characterize the response of brain stem structures in food entrainment. The expression of c-Fos immunoreactivity (c-Fos-IR) was used to identify neuronal activation. Present data show an increased c-Fos-IR following mealtime in all brain stem nuclei studied. Food entrained temporal patterns did not persist under fasting conditions indicating a direct dependence of feeding elicited signals for this activation. Because NST and PBN exhibited a different and increased response from that expected after a regular meal, we suggest that food-entrainment promotes ingestive adaptations that lead to a modified activation in these brain stem nuclei, e.g. stomach distension. Neural information provided by these nuclei to the brain, may provide the essential entraining signal for FEO.

Keywords: Circadian rhythms, Food entrained oscillator, Antipatory Activity,

## INTRODUCTION

When food is restricted to a few hours daily, animals exhibit food anticipatory activity (FAA) characterized by behavioural arousal and locomotor activation 2-3 h preceding food access (27,35). Corticosterone, free fatty acids and core temperature shift their phase anticipating the daily meal (13, 16, 21). Recent findings indicate that the oscillation of clock gene expression and of neuronal activity in (23) central oscillators outside the suprachiasmatic nucleus (SCN), as well as the oscillation of clock gene expression in peripheral tissues are entrained by feeding schedules (38,40).

It is well accepted that food entrainment depends upon a circadian oscillator independent of the SCN because food entrainment is elicited in animals with bilateral lesions of the SCN (34), because it can only be elicited when food is provided in a circadian range, and because FAA persists for several cycles during constant fasting conditions (35). It has been suggested that this food entrained oscillator (FEO) may be constituted by a distributed and possibly redundant system built up by diverse central nervous structures and peripheral organs involved with the processing and regulation of ingestive behaviour and energy balance (24,35). To characterize this model of FEO, it is necessary to identify which structures mediate the input of entraining signals, which structures constitute the clock work and which mediate the output that generates FAA.

Recently, using the expression of c-Fos-immunoreactivity (c-Fos-IR) as marker of neuronal activation, we reported entrainment and a differential response in hypothalamic nuclei due to restricted feeding schedules (2). This study showed that food entrainment produces increased c-Fos-IR anticipating and following meal

time in the dorsomedial nucleus (DMH), lateral hypothalamic nucleus (LH), perifornical area (PeF) and tuberomammilar nucleus (TM). Food-entrained c-Fos-IR patterns persisted after three days in fasting in the DMH, LH and PeF suggesting an involvement of these nuclei in a time keeping system entrained by feeding schedules. In contrast, we observed a marked cellular activation in the paraventricular (PVN) nucleus after meal time, which did not persist in fasting, suggesting that this structure is mainly involved with the response to signals elicited after feeding and could therefore be part of the entraining pathway (2). As a continuation of this study we have now attempted to describe the role of brain stem nuclei as mediators of visceral input in a food-entrainment protocol. Previous studies have reported that visceral denervation due to subdiaphragmatic vagotomy or capsaicin administration has no effect on food entrainment (9, 10, 28). However, we cannot rule out that in intact animals these structures may be playing a relevant role to transmit food-entraining signals.

The transmission of visceral information to the central nervous system (CNS) relies mainly on brain stem nuclei. The visceral input to the brain stem arrives first to the dorsal vagal complex; this complex is comprised by the nucleus of the solitary tract (NST), the dorsal motor nucleus of the vagus (DMX), and the area postrema (AP) (5, 6). Afferents from the autonomic system providing information about the visceral state project primarily to the NST and AP. Because the AP can also sense circulating humoral signals, it is considered a chemosensitive portion of the vagal complex (25). The NST and AP project to the parabrachial nucleus (PBN), and the PBN and the NST provide visceral information to hypothalamic

nuclei involved with the control of feeding behaviour (4), such as the PVN, DMH and LH, and to other areas of the forebrain.

According to the model of FEO based on a distributed system, communication between the gastrointestinal system and the CNS is an essential element for food entrainment. A previous study by Davidson et al (12) reported that bilateral lesions of PBN resulted in a marked attenuation of the FAA in food entrained rats, but AP lesions did not alter its expression (11). All together these findings suggested that food-entrainment may rely mainly on neural peripheral signals and not on humoral signals entering through the AP. Thus, the transmission of visceral information to the brain via brain stem nuclei could play an important role as entraining input elicited by feeding to the FEO.

The present study was aimed to characterize the response of brain stem structures as input pathways in a food-entrainment protocol. This response was studied using c-Fos-IR as a marker of cellular activation (29) . We hypothesized that cellular activation after meal time would point out structures involved with the reception or modulation of input visceral signals elicited by feeding, some of them possibly playing a role as entraining signals to the FEO. If this cellular activation is dependent of signals elicited by feeding, we would expect that this activation pattern would not be observed when interrupting this stimulus under total food deprivation.



## **MATERIALS AND METHODS**

### **Subjects and Housing Conditions**

Adult male Wistar rats weighing 250-300 g were maintained in a 12:12-h light-dark cycle (LD, lights on at 0700 h), regulated temperature ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ), free access to tap water and to regular laboratory rat diet (Rodent Laboratory Chow 5001), unless otherwise stated. Rats were acclimated to environmental conditions for at least 1 week before starting the experimental procedures. Animal handling was conducted according to the national guide for care and use of animal experimentation (Decreto ley de protección a los animales del Distrito Federal, Gaceta Oficial del Distrito Federal, 26/02/02), which complies with the guiding principles for research of the American Physiological Society (30).

### **Groups and Food Entrainment**

A first stage of the experiment explored the c-Fos-IR in the brain stem during food entrainment. Rats were randomly assigned to one of four feeding conditions for 3 weeks and were housed in groups of the same condition in transparent acrylic cages (40 X 50 X 20 cm). The *ad libitum* group (AL; n = 36) had free access to food; this group allowed to observe the expected c-Fos-IR under regular feeding conditions in a LD cycle. The food restricted group (RF; n = 36) was maintained under a restricted feeding schedule with food available daily for 2 h, meal time (1200 h) was defined as food-zeitgeber time 0 (F-ZT0). In order to discard that observed effects could be due either to a 22 h food deprivation interval or due to the fasting-refeeding conditions, two additional control groups were included (each n=6). For a 22 h fasting control (22F) rats were maintained with free food access for 3 weeks, on the last day of the experiment food was removed at 1400 h and

after 22 h of food deprivation, at F-ZT0 rats were perfused. Other rats (22F-R) were left 22 h in fasting, refed for 2 h and were then perfused and processed at F-ZT2 for immunohistochemistry.

The second stage of the experiment explored the persistence of the entrained c-Fos-IR pattern in fasting. Rats were assigned to one of two groups: one group was food entrained for 3 weeks, as the RF group, then allowed free food access for 5 days and left food deprived for 3 days (RF-AF). This procedure assessed the persistence of food-entrained rhythms for an 8 day interval. A fasting control group (Fast) was allowed free food access for three weeks and then was left food deprived for 3 days.

On the last day of each feeding protocol rats were perfused and brains were obtained. Because it is estimated that the intracellular cascade of events to produce peak levels of expression of the protein Fos takes around 45 min (29, 39), tissue was labelled and is presented according to the approximate corresponding time of the releasing stimulus. Brains were obtained for the time points 1000, 1100, 1200, 1400, 1800 and 2000 h, sampling points are further defined according to meal time as F-ZT22, F-ZT23, F-ZT0, F-ZT2, F-ZT6 and F-ZT8, respectively (n=6 per group and time). The day of perfusion animals of the F-ZT0 time point in the RF group remained unfed until anaesthetized and processed.

### **Histology and Immunohistochemistry.**

Rats were anaesthetized with an overdose of sodium pentobarbital (Sedal-Vet 65 mg/ml), and were perfused transcardially, with approximately 250 ml of 0.9% saline followed by 250 ml of fixative PLP (4% paraformaldehyde, 1.4% Lysine, 0.2% Sodium m-periodate) in phosphate buffer saline (PBS, 0.1M, pH 7.2). Brains were

removed, post fixed for 1 h in PLP and cryoprotected in 10, 20 and 30% sucrose for 24 h respectively.

Brains were frozen and cut at  $-18^{\circ}\text{C}$  in horizontal sections of  $40\mu\text{m}$ . Data corresponding to the hypothalamus of these same rats were already reported in a previous paper (2). Sections were serially collected in 4 sets, one set was stained with cresyl violet acetate (Sigma Chemical Company) and a second set was processed for immunohistochemistry for c-Fos as follows: The sections were incubated for 72 h at  $4^{\circ}\text{C}$  in primary antibody (rabbit anti-Fos; Santa Cruz Biotechnology, Inc.) diluted 1:2500 in PBS, 1% goat serum and 0.03% Triton X-100 (PBSGT). Tissue was then incubated in biotinylated secondary antibody (goat anti-rabbit; Vector Laboratories) 1:200 in PBSGT for 2 h at room temperature, followed by incubation in avidin-biotin complex (0.9% avidin and 0.9% biotin solutions; Vector Laboratories) in PBSGT for 2 h at room temperature. Tissue was then reacted in diaminobenzidine (0.5 mg/ml, in Trizma buffer 7.2) with hydrogen peroxide ( $35\mu\text{l}$ , 30% $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Between each step, tissue was rinsed three times, for 10 min in PBS. Tissue was mounted on gelatin-coated slides and label was intensified with osmium tetroxide 0.1% for 30 sec. (Baker Analyzed), dehydrated with alcohol, cleared with xylene and cover slipped with Permount.

### **Cell Count**

In order to quantify c-Fos expression in brain stem nuclei, two representative sections were selected in accordance with the stereotaxic atlas from Paxinos and Watson (32). A first ventral section (Interaural 1.90 mm) was selected to quantify c-

Fos-IR in the NST, AP and DMX. A second section (Interaural 2.66 mm) contained the PBN. For analysis, NST was divided in caudal, medial and rostral sections according to Ter Horst and Streefland (36). Also the PBN was divided in medial and lateral subregions for analysis (20). Images of the corresponding cresyl violet sections were acquired in order to identify and define the sampling area for each nucleus. Images of selected sections were obtained using a computerised image analysis system (Meta Vue series 4.5, Universal Imaging Corporation) attached to a Nikon light microscope (Nikon Eclipse E600). On the left side of each section a grid of 25 squares  $40 \times 40 \mu\text{m}$  was superimposed on the center of the selected structure and c-Fos-IR cells comprised in the area of the grid were counted at a 10X magnification. To minimise the number of false positives, background optic density was established in a nearby region lacking c-Fos-IR, stained cells that reached or surpassed 3X the background optic density were considered positive and were included, whereas cells under this staining threshold were discarded. A single examiner, who was blinded to treatment conditions, performed all counts.

### **Data Analysis**

The number of cells for each sampled area are expressed as cells/mm<sup>2</sup>. Data were classified by groups and time and are represented as mean  $\pm$  standard error of the mean (sem). Data between the AL and RF group, as well as data for RF-AF vs Fast, were compared with a two-way ANOVA for independent measures with a factor for group (2 levels) and a factor for time (6 levels). Values from the 22F and the 22F-R group, were compared with values of the RF group, at F-ZT0 and at F-

ZT2 respectively, using a one way ANOVA for independent measures. The two way ANOVA's were followed by a Tukey post hoc test with significant values set at  $p < 0.01$ . Statistical analysis was performed with the program Statistica version 4.5 (StatSoft, Inc. 1993).

## RESULTS

All nuclei studied in the brain stem exhibited c-Fos-IR. The AL group exhibited constant counts in all time points and no evident oscillations. In the RF rats a significant increase of c-Fos-IR was observed in all brain stem nuclei after feeding in F-ZT2 and F-ZT6 as can be observed for the NST ( Figure 1). The two way ANOVA indicated for all nuclei a significant effect due to the factor group, the factor time and their interaction ( Table 1).

In the three regions of the NST (Figure 2) there was no difference in the number of c-Fos-IR cells at F-ZT0 between RF group and the 22F group but after feeding at F-ZT2 there was a significant difference in the number of c-Fos-IR cells between RF and 22F-R (rostral  $F_{(1,8)}=13.3$ ;  $p < 0.001$ ; medial  $F_{(1,8)}=100.9$ ;  $p < 0.001$ ; caudal  $F_{(1,8)}=22.7$ ;  $p < 0.001$ ).

In the PBN, in both lateral and medial, RF rats showed an increase in c-Fos-IR at ZT2 and ZT6 as a response of feeding (Figure 3). There was no difference in the number of c-Fos-IR cells between F-ZT0 of RF group and the 22F group, and after meal time at F-ZT2 both PBN regions in the RF group were different from the 22F-R group (medial,  $F_{(1,8)}=35.8$ ;  $p < 0.001$ ; lateral,  $F_{(1,8)}=9.8$ ;  $p < 0.05$ ).

In the AP and the DMX (Figure 4) the number of c-Fos-IR cells at F-ZT0 and F-ZT2 in the RF group were not different from the 22F group and the 22F-R, respectively.

### **c-Fos-IR in fasted rats**

The fasted groups exhibited low c-Fos-IR expression in all nuclei compared to the AL and the RF groups perhaps due to the catabolic state caused by 3 days of fasting. The food-entrained pattern observed previously in the RF group did not persist in the RF-FA group. In addition this later group did not show a difference in c-Fos-IR cells from the Fast group (Figures 2B, 3B,4B). ANOVA indicated no effect due to either factors group, time nor its interaction (table 2).

## **DISCUSSION**

Present results show that during food-entrainment there is an increased c-Fos-IR after feeding (F-ZT2 and F-ZT6) in all evaluated brain stem structures. This response was statistically different from the AL group for all nuclei. Before meal time none of the nuclei exhibited different values from the AL or 22F groups. Thus main effects were only expressed after feeding. In addition values in the NST and PBN at F-ZT2 were different from the expected response after a fasting-refeeding process (22F-R). Because the entrained pattern did not persist in fasting conditions, we assume that the c-Fos IR activation in all these nuclei is promoted by signals elicited by feeding and/or digestion. These results are consistent with

previous data which reported increased c-Fos-IR in brain stem nuclei after a meal (14, 31).

The NST is the main afferent relay structure receiving visceral information from the periphery and transmitting it to the central nervous system. The caudal subregion receives, among others, afferents from the stomach, gut and the liver. Previous studies have reported increased c-Fos expression in NST due to stomach distension produced by inflation of a gastric balloon (18) or by feeding (15).

Therefore, we assume that the c-Fos-IR activation observed at F-ZT2 and at F-ZT6 is mainly due to the stomach distension consequent to feeding. In our study c-Fos-IR at F-ZT2 and at F-ZT6 in the RF group was different from that expected after a regular meal, as compared with the 22F-R group. The observed cellular activation suggests that signals elicited in food-entrained rats were different and more intense than those produced by visceral activation after a regular meal. In a previous study we reported that RF rats develop an enhanced capacity of stomach distension that reaches up to 200% from the stomachs of AL animals after a regular meal. Also, the stomach of RF rats exhibits a slow emptying rate that allows food absorption for a prolonged interval (24). This adaptive process was also observed in young rabbits, which are nursed only once a day by their lactating dams (17). This indicates a relevant role of the NST receiving specific signals elicited during food-entrainment that will be transmitted to the brain and possibly to food-entrained system.

In the NST rostral region there was decrease of activity at F-ZT6. The rostral region of NST receives afferents from the glossopharyngeal, facial, vagal and hypoglossal nerves, providing sensitive and motor information of the mouth and

tongue (5). Thus, in this region the decrease in c-Fos-IR at F-ZT6 in RF animals, may reflect a reduction of the oropharyngeal signals evoked by feeding behaviour. The c-Fos-IR in the AP increased after mealtime at F-ZT2 and F-ZT6 with a similar pattern as that observed in the NST, however, in this area the response at F-ZT2 in RF rats was not different from the expected response after a regular feeding episode as observed in the 22F-R group. This suggests that the signals arriving to the AP in RF rats are of similar nature as those elicited after a regular meal. The AP is an organ which lacks blood-brain barrier, and responds mainly to humoral signals from the periphery as cholecystokinin (CCK), but not to the mechanical distension of the stomach by a gastric balloon (18,19). This strongly suggest that under RF humoral signals after feeding are similar to those elicited by a regular feeding event. A previous study did not find effects on food entrainment in rats with AP lesions (12), which points out the relevance of neural signals provided by other structures to entrain the FEO.

In the PBN the c-Fos-IR in RF rats was different from the expected response after an 22h fasting-2h refeeding event. The PBN is a second order relay nucleus for neural projections from the NST and AP to the brain (4, 20). Thus the c-Fos-IR activation in RF rats was probably due to information of stomach distension and oropharyngeal signals from the NST. The pattern of c-Fos-IR was similar in both lateral and medial PBN regions, and both receive the same afferents from NST and AP (20). A previous study reported that bilateral ibotenic lesions of PBN produced a decrease in FAA onset and intensity. The authors concluded that because PBN is a relay structure from the periphery to the hypothalamus, and other regions of the brain, lesions were partially eliminating the incoming signal to entrain the FEO



(12). Our results indicate that under food-entrainment the PBN exhibits a different and enhanced response to a meal, and thus confirm that PBN may be a relevant structure for the food-entrainment pathway.

The DMX is the main parasympathetic output to the periphery, it receives direct afferents from the paraventricular hypothalamic nucleus (7), which also exhibits increased c-Fos-IR in RF rats after meal-time (1,2,8). Information from the PVN and NST projects to the DMX (7, 33) and then to the digestive system through the vagal nerve to produce responses for initiation of gastrointestinal motor and secretory events. The response in the digestive tract promotes multiple neural and humoral feedback signals that contribute to the correct coordination of the events associated with digestion. In this study the response in the DMX in RF rats did not differ from the expected response before and after a regular meal in the control 22F and 22F-R groups.

Our results indicate that brain stem nuclei involved in the transmission of digestive and oropharyngeal information to the brain are activated after meal time during a food-entrainment paradigm. They also indicate that under food-entrainment the NST and PBN exhibit a different increased c-Fos-IR response from that observed after a single fasting-refeeding event. This differential response may be due to modified adaptive adjustments of the stomach or of other digestive organs. We cannot discard the possibility that other signals associated with meal-time can also provide entraining signals for FEO. Previous studies have reported that corticosterone (3), adrenaline (37) and insulin (22) can entrain peripheral oscillators, and can produce FAA (26). Thus hormonal changes may also provide time cues to central or peripheral oscillators. However, our data point out a relevant

activation in brain stem nuclei specially NST and PBN, in phase with meal time, which may be important elements to transmit specific signals involved with food-entrainment.

According to our previous study and present data we can suggest that several hypothalamic nuclei are activated associated with the expression of FAA and may be part of the output or of the clock work of FEO, while brain stem nuclei are activated after meal time and may provide information about entraining signals to this oscillatory system. Further studies will have to elucidate whether other CNS areas may also contribute to promote food-entrainment.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This study was supported by grants CONACyT 43950-M and DGAPA IN-203803, IX-227504-1. Authors wish to thank Dr. Raúl Aguilar (IFC, UNAM) for providing a cryostat to cut the sections described in this study. We also want to thank Dr. Horacio de la Iglesia Department of Neurology, University of Massachusetts, USA for comments and grammatical corrections to this manuscript.

## REFERENCES:

1. **Allingham K, von Saldern C, Brennan PA, Distel H, and Hudson R.** Endogenous expression of c-Fos in hypothalamic nuclei of neonatal rabbits coincides with their circadian pattern of suckling-associated arousal. *Brain Res* 783:210-218,1998.
2. **Ángeles-Castellanos M, Aguilar-Roblero R, and Escobar C.** c-Fos expression in the hypothalamic nuclei of food-entrained rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286: R159-R165, 2004.
3. **Balsalobre A, Brown SA, Marcacci L, Tronche F, Kellendonk C, Reichardt HM, Schutz G, and Schibler U.** Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science* 289:2344-2347, 2000.
4. **Berthoud HR.** Multiple neural system controlling food intake and body weight. *Neurosc Biobehav Rev* 26:393-428, 2002.
5. **Berthoud HR and Neuhuber WL.** Functional and chemical anatomy of afferent vagal system. *Auton Neurosci* 85:1-17, 2000.
6. **Broberger C and Hökfelt T.** Hypothalamic and vagal neuropeptide circuitries regulating food intake. *Physiol Behav* 74:669-682, 2001.

7. **Buijs RM, Chun SJ, Nijijima A, Romijn HJ, and Nagai K.** Parasympathetic and sympathetic control of the pancreas: a role for the suprachiasmatic nucleus and other hypothalamic centers that are involved in the regulation of food intake. *J Comp Neurol* 432:405-423, 2001.
  
8. **Caba M, Ravirosa MJ, and Silver R.** Suckling and genital stroking induces Fos expression in hypothalamic oxytocinergic neurons of rabbit pups. *Brain Res Dev Brain Res* 143:119-128, 2003.
  
9. **Comperatore CA and Stephan FK.** Effects of vagotomy on entrainment of activity rhythms to food access. *Physiol Behav* 47:671-678, 1990
  
10. **Davidson AJ and Stephan FK.** Circadian food anticipation persists in capsaicin deafferented rats. *J Biol Rhythms* 13:422-429, 1998.
  
11. **Davidson AJ, Aragona BJ, and Stephan FK.** Persistence of meal-entrained circadian rhythms following area postrema lesions in the rat. *Physiol Behav* 74:349-354, 2001.
  
12. **Davidson AJ, Cappendijk SL, and Stephan FK.** Feeding-entrained circadian rhythms are attenuated by lesions of the parabrachial region in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278:R1296-R1304, 2000

13. **Díaz-Muñoz M, Vázquez-Martínez O, Aguilar-Roblero R, and Escobar C.** Anticipatory changes in liver metabolism and entrainment of insulin, glucagon, and corticosterone in food-restricted rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279:R2048-R2056, 2000.
14. **Emond MH and Weingarten HP.** Fos-like immunoreactivity in vagal and hypoglossal nuclei in different feeding states: a quantitative study. *Physiol Behav* 58:459-465, 1995.
15. **Emond MH, Schwartz GJ, and Moran TH.** Meal-related stimuli differentially induce c-Fos activation in the nucleus of the solitary tract. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280:R1315-21, 2001.
16. **Escobar C, Díaz-Muñoz M, Encinas F, and Aguilar-Roblero R.** Persistence of metabolic rhythmicity during fasting and its entrainment by restricted feeding schedules in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 274:R1309-R1316, 1998.
17. **Escobar C, Hudson R, Martínez-Gómez M, and Aguilar-Roblero R.** Metabolic correlates of the circadian pattern of suckling-associated arousal in young rabbits. *J Comp Physiol* 186:33-38, 2000.

18. **Fraser KA and Davison JS.** Gastric distention induced c-fos immunoreactivity in the rat brain stem. *Ann N Y Acad Sci* 713:164-166, 1994.
19. **Fraser KA and Davison JS.** Meal-induced c-fos expression in brain stem is not dependent on cholecystokinin release. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 265:R235-R239, 1993.
20. **Herbert H, Moga MM, and Saper CB.** Connections of the parabrachial nucleus with the nucleus of the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat. *J Comp Neurol* 293:540-580, 1990.
21. **Krieger DT.** Regulation of circadian periodicity of plasma corticosteroid concentrations and of body temperature by time of food presentation. In *Biological Rhythms and Their Central Mechanisms*, Suda M, Hayaishi O and Nakagawa H, (Ed) pp 247-259, Elsevier/ North-Holland Biomedical Press Amsterdam, 1979.
22. **Kuriyama K, Sasahara K, Kudo T, and Shibata S.** Daily injection of insulin attenuates impairment of liver circadian clock oscillation in the streptozotocin-treated diabetic mouse. *FEBS Lett* 572:206-210, 2004.
23. **Kurumiya S and Kawamura H.** Damped oscillation of the lateral hypothalamic multineuronal activity synchronized to daily feeding schedule

in rats with suprachiasmatic nucleus lesions. *J Bio Rhythms* 6:115-127, 1991.

24. **Martínez-Merlos MT, Ángeles-Castellanos M, Díaz-Muñoz M, Aguilar-Roblero R, Mendoza J, Escobar C.** Dissociation between adipose tissue signals, behaviour and the food-entrained oscillator. *J Endocrinol* 181:53-63, 2004.
25. **McCann MJ and Rogers RC.** Impact of antral mechanoreceptor activation on the vago-vagal reflex in the rat: functional zonation of responses. *J Physiol* 453:401-411, 1992.
26. **Mendoza JY, Aguilar-Roblero R, Díaz-Muñoz M, and Escobar C.** Daily epinephrine but not norepinephrine administration produces anticipatory drinking behavior in rats. *Biol Rhythm Res* 34:73–90, 2003.
27. **Mistlberger RE.** Circadian food-anticipatory activity: formal models and physiological mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev* 18:171-195, 1994.
28. **Moreira AC and Krieger DT.** The effects of subdiaphragmatic vagotomy on circadian corticosterone rhythmicity in rats with continuous or restricted food access. *Physiol. Behav.* 28:787-790, 1982.

29. **Morgan JI and Curran T.** Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes *fos* and *jun*. *Annu Rev Neurosci* 14:421-451, 1991.
30. **National Research Council.** Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington, DC: National Academy Press, 1996.
31. **Olsen BR, Freilino M, Hoffman GE, Sved AF, Stricker EM, and Verbalis JG.** c-Fos expression in rats brain stem nuclei in response to treatment that alters food intake and gastric motility. *Mol Cell Neurosci* 4:93-106, 1993.
32. **Paxinos G and Watson C.** *The rat brain in stereotaxic coordinates*. New York, Academic Press, 1998.
33. **Rinaman L.** Oxytocinergic inputs to the nucleus of the solitary tract and dorsal motor nucleus of the vagus in neonatal rats. *J Com Neurol* 399:101-119, 1998.
34. **Stephan FK, Schwann JM, and Sisk CL.** Entrainment of circadian rhythms by feeding schedules in rats with suprachiasmatic lesions. *Behav and Neural Biol* 25:545-554, 1979.



35. **Stephan FK.** Food-entrainable oscillators in mammals. In *Circadian Clocks*, JS Takahashi, FW. Turek and RY Moore (Ed), pp 223-246. Kluwer Academic/Plenum Publishers New York, 2001.
36. **Ter Horst GJ and Streefland C.** Ascending projections of the solitary tract nucleus. In *Nucleus of the solitary tract*, Edited by Robin I and Barraco A, pp 93-104. CRC press, Inc., Boca Raton, Florida 1994.
37. **Terazono H, Mutoh T, Yamaguchi S, Kobayashi M, Akiyama M, Udo R, Ohdo S, Okamura H, and Shibata S.** Adrenergic regulation of clock gene expression in mouse liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:6795-6800, 2003.
38. **Wakamatsu H, Yoshinobu Y, Aida R, Moriya T, Akiyama M, and Shibata S.** Restricted-feeding-induced anticipatory activity rhythm is associated with a phase-shift of the expression of mPer1 mRNA in the cerebral cortex and hippocampus but not in the suprachiasmatic nucleus of mice. *Euro J Neurosc* 13:1190-1196, 2001.
39. **Wang Y, Cummings SL, and Gietzen DW.** Temporal-spatial of c-fos expression in the rat brain in response to indispensable amino acid deficiency I. The initial recognition phase. *Molecular Brain Res* 40:27-34, 1996.

40. **Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, Ueda M, Block G, Sakaki Y, Menaker M, and Tei H.** Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* 288:682-685, 2000.

## FIGURES LEGENDS

**Figure 1.** Microphotograph illustrating c-Fos immunoreactive cells for all temporal points in representative sections of the NST in food-entrained rats. sol: solitary tract; NST: nucleus of the solitary tract; 4V: fourth ventricle. Scale bar corresponds to 100  $\mu\text{m}$ .

**Figure 2.** Number of c-Fos immunoreactive cells in the three subdivisions of the NST (**A**) in food-entrained rats (RF; white circles) in their *ad libitum* controls (AL; dark circles) and (**B**) in food-entrained - fasted rats (RF-AF; white rhombus) and in their fasting controls (Fast; dark rhombus). in **A** The 22 h fasted controls (22F) and the fasted-refed (22F-R) controls are represented as a white striped overlaid bar at F-ZT0 and F-ZT2, respectively. Horizontal bar on the abscissa represents mealtime in **A** and expected mealtime in **B**. \* =  $p < 0.05$  indicates significant difference between AL and RF, + =  $p < 0.05$  indicates significant difference between the corresponding RF time point and the 22F or 22F-R controls. RF rats in the three subdivisions of the NST showed increase in the number of c-Fos-IR cells immediately after feeding at F-ZT2 and F-ZT6. In the three subdivisions of the NST the RF-AF and Fast group did not show oscillations in the number of c-Fos-IR cells.

**Figure 3.** Number of c-Fos immunoreactivity cells in the F-ZT2 and F-ZT6 RF rats showed an increase in c-Fos-IR cells in both regions of the PBN (lateral and medial). Cell counts of the RF were significantly different from the AL group. \* $p < 0.01$ . In RF group the number of c-Fos-IR in F-ZT2 in both regions of the PBN was different from the 22F-R group (+  $p < 0.001$ ). The pattern of c-Fos-IR cells did not oscillate in RF-AF nor in the Fast group. Other indications as in Fig.2

**Figure 4.** In the AP and DMX an increase of c-Fos-IR cells was observed in the RF group. The number of cells was different from the AL group (\* $p < 0.001$ ), but the number of c-Fos-IR cells of the RF group was not different from 22F nor from the 22R-F, indicating that the observed activity corresponded to the expected response in a 22 h fasting and 22 h fasting-refeeding condition. In fasting the c-Fos-IR cells were not different between groups. Other indications as in Fig.2

**Table 1.** Statistical values obtained with the two way ANOVA for independent measures, for the group entrained to feeding schedules and its *ad libitum* controls and the 6 temporal points.

NUCLEUS	GROUP		TIME		G x T		
	F <sub>(1,60)</sub>	p<	F <sub>(5,60)</sub>	p<	F <sub>(5,60)</sub>	p<	
NST	Rostral	23.2	.001	7.84	.001	6.79	.001
	Medial	157.3	.001	67.2	.001	78.8	.001
	Caudal	73.4	.001	27.3	.001	31.2	.001
PBN	Lateral	27.6	.001	19.4	.001	21.3	.001
	Medial	7.81	NS	15.4	.001	28.8	.001
AP		17.7	.001	9.26	.001	6.51	.001
DMX		20.9	.001	13.9	.001	14.2	.001

**Table 2.** Statistical values obtained with the two way ANOVA for independent measures, for the refeeding- fasting group and its fasted controls.

NUCLEUS	GROUP		TIME		G x T	
	F <sub>(1,54)</sub>	p<	F <sub>(5,54)</sub>	p<	F <sub>(5,54)</sub>	p<
NST Rostral	1.02	NS	2.63	NS	3.34	NS
	0.27	NS	0.37	NS	1.85	NS
	0.12	NS	1.88	NS	1.69	NS
PBN Lateral	2.00	NS	0.50	NS	0.99	NS
	5.81	NS	1.36	NS	1.27	NS
AP	12.5	NS	3.80	NS	0.90	NS
DMX	23.4	.01	3.37	NS	0.51	NS

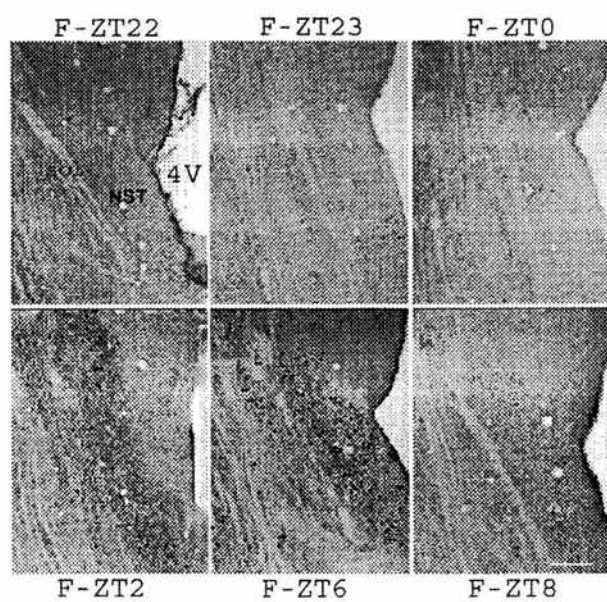


FIGURE 1

NUCLEUS OF THE SOLITARY TRACT

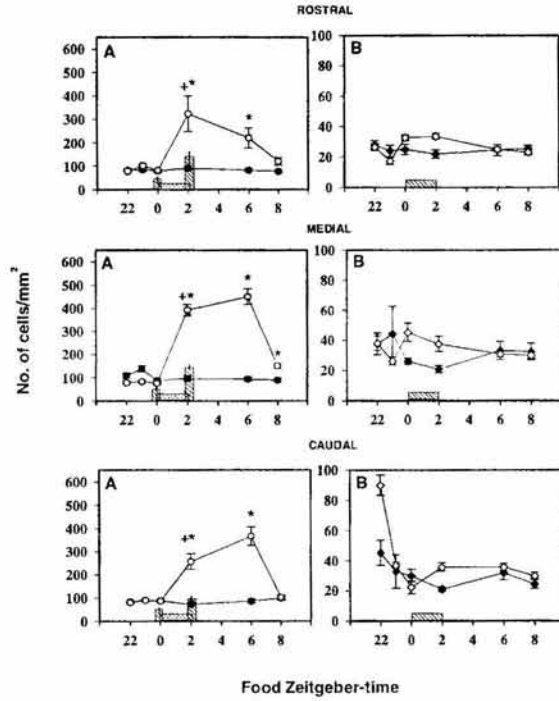


FIGURE 2



PARABRACHIAL NUCLEUS

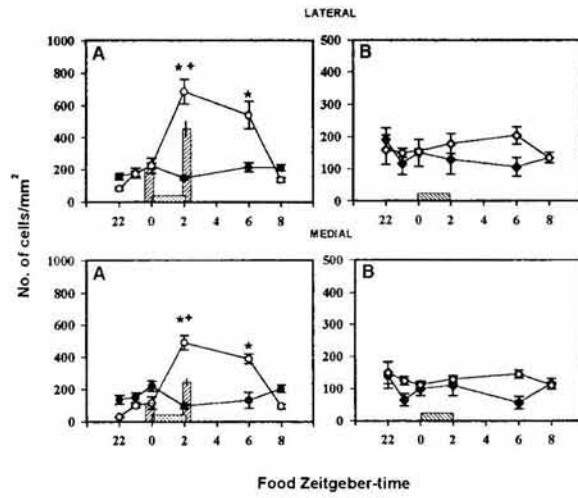


FIGURE 3

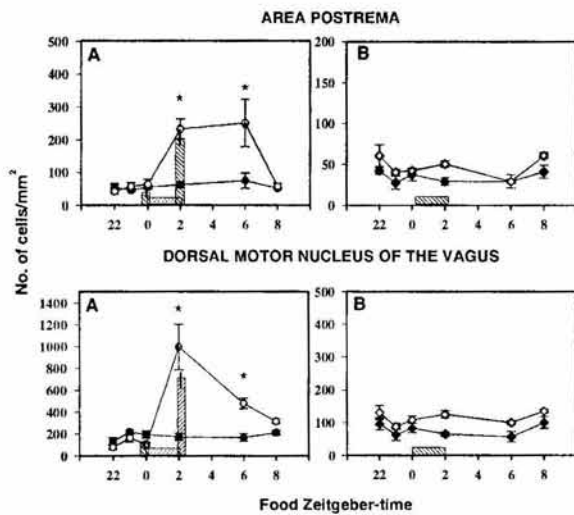


FIGURE 4