



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**ACTIVACIÓN CIRCADIANA DE LAS NEURONAS
ALFA-MSH DEL NÚCLEO ARQUEADO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOLÓGA

P R E S E N T A:

GUZMÁN RUIZ MARA ALAIDE



**DIRECTOR DE TESIS:
RUDOLF MARINUS BUIJS
2010**



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.

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO CON EL APOYO DE DGAPA Y CONACYT.

AGRADECIMIENTOS

Se dice por ahí que la gratitud se demuestra con hechos, pues las palabras se las lleva el viento...

Había una vez un hombre con sombrero, guaraches de piel, bigote y pantalones de mezclilla conservados en refresco de Cola...

Era un hombre, de aquellos de los que hoy hablamos en los erase una vez, justos pecadores del sistema, cuya posición ideológica marca la diferencia de los que los conocen. Letrado escritor ejemplo de pocos y mi héroe personal, mi tío favorito de todos los tiempos...

Ese hombre ahora es padre, amigo y mi máspreciado ejemplo a seguir. Gracias, muchas gracias, nada de lo que soy y seré podrá demostrar el cariño que te tengo, pues asumiste papeles que no eran tu obligación y nunca preguntaste o exigiste un por qué...

Escasas son las líneas en un trabajo que no cambiará ni salvará al mundo, pero heme aquí, tratando de ser idealista, destrozando un par de páginas en blanco para decirte...

...que esta es mi forma de agradecerte por todo lo que has hecho por mí, por creer, por estar a mi lado, por no pedirme gratitud, aunque sobre mi querido Arturo...

Personas que vale la pena mencionar...

Maury; te amo, eres el todo y el por siempre, **Daniel**; el significado del amor a pesar de la distancia, **Antonio**; muchas buenas y valiosas lecciones, **Dr. Buíjs**; excelente maestro y amigo, **Araceli**; mi compañera de vida, **Lupita**; siempre incondicional e imparcial, **Me**; mi confidente, **Zuel**, **Val e Ixchelilla**; mis mejores adquisiciones de la carrera, **Roberto**, **Nadia**, **Maricarmen Basualdo Dra. Escobar**, **Dra. Fanjúl**, **Julio**, **Elsa**, **Marlén** y **Daniela**...

Miguel Jácome, Adriana (Chel), la bandota del Opium Garden...

Todo lo que soy, todo lo que hago, todo lo que amo, todo lo que deseo, todo lo que vivo,
TODO...

La presente tesis está dedicada en su totalidad a la persona que más he amado y amaré,
a la persona que más me ha dolido, a la persona que más extraño y extrañaré...
...al ANGEL mis días, mi madre.

Existencias hay muchas, la tuya es la que valió por todas la que pueda llegar a
conocer... TE AMO

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno
Guzmán
Ruiz
Mara Alaide
56739306
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
302127375
2. Datos del tutor
Doctor en Neurociencias
Rudolf Marinus
Buijs
3. Datos del sinodal 1
Doctora en Ciencias
María Luisa
Fanjúl
Peña
4. 4. Datos sinodal 2
Doctor en Ciencias
Manuel
Miranda
Anaya
5. 5. Datos sinodal 3
Doctora en Ciencias
Elsa Guadalupe
Escamilla
Chimal
6. Datos sinodal 4
Maestro en Ciencias
Julio Alejandro
Prieto
Sagredo
7. Datos del trabajo escrito
Activación circadiana de las neuronas alfa-MSH del Núcleo Arqueado
48 p
2010

ÍNDICE

1. RESUMEN
2. INTRODUCCIÓN
 - 2.1. RITMOS BIOLÓGICOS
 - 2.1.1. ¿Qué es un ritmo biológico?
 - 2.1.2. Tipos de ritmos
 - 2.1.3. Ritmos circadianos
 - 2.1.4. Relojes biológicos
 - 2.2. EL RELOJ BIOLÓGICO EN MAMÍFEROS, EL NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO
 - 2.2.1. El hipotálamo
 - 2.2.2. El Núcleo Supraquiasmático
 - 2.2.3. Recepción de señales fóticas
 - 2.2.4. Poblaciones neuronales del Núcleo Supraquiasmático
 - 2.2.5. El NSQ como reloj maestro
 - 2.3. METABOLISMO Y HOMEOSTÁSIS
 - 2.4. BALANCE ENERGÉTICO
 - 2.4.1. Neuropeptidos
 - 2.4.2. Moléculas periféricas
 - 2.5. NÚCLEO ARQUEADO (ARC)
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA
4. OBJETIVO
5. HIPÓTESIS
6. MATERIAL Y MÉTODO
 - 6.1. ANIMALES
 - 6.2. INMUNOHISTOQUÍMICA
 - 6.3. CUANTIFICACIÓN
 - 6.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO
7. RESULTADOS
 - 7.1. LAS NEURONAS DEL ARC PRESENTAN UN RITMO DE ACTIVACIÓN BAJO CONDICIONES *AD LIBITUM*.
 - 7.2. LAS NEURONAS DEL ARC PRESENTAN UN RITMO DE ACTIVACIÓN AÚN BAJO CONDICIONES DE AYUNO

8. DISCUSIÓN

9. CONCLUSIÓN

10. BIBLIOGRAFÍA

1. RESUMEN

El presente trabajo intenta abordar la relación entre el sistema circadiano y el sistema metabólico del organismo, por medio del estudio de la relación entre dos núcleos hipotalámicos. El núcleo Arqueado (ARC) juega un papel muy importante en la integración de señales que indican el estado metabólico del organismo, la disponibilidad de nutrientes, así como en el balance energético, sirve como sensor de metabolitos, dada su posición en el cerebro y emite respuestas relacionadas con el estado energético del organismo. El Núcleo Supraquiasmático (NSQ) se encuentra involucrado en la organización temporal de las funciones fisiológicas y conductuales del organismo. Conexiones neuronales recíprocas entre el ARC y el NSQ han sido probadas.

Para investigar la interacción entre estas dos estructuras así como la interacción entre el estado metabólico y las respuestas diarias de este, se determinó el patrón de expresión diaria en el ARC y en las neuronas α -MSH del mismo, neuronas de acción anorexigénica posterior a la ingesta, en ratas bajo condiciones *ad libitum* y de ayuno. Para esto los animales fueron perfundidos a distintas horas circadianas Zt 2, 6, 10, 14, 18 y 22. Se realizó un ensayo de inmunohistoquímica para la proteína del gen de acción inmediata c-Fos, en conjunto con α -MSH, para así tener un doble marcaje.

Sin alimento se observó que el patrón de activación diario de α -MSH se mantiene igual que en los animales bajo condiciones de alimentación *ad libitum*. La expresión total de c-Fos en el ARC se vio disminuida.

La persistencia de la activación de α -MSH bajo condiciones de ayuno, indica que aún sin saciedad, la actividad de estas neuronas continúa siguiendo un patrón circadiano, lo que sugiere un papel activo del NSQ en la activación de las neuronas α -MSH en el ARC y por ende del control de la ingesta de alimento y el balance energético.

2. INTRODUCCIÓN

El planeta Tierra presenta ambientes con características físicas cíclicas tales como el día y la noche, o el aumento y la disminución de la temperatura del medio. Toda la vida en la Tierra como la conocemos actualmente, depende en una parte importante de la presencia del Sol, ya que debido a que nuestro planeta gira sobre su propio eje, expone a todos los organismos a cambios diarios con la intensidad de luz, los cuales han generado adaptaciones conductuales en dichos seres vivos. Desde organismos unicelulares hasta mamíferos como los humanos, casi todos han ajustado su periodo de actividad para optimizar su supervivencia. Consecuentemente, los organismos han adaptado sus estilos de vida de tal manera que organizan sus actividades en ciclos de aproximadamente 24h, determinados por el ciclo de luz-oscuridad. Es así, que la organización temporal es una característica fundamental de los organismos (Pittendrigh C, 1993).

2.1. RITMOS BIOLÓGICOS

2.1.1. ¿Qué es un ritmo biológico?

No todas las funciones de los individuos se presentan de manera constante; cuando un proceso orgánico es estudiado durante un periodo prolongado de tiempo en cualquier ser vivo, se puede observar que se alternan periodos de máxima actividad con periodos de actividad escasa o nula de dicha función. Cuando estas variaciones fisiológicas se presentan con regularidad, se les denomina **ritmos biológicos** (Gruart A, et al., 2002).

Por definición, un ritmo biológico es un fenómeno adaptativo presente tanto en individuos como en especies, relacionado con cambios predecibles y recurrentes a intervalos regulares de tiempo ya sea en la conducta o en funciones fisiológicas (Gruart A, et al., 2002).

Un problema difícil de resolver acerca de los ritmos biológicos es su origen, si éstos se originan en respuesta a fenómenos ambientales cíclicos, y en tal caso serían considerados de origen **exógeno**, o bien, si son generados por el mismo organismo, considerándolos así, de naturaleza **endógena**. Sin embargo, muchos de los ritmos diarios persisten con periodos generados intrínsecamente de aproximadamente 24h, aún bajo condiciones constantes sin alguna señal externa, indicando la presencia de un sistema de medición de tiempo autónomo en cada organismo. Tal sistema se llama “reloj circadiano” (Moore RY y Eichler VB, 1972) Para evaluar a los ritmos biológicos se consideran una serie de variables que describen las propiedades de una curva sinusoidal (Figura 1), dichas variables son:

- **Periodo:** tiempo necesario que transcurre entre el inicio de un ciclo y el inicio del siguiente.
- **Frecuencia:** es el inverso del período e indica el número de ciclos por unidad de tiempo.
- **Amplitud:** diferencia que existe entre el valor máximo y el valor mínimo de un parámetro que oscila.
- **Mesor:** promedio de todos los valores dados en la curva.
- **Fase:** momento en que ocurre un hecho característico dentro del ciclo.
- **Acrofase:** momento del ciclo en el que el fenómeno presenta su valor máximo. (Dunlap J, et al., 2004).

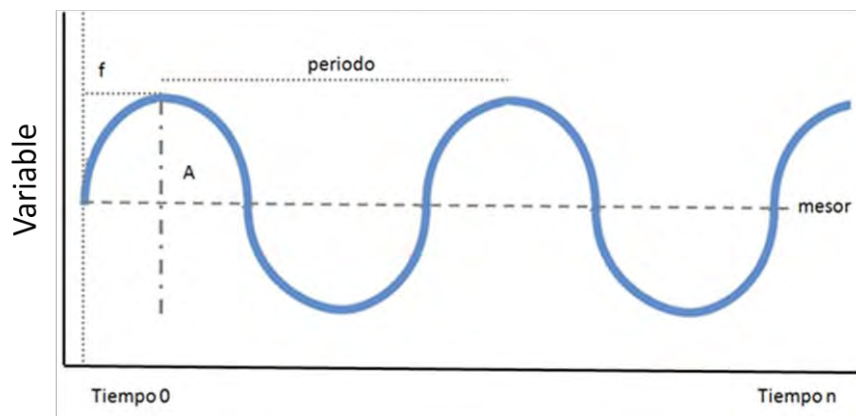


Figura 1. Parámetros y estimados estadísticos que definen una curva sinusoidal, donde f ; acrofase y A ; amplitud.

2.1.3 Tipos de ritmos

Aquellos ritmos biológicos que son el resultado de la adaptación del organismo a las variaciones cíclicas en el ambiente se caracterizan, en condiciones naturales, porque la frecuencia del ritmo es igual a la frecuencia de las variaciones cíclicas de los fenómenos geofísicos con los que se acoplan.

Sin embargo, cuando estos ritmos se estudian en condiciones constantes, se presentan con una frecuencia cercana, pero no necesariamente igual, a la que muestran en condiciones naturales, a lo que se le denomina **oscilación libre**, cuando esto sucede, se dice que el ritmo en cuestión es de naturaleza **endógena**.

Por otra parte existen ritmos con una frecuencia cercana a la de las mareas, conocidos como ritmos *circamareales*, otros diarios, llamados *circadianos*, otros con frecuencias anuales, llamados *circanuales* y por último, los cercanos al ciclo lunar, los *circalunares*. El prefijo *circa* se refiere a *cercano a* (Gruart A et al., 2002). Esta clasificación de los ritmos biológicos, fue acuñada con respecto a los fenómenos naturales cíclicos, sin embargo, también existe otra clasificación que se determina por su frecuencia tomando como punto de comparación las 24h del día. De esta forma podemos mencionar tres clases de ritmos:

- **Circadianos**: los que tienen una frecuencia cercana o igual a un día.
- **Ultradianos**: presentan una frecuencia mayor a un día, por ejemplo la frecuencia cardiaca y respiratoria.
- **Infradianos**: su frecuencia es menor a un día como en el caso del ciclo menstrual.

La estabilidad en la duración de los ritmos está íntimamente relacionada con las señales ambientales, tal como la duración del día y la noche, las fases de la luna, los cambios de humedad, temperatura y presión atmosférica, entre otros. Tales señales ambientales permiten que cada día, mes o año, se ajusten los ritmos, este fenómeno se llama **sincronización**.

A los estímulos capaces de sincronizar a los ritmos se les llama sincronizadores o **Zeitgebers**; palabra de origen alemán que significa “el que da tiempo” (Dunlap J. et al, 2004).

Los ritmos circadianos son los ritmos más estudiados y han servido como modelo experimental para entender los fenómenos fisiológicos y conductuales cíclicos, además de que han sido tomados en cuenta para clasificar a los demás de acuerdo a su frecuencia (Gruart A et al., 2002).

2.1.3. Ritmos circadianos

Los ritmos circadianos, son aquellos en los cuales su oscilación endógena, se presenta con periodos aproximados de 24h (Aschoff J, 1981). Ejemplo de ellos son los ritmos de secreción de cortisol, de melatonina, el ritmo de actividad locomotora, el ciclo sueño-vigilia y la producción de glucosa.

Las características más relevantes de los ritmos circadianos son:

- Son endógenos y por lo tanto persisten bajo condiciones constantes.
- Son susceptibles de ser sincronizados.
- Son capaces de compensar cambios de temperatura.

Para poder definir a un sistema circadiano necesitamos hablar de tres componentes básicos que reciben y envían información relevante para el control de funciones fisiológicas, bioquímicas y conductuales, estos componentes son:

- Una vía de entrada de luz, dirigida al oscilador circadiano auto sostenible.
- El oscilador circadiano o reloj maestro.
- Vías de respuesta (salidas del reloj) por medio de las cuales el reloj regula y manifiesta ritmos bioquímicos, fisiológicos y conductuales (Kalsbeek A. et al., 2006 b).

2.1.4. Relojes biológicos

Cómo ya se mencionó, la generación de los ritmos biológicos es endógena; en este sentido, existen sustratos o estructuras anatómicas que los generan. A las estructuras que presentan una oscilación se les denomina **marcapasos** y pueden ser sincronizados por algunas señales; un **reloj biológico** representa un

marcapasos que impone fase y periodo a otros marcapasos u osciladores, generalmente periféricos y provee al organismo de una señal temporal que sincroniza las funciones de los osciladores efectores (Dunlap J. et al, 2004).

Otra función del reloj es la medición del tiempo externo, para la expresión correcta de las funciones corporales así como la anticipación de eventos como el día y la noche (Dunlap J. et al, 2004).

2.2. EL RELOJ BIOLÓGICO EN MAMÍFEROS, EL NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO

Antes de describir el reloj biológico en los mamíferos es necesario ubicarlo espacialmente. Para esto, es importante hacer una breve descripción del hipotálamo, sustrato del control de las funciones metabólicas básicas del organismo y de los dos núcleos que se revisarán en este trabajo.

2.2.1. El hipotálamo

Las necesidades básicas de un organismo son las funciones y conductas que garantizan la supervivencia y la perpetuidad de la especie. Para satisfacer estas necesidades, un animal debe coordinar procesos fisiológicos complejos con diversas condiciones ambientales y elaborar respuestas adaptativas adecuadas a estímulos sensoriales específicos. Por esto, el mantenimiento de la homeostasis representa la clave de la adaptación biológica y depende de la correcta integración de los mecanismos endocrinos, viscerales y somatomotores (Paxinos G, 2001).

En los mamíferos, se ha demostrado que el hipotálamo regula el sistema cardiovascular, las respuestas termorreguladoras, comportamientos defensivos, así como el funcionamiento de las vísceras abdominales y la ingesta de alimento. Además, juega un papel importante para asegurar la supervivencia, por medio del control del comportamiento sexual y materno.

El hipotálamo tiene extensas conexiones ascendentes y descendentes que le permiten censar e influenciar la actividad neuronal en otras partes del cerebro y de la medula espinal (Paxinos G, 2001).

Según Paxinos el hipotálamo se divide en cuatro regiones generales, denominadas de anterior a posterior: preóptica, anterior, tuberal y mamilar (figura 2), también se divide en zonas que de forma lateral al tercer ventrículo (3V) son: lateral, medial y periventricular.

En la tabla 1 se resumen los núcleos que componen al hipotálamo de acuerdo a su región y zona correspondientes.

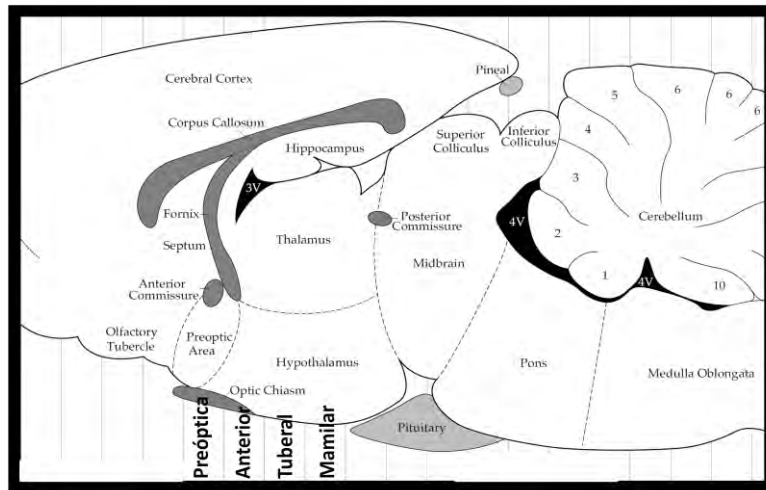


Figura 2. Localización de las diferentes áreas del hipotálamo. Se muestra la localización general de las distintas áreas del hipotálamo en un corte lateral (Paxinos G y Watson C, 2007).

En mamíferos, los ritmos diarios, tanto conductuales como fisiológicos, son generados y dirigidos por medio del reloj biológico localizado en el hipotálamo anterior. La estructura responsable de la generación de los ritmos circadianos en mamíferos es el Núcleo Supraquiasmático (NSQ), descubierto a principio de la década de los 70 del siglo pasado (Moore y Eichler, 1972; Stephan y Zucker, 1972).

Tabla 1. Áreas y núcleos del hipotálamo. La tabla muestra un corte representativo de cada área del hipotálamo por medio de esquemas de cortes coronales así como los núcleos relevantes en este trabajo resaltados en negritas (Paxinos G, 2001 y Paxinos G, 2007).

Zonas/Áreas	Preóptica	Anterior	Tuberal	Mamilar
-------------	-----------	----------	---------	---------

Periventricular	Núcleo preóptico periventricular Órgano vascular de la lámina terminalis Núcleo preóptico mediano Núcleo anteroventral periventricular Núcleo Supraquiasmático preóptico	Núcleo periventricular anterior Núcleo Supraquiasmático Núcleo Paraventricular	Núcleo periventricular tuberal Núcleo Arqueado	Núcleo periventricular posterior Núcleo tuberomamilar dorsal
Medial	Área preóptica medial Núcleo preóptico medial Núcleo preóptico anterodorsal Núcleo preóptico anteroventral Núcleo paraestriatal Núcleo preóptico posterodorsal	Área hipotalámica anterior Núcleo hipotalámico anterior Área retroquiasmática Núcleo circularis	Área tuberal Núcleo ventromedial Núcleo dorsomedial	Núcleo premamilar dorsal Núcleo premamilar ventral Complejo mamilar
Lateral	Área preóptica lateral Núcleo preóptico Magnocelular	Área hipotalámica lateral Núcleo supraóptico	Área hipotalámica lateral Núcleo tuberal	Área hipotalámica lateral Núcleo Magnocelular del área hipotalámica lateral Núcleo tuberomamilar ventral

2.2.2. El Núcleo Supraquiasmático

El NSQ consta de un par de pequeños núcleos situados de manera dorsal al quiasma óptico. La dimensión de cada núcleo es de 300µm (mediolateralmente), 300µm (dorsoventralmente) y 700µm (rostrocaudalmente) en la rata (Paxinos, 2001). El NSQ en ratas consiste de pequeñas neuronas, neurópilos y elementos gliales, particularmente astrocitos (Van den Pol, 1980, 1985). Se ha calculado que hay alrededor de 10,000 a 12,000 neuronas, de 7 a 10µm en diámetro, distribuidas

en el NSQ (Ibata Y, et al., 1999) Dichas neuronas pueden ser ovaladas o redondas y se distribuyen de manera ventrolateral; en la superficie de estas neuronas podemos encontrar sinapsis axosomáticas, aunque procesos gliales también cubren algunas porciones de las membranas citoplasmáticas neuronales (Ibata Y, et al., 1999).

2.2.3. Recepción de señales fóticas

En humanos y otros mamíferos, la información luminosa se procesa de manera inicial por la retina y es transmitida posteriormente al cerebro mediante el Tracto Retinohipotalámico (TRH) mostrado en la figura 3. Proyecciones monosinápticas del TRH terminan de manera pareada y bilateralmente en el NSQ del hipotálamo anterior.

El TRH está formado un subconjunto de células ganglionares retinales que contienen melanopsina (Opn4) y que son directamente estimuladas por la luz, las llamadas células W (Fu et al., 2005) que proyectan sus axones al hipotálamo sin formar parte de la vía visual.

Estas células ganglionares parecen expresar y utilizar el Péptido Activador de la Adenilato Ciclasa en la Pituitaria (PACAP) y glutamato, como co-transmisores, para comunicar información fótica al NSQ (Fahrenkrug, 2006: Hannibal, 2006 y Hannibal et al., 2000).

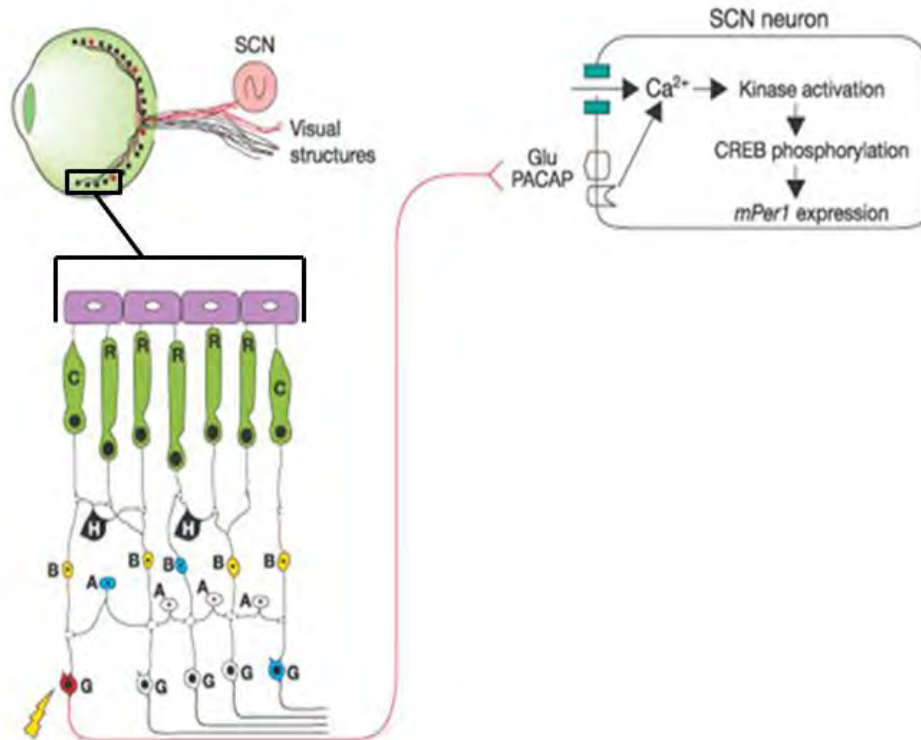


Figura 3. Representación esquemática del Tracto Retinohipotalámico (RHT). a) Población pequeña de neuronas ganglionares positivas a Melanopsina, células W, ampliamente dispersas (rojo) del RHT proyectan al Núcleo Supraquiasmático (SCN). Estas células ganglionares (G) responden directamente a las señales fóticas. También responden a señales provenientes de los conos (C) y bastones (R) de la retina a través de células amácrinas (A) y bipolares (B), algunas de ellas pueden contener criptocromos (azul). Los efectos a nivel genético en el NSQ son mediados por señales Glutamatérgicas (Glu) y del Péptido Activador de la Adenilato Ciclasa en la Pituitaria (PACAP) (Imagen modificada de Steven M., et al., 2002).

2.2.4. Poblaciones neuronales del Núcleo Supraquiasmático

Muchas de las neuronas del NSQ son neuronas GABAérgicas, sin embargo también se ha demostrado por medio de técnicas electrofisiológicas que el NSQ también actúa por medio de neuronas Glutamatérgicas (Hermes M, et al, 1996, Cui L, et al, 2001, Perreau-Lenz S, 2004).

Otras neuronas que sintetizan diversos tipos de péptidos se encuentran distribuidas a lo largo de todo el núcleo (Van den Pol AN, 1985). Mediante estudios realizados con microscopía electrónica, microscopía de luz y con anticuerpos específicos, se ha observado que existen neuronas dentro del NSQ que expresan péptidos tales como; Péptido Vasointestinal (VIP por sus siglas en

inglés) y Vasopresina (VP). Ambas poblaciones neuronales son las más abundantes dentro de este núcleo, sin embargo, su localización es distinta. Las neuronas VIP se encuentran distribuidas en la porción ventrolateral, mientras que las neuronas VP se localizan en la parte dorsomedial. También podemos encontrar neuronas productoras de Somatostatina (SOM) que se distribuyen en las porciones intermedia y dorsomedial del núcleo (Yasuhiko I. et al., 1999), la localización de estas tres poblaciones neuronales se encuentra esquematizada en la figura 4.

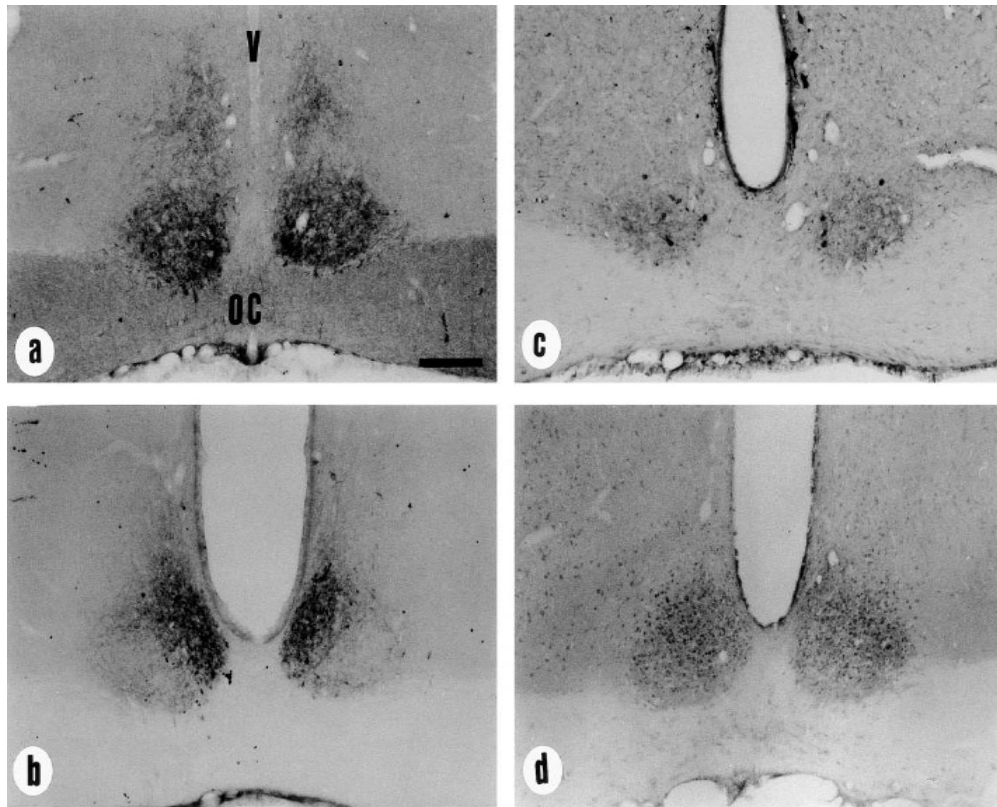


Figura 4. Neuronas inmunorreactivas a VIP, AVP, SOM, y GABA dentro del NSQ. (a) neuronas VIP distribuidas en la porción ventrolateral del núcleo. Procesos inmunorreactivos también son encontrados en dirección dorsal. (b) neuronas AVP localizadas en la porción dorsomedial. (c) neuronas SOM distribuidas de manera dispersa en la porción intermedia. (d) neuronas GABAérgicas a través de todo el NSQ. OC, quiasma óptico; V, tercer ventrículo. Escala, 200 μ m. (Tomada de Ibata Y, et al., 1999).

2.2.5. El NSQ como reloj maestro

Evidencia contundente de que el NSQ comprende al reloj circadiano, proviene de numerosos estudios que emplean experimentos con lesiones y trasplantes de tejido embrionario en los cuáles se ha determinado el papel endógeno de la oscilación de éste, así como su importancia en la sincronización y generación de los ritmos biológicos (Kalsbeek A, et al., 2006).

La destrucción del NSQ provoca la pérdida de la ritmicidad en la liberación de hormonas, como adenocorticotropina, metabolitos como glucosa, disrupción del ciclo sueño-vigilia, pérdida del ritmo de actividad locomotora y temperatura, entre otros.

Trasplantes de NSQ de donadores mutantes en hospederos con lesión del mismo (NSQx) que presentan un perfil de actividad arrítmico, adquieren el fenotipo circadiano del donador mutante (Ralph et al., 1990; Sujino et al., 2003). Gracias a estos estudios se pensó que los ritmos circadianos se originaban a través de un conjunto de asas de retroalimentación positivas y negativas de transcripción y transducción interconectadas.

La mayoría, si no es que todas las neuronas del NSQ de rata, pueden generar un ritmo circadiano de activación independiente, esto se pone de manifiesto cuando algunas de estas neuronas son puestas en un cultivo *in vitro*, presentando fase y periodo propios. Sin embargo, las neuronas del NSQ, se encuentran fuertemente interconectadas y acopladas (Weaver D, 1998).

Por medio de la organización de los ritmos circadianos en la secreción hormonal y el control autonómico de los órganos, el NSQ prepara al cuerpo para los cambios fisiológicos asociados con el ciclo sueño-vigilia (Kalsbeek et al., 1996, 2000; Buijs y Kalsbeek 2001), por ejemplo, al final del periodo de sueño, el NSQ prepara al cuerpo para la actividad mediante la inducción de un pico de glucosa en sangre, así como de un pico en la secreción de corticoesterona en rata (la Fleur et al., 2001).

Claro está que el NSQ no ejecuta las funciones anteriormente mencionadas de manera aislada; existe una interacción muy cercana con otros centros

hipotalámicos, tales como el área preóptica medial (MPA) para la regulación de la temperatura y la reproducción (Palm et al., 2001), el Núcleo Ventromedial del Hipotálamo (VMH) para la regulación de la homeostasis metabólica y el Núcleo Paraventricular del Hipotálamo (PVN), centro encargado de la regulación del control hormonal y autonómico que contiene neuronas neuroendocrinas que controlan la secreción hormonal de la glándula pituitaria (Swanson L, 1987). La figura 5 muestra un esquema del tipo de eferencias que presenta el NSQ así como el resultado de esta señalización, es decir, la generación de un ritmo.

Es precisamente esta habilidad del NSQ para integrar, la información fótica, la de sincronizarse y sincronizar ritmos por periodos de tiempo largos, así como emitir una señal que acople otras estructuras a un ritmo dado, lo que hace al NSQ, el reloj circadiano maestro (Long et al., 2005; Nagoshi et al., 2004).

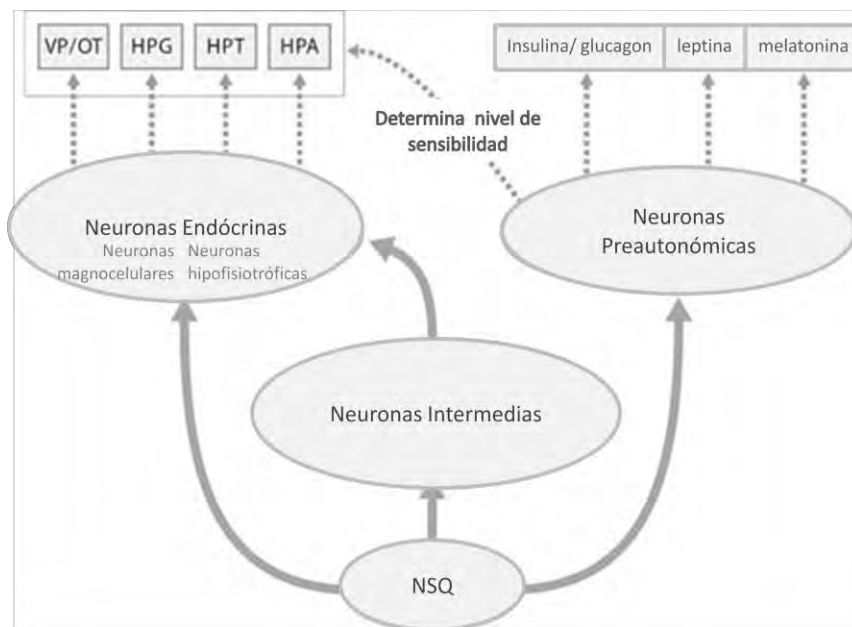


Figura 5. Eferencias del NSQ. Existen tres tipos de eferencias en el NSQ que pueden distinguirse: conexiones con neuronas endócrinas, preautonómicas e intermedias. Aunado a esta diversidad de conexiones, el NSQ utiliza distintos neurotransmisores, para llevar a cabo el control de cada función endócrina específica. Nótese como es que el NSQ utiliza sus respectivas eferencias autonómicas para preparar al tejido blanco para la actividad que habrá de realizar. VP: Vasopresina; OT: Oxitocina; HPG: eje Hipotalámico-pituitario-gonadal; HPT: eje Hipotalámico- Pituitario-Tiroideo; HPA: eje Hipotalámico-Pituitario-Adrenal (Imagen modificada de Kalsbeek A, et al, 2006 a).

2.3. METABOLISMO Y HOMEOSTÁSIS

El **metabolismo** es la suma de todas las transformaciones químicas que se producen en una célula u organismo, en función de reacciones catalizadas enzimáticamente que constituyen las rutas metabólicas. Es una actividad celular coordinada y dirigida en la que muchos sistemas multienzimáticos cooperan para cumplir cuatro funciones básicas:

- 1) Obtener energía química a partir de la captura de la energía solar o a partir de la obtención de nutrientes ricos en energía provenientes del ambiente.
- 2) Convertir moléculas nutrientes en moléculas características de la propia célula.
- 3) Polimerizar precursores monoméricos a proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, polisacáridos y otros componentes celulares.
- 4) Sintetizar y degradar biomoléculas requeridas en funciones celulares

Cada uno de los pasos de las rutas metabólicas realizan un cambio químico específico, en una secuencia de pasos, donde un precursor se convierte en producto a través de una serie de intermediarios metabólicos, metabolitos (Randall D, et al., 2002). El metabolismo se puede dividir, de manera general, en dos fases:

- **Catabolismo:** es la fase degradadora del metabolismo en la que moléculas orgánicas (glúcidos, grasas y proteínas) se convierten en productos más pequeños y sencillos. Las rutas catabólicas producen energía libre, parte de la cual se conserva en forma de ATP (Adenosil Trifosfato).
- **Anabolismo:** también llamado biosíntesis, donde precursores pequeños y sencillos se integran en moléculas mucho mayores y complejas, entre las que podemos encontrar a los lípidos, polisacáridos proteínas y ácidos nucleicos. Las reacciones anabólicas requieren de energía libre, generalmente obtenida de la hidrólisis del ATP y del poder reductor de las moléculas de NADH y NADPH (Lehninger A, 1995).

Ahora bien, considerando al metabolismo dentro de un contexto integrado, es decir, dentro del organismo completo, vemos que una característica de los organismos multicelulares es la diferenciación celular y la distribución de

funciones. Además de las rutas centrales del metabolismo, que proporcionan energía y que tienen lugar en células, tejidos y órganos, hay funciones especializadas que tienen requerimientos energéticos y patrones metabólicos característicos. Las señales hormonales integran y coordinan las actividades metabólicas de los distintos tejidos, de manera que regulan la distribución de precursores y sustratos energéticos de cada órgano (Lehninger A, 1995).

De esta manera, el hígado es el órgano que se encarga de la síntesis de carbohidratos y lípidos, el músculo esquelético está especializado en producir ATP para la contracción, el músculo cardíaco obtiene ATP a partir de la fosforilación oxidativa y el cerebro utiliza sólo glucosa y β -hidroxibutirato como fuentes de energía (Lehninger A, 1995).

Sin embargo, no podemos considerar a un organismo como un ente estático, ya que intercambia energía con su medio y está sujeto a los cambios ambientales que se presenten, por lo que los niveles de actividad de un sistema no pueden mantenerse constantes, pero ¿Cómo es que se llevan a cabo los cambios necesarios dependiendo de las condiciones del medio? Por medio de ajustes en los niveles de actividad de los procesos metabólicos, es como un organismo puede mantener las condiciones del medio interno, dentro de los parámetros adecuados para su supervivencia. A esto se le llama **homeostasis**, que es la tendencia de los organismos a regular y mantener una estabilidad interna relativa (Randall D, et al. 2001).

Las perturbaciones tanto ambientales como las del medio interno, deben ser identificadas o censadas de alguna forma, esto se lleva a cabo de manera tanto periférica (en los distintos tejidos y sistemas) como de manera central (en el sistema nervioso central). De tal forma que el exceso o falta de algún metabolito, es señal para el sistema de obtenerlo, gastarlo o almacenarlo.

2.4. BALANCE ENERGÉTICO

Se han implementado innumerables técnicas para determinar cómo es que el cerebro contribuye en la fisiología del balance energético. En años recientes se ha

ampliado nuestro entendimiento acerca de cómo es que la información correspondiente al almacenamiento de energía en el cuerpo es comunicada al cerebro y subsecuentemente integrada en respuestas metabólicas y conductuales. Gran parte de este progreso se debe a la identificación de tipos neuronales específicos en el cerebro y en especial en el Núcleo Arqueado del Hipotálamo (ARC), así como en el descubrimiento de péptidos encargados de indicar el estado metabólico al cerebro, como por ejemplo, la **leptina** (Jéquier E, 2002).

Sin embargo ¿cómo es que el cerebro regula la homeostasis energética? Se sabe que lo hace en respuesta a señales tanto provenientes del tejido adiposo, como del tracto gastrointestinal y el hígado (Stanley S, et al., 2005).

Las moléculas de señalización metabólica, se encuentran divididas en dos clases principales según su **origen**: las producidas en el cerebro, conocidas como neuropéptidos, los cuales actúan dentro de los circuitos neuronales como neurotransmisores o neurohormonas y las moléculas producidas en la periferia que circulan por el torrente sanguíneo, siendo así de naturaleza **endócrina** y que señalizan el estado metabólico del animal cuando llegan al cerebro (Barsh G y Schwartz M, 2005).

A continuación se hará una revisión breve de estas moléculas indicadoras del estado metabólico así como de las moléculas efectoras que emiten una respuesta con respecto a la información obtenida de la periferia a cerca del estado energético del organismo.

2.4.1. Neuropéptidos

- **AgRP (Proteína Relacionada a Agouti)**: se produce especialmente en el Núcleo Arqueado co-localizando con el Neuropéptido Y, promueve la ingesta de alimento y la ganancia de peso por medio de su acción sobre los

receptores a melanocortinas 3 y 4, antagonizando de esta manera la acción de α -MSH. (Flier JS, 2006).

- **α -MSH (α -Hormona Estimuladora de Melanocitos):** hormona derivada del gen *POMC* (proopiomelanocortina). Esta población neuronal se encuentra presente en el ARC y el Núcleo del Tracto Solitario (NTS), promueve el gasto energético y una conducta anorexigénica, se ha observado que esta población neuronal aumenta su actividad después de la ingesta de alimento. En condiciones de ayuno se ve disminuida su expresión. (Hoggard N, et al., 2004 y Sarkar S, et al., 2002).
- **CART (Transcripto Regulado por Cocaína y Anfetamina):** esta hormona se encuentra ampliamente distribuida en el cerebro, sin embargo se co-expresa dentro de las neuronas *POMC* del ARC. Se ve relacionada con diversos procesos fisiológicos tales como la ingesta de alimento, reproducción, estrés y dolor, entre otros. Una inyección i.v. de éste neuropéptido produce hipotermia así como la disminución de la ingesta de alimento (Skibicka K, et al., 2009 y Vrang N, 2006).
- **Hipocretina 1 y 2 (Orexina A y B):** ambas tienen efectos similares y se producen en el Hipotálamo lateral. La deficiencia en estos neuropéptidos producen un fenotipo narcoléptico, y se ha demostrado que tienen un efecto orexigénico, es decir provocan un aumento en la ingesta de alimento y en el gasto energético (Wang J, et al., 2003).
- **MCH (Hormona Concentradora de Melanina):** es un neuropéptido cíclico producido en el hipotálamo lateral que no co-localiza con aquellas neuronas productoras de Orexinas, reciben proyecciones directas provenientes del ARC y su liberación promueve la ingesta de alimento (Barsh G y Schwartz M, 2005).
- **NPY (Neuropéptido Y):** esta población neuronal se encuentra presente en varios núcleos tales como el ARC, NTS, la ojuela intergeniculada (IGL),

entre otros. Las neuronas productoras de este neuropéptido se encuentran inhibidas por señales como insulina y leptina (van den Hoek A, et al., 2004). Sin embargo, señales de hambre como grelina las activa (Kohno D, 2003), inyecciones i.v. de este neuropéptido (Broberger C, et al., 1998), provoca un aumento en la ingesta de alimento. La acción biológica de NPY se encuentra mediada por seis receptores, Y1-Y6 (Beck B, 2006).

- **TRH (Hormona Liberadora de Tirotropina):** Péptido producido por neuronas especializadas del Núcleo Paraventricular del Hipotálamo (PVN) y transportada a la pituitaria, donde estimula la liberación de la Hormona Estimuladora de la Tiroides, la cual circula por el torrente sanguíneo provocando la liberación de Tiroxina en la tiroides (Barsh G y Schwartz M, 2005), se encuentra regulada negativamente por los niveles plasmáticos de TH, sin embargo durante el ayuno los niveles de este péptido decaen lo que lleva a una reducción paradójica de la transcripción de TRH en el PVN.

2.4.2 Moléculas periféricas

- **Leptina:** es producida por células del tejido adiposo y actúa en el cerebro por medio de los receptores a leptina incluyendo neuronas simpáticas involucradas en el balance energético. Actúa como un factor de saciedad (Jéquier E, 2002) y se ha demostrado que incrementa el gasto energético (Geiser F, et al., 1998).
- **CCK (Colesistoquinina):** es liberada al torrente sanguíneo a través de las células endócrinas del intestino en respuesta a la ingesta de alimento, esta hormona se une a receptores presentes en aferencias del nervio vago, llegando al cerebro vía Área Postrema (AP), ayudando de esta manera a inhibir la ingesta de alimento (Barsh G y Schwartz M, 2005). También puede funcionar en el cerebro como neurotransmisor.

- **Grelina:** sintetizada principalmente en células endócrinas presentes en las glándulas oxínticas del estómago de donde es liberada al torrente sanguíneo (Date Y, et al, 2000), también se ha encontrado grelina presente en el ARC colocalizando con NPY y AgRP (Broberger C, et al. 1998). Inyecciones tanto intraperitoneales (IP) como intracerebroventriculares (ICV) provocan hiperfagia inmediata y obesidad si es administrada crónicamente (Wren AM, et al, 2001). Interactúa directamente con neuronas NPY, las cuales presentan receptores a este péptido y se activan en su presencia (Wang L, et al, 2002, Kohno D, et al, 2003 y Wren AM, et al, 2001).
- **Insulina:** hormona liberada por el páncreas que se encuentra regulando la homeostasis de la glucosa, estimulando la captación de glucosa en las células, la síntesis de glucógeno e involucrándose en otras vías de almacenamiento de reservas energéticas en tejidos periféricos, también sirve como indicador periférico del estado metabólico y del estatus energético del cuerpo en el ARC, el cual contiene receptores a esta hormona (Barsh G y Schwartz M, 2005).

En la figura 6 se presenta un esquema general de la integración hipotalámica del metabolismo.

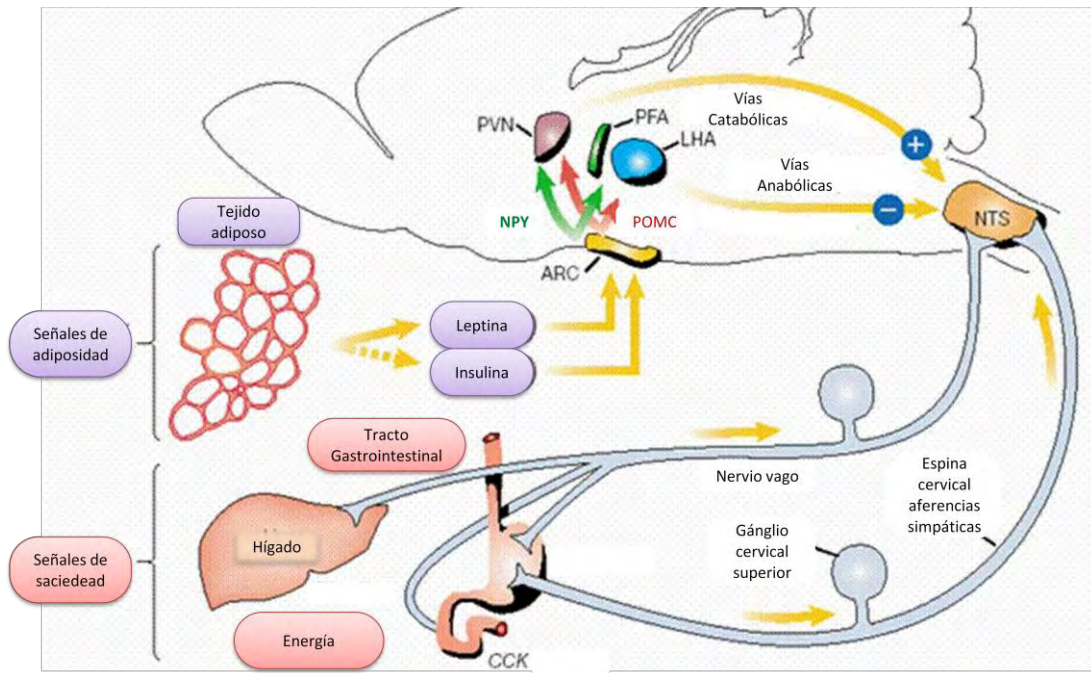


Figura 6. Integración central de señales metabólicas de la periferia. Representación gráfica del tipo de señales metabólicas periféricas así como sus vías de integración central, donde NTS, Núcleo del Tracto Solitario; ARC, Núcleo Arqueado; LHA, Hipotálamo lateral; PFA, Área Perifornical; PVN, Núcleo Paraventricular del Hipotálamo; NPY, Neuropeptido Y; POMC, Proopiomelanocortina y CCK, Colecistoquinina.

2.5. NÚCLEO ARQUEADO (ARC)

Este núcleo se encuentra en el hipotálamo mediobasal, adyacente a la eminencia media (EM), considerada un “órgano circumventricular”, es decir, junto al tercer ventrículo (Cone RD. 2001), se ha observado que muchas moléculas al ser inyectadas en la circulación, se acumulan tanto en la EM así como en el ARC y se ha sugerido, de esta manera, que la Barrera Hematoencefálica (BH) en este sitio es más permeable. Estudios recientes sugieren que este supuesto aumento en la permeabilidad de la BH, se encuentra regulado de manera altamente selectiva y específica por las células presentes en la EM, que permiten el paso de metabolitos implicados en la señalización del estado energético, sin embargo, las concentraciones en las que estos metabolitos se presentan en la circulación

sanguínea, deben ser específicas para que sean capaces de ingresar (Cheunsuang O, 2005).

El ARC actúa como un sensor del estado energético del cuerpo e inicia la señalización para emitir respuestas designadas a mantener las reservas de energía dentro de los niveles óptimos para el organismo (Cone RD, et al., 2001). A pesar de que muchas regiones del cerebro se encuentran involucradas en el control de la homeostasis energética, los circuitos que comienzan en el ARC son de los mejor entendidos a nivel molecular (Barsh G y Schwartz M, 2005).

Esta propiedad, de captar metabolitos directamente de la circulación portal y del tercer ventrículo permite que el ARC actúe como un sensor que integra y responde a diversas señales que indican el estado metabólico del cuerpo (Cone RD, et al., 2001 y Cone RD, et al., 2005).

Un modelo esquemático de cómo es que las distintas señales metabólicas llegan al cerebro e interactúan dentro del ARC, se muestra en la figura 7, donde se observan las poblaciones neuronales más estudiadas y mejor entendidas del ARC que intervienen en el balance energético, también se muestra su interacción con otros centros hipotalámicos, para la emisión de una respuesta con respecto al estado metabólico en el que se encuentra el organismo.

Como podemos observar, las respuestas de las poblaciones neuronales que se encuentran dentro del ARC, se han atribuido, principalmente, al estado metabólico de un individuo. Se ha observado que dichas poblaciones responden de distinta manera a diferentes situaciones metabólicas, como por ejemplo en el ayuno se observa una activación de neuronas NPY y en el caso de la saciedad se observa un incremento en la activación de neuronas α -MSH (Singru PS, 2006).

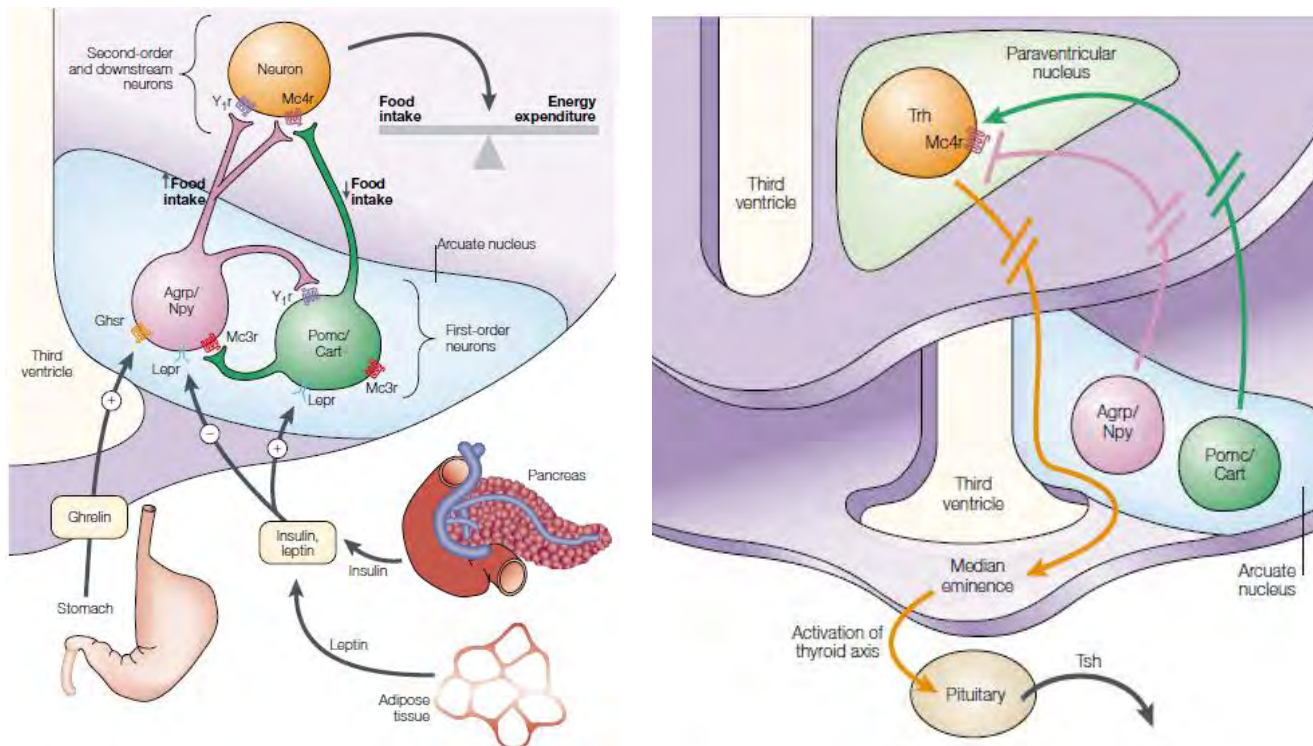


Figura 7. Interacciones periféricas e hipotalámicas para el control del balance energético.

En la primera figura (izquierda) se muestra cómo es que las señales periféricas de hambre y saciedad interactúan dentro del ARC, para el control del balance energético. En la figura de la izquierda se muestra cómo es que las poblaciones neuronales del ARC emiten respuestas proyectando a otros centros hipotalámicos tales como el PVN, los cuales sirven de efectores y que desencadenan la respuesta al estado metabólico del individuo (Imagen tomada de Barsh G y Schwartz M, 2005)

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las neuronas del ARC presentan una gran variedad de receptores a diversos metabolitos tales como leptina, grelina, insulina y no es claro cómo, pero también son capaces de censar los niveles de glucosa y glucocorticoides (Barsh G y Schwartz M, 2005). Estos metabolitos presentan un ritmo de secreción circadiano. Existe evidencia de que el NSQ y el ARC presentan conexiones recíprocas (Yi CX, et al., 2006), sugiriendo que estos núcleos podrían estar interactuando entre sí, modificando ya sea su sensibilidad o su nivel de respuesta a ciertas condiciones. Ya que el NSQ es el encargado de promover los ritmos metabólicos como el de glucosa, corticosterona en rata o cortisol en el caso de humanos, es posible que también pueda estar modificando la activación diaria de las neuronas del ARC.

4. OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es investigar si el Núcleo Arqueado (ARC) presenta un patrón de activación circadiana que indique la influencia del Núcleo Supraquiasmático. Para esto, se decidió determinar el patrón de expresión diaria en las neuronas α -MSH del arqueado (neuronas de acción anorexigénica que responden a la ingesta de alimento), en ratas bajo condiciones *ad libitum* y de ayuno.

5. HIPÓTESIS

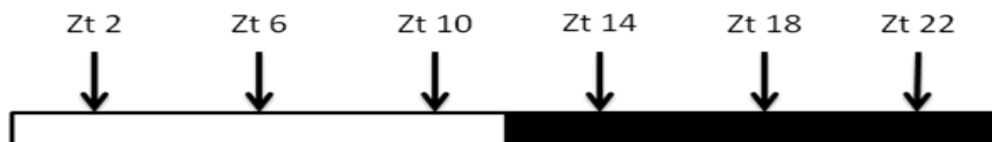
Si el NSQ tiene una acción directa sobre núcleos metabólicos tales como el ARC, **la expresión diaria de un tipo neuronal, tal como α -MSH, será similar tanto en animales alimentados *ad libitum* como en animales ayunados.**

6. MATERIAL Y MÉTODO

6.1. Animales

Se utilizaron 48 ratas macho de la cepa Wistar de 250-300g, obtenidas del Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Se mantuvieron bajo condiciones luz-oscuridad (LD) 12:12 y se dividieron en dos grupos, alimentados *ad libitum* y ayunados 48 horas antes del experimento.

Fueron sacrificados a lo largo de seis puntos temporales del ciclo luz oscuridad, de la siguiente manera:



En cada hora se sacrificaron cuatro animales en condiciones *ad libitum* y cuatro animales con 48h previas de ayuno.

El sacrificio se llevó a cabo por medio de una sobredosis de pentobarbital sódico, seguida de una perfusión intracardiaca a través del ventrículo izquierdo del corazón hacia la aorta con aproximadamente 150 ml de solución salina isotónica al 0.9% seguida de 150ml de solución de Paraformaldehido al 4% en buffer fosfatos (0.1 M, con un pH de 7.2).

Los cerebros se extrajeron manualmente y se post-fijaron en Paraformaldehido al 4% durante 24 horas a 4°C, posteriormente, se almacenaron en sacarosa al 30% por aproximadamente 48 horas a 4°C para su crioprotección. Se realizaron

secciones coronales de cada cerebro, a lo largo del hipotálamo, en un criostato a -21°C , en cortes con un grosor de $30\ \mu\text{m}$. Los cortes se colectaron y almacenaron en suspensión, en una solución de PBS pH 7.6 a 4°C .

6.2. Inmunohistoquímica

Los cortes seleccionados de cerebro correspondientes al NSQ y ARC se incubaron en amortiguador (Tris base 0.05M con NaCl 0.9% (TBS), 0.25% de gelatina y 0.5% de Triton X-100 pH de 7.6) (Supermix) con un anticuerpo primario anti c-Fos realizado en conejo a una dilución de 1:4000, así como con el anticuerpo primario anti α -MSH realizado en oveja (Millipore) a una dilución 1:10000. Se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente con agitación lenta y toda la noche a 4°C con agitación lenta.

Después se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno con buffer de fosfatos 0.1M, y NaCl 0.09% pH 7.6 (PBS). Al terminar se incubó el tejido en Supermix con un anticuerpo secundario biotinilado anti conejo, a una dilución de 1:400, durante una hora a temperatura ambiente con agitación lenta. Se lavaron nuevamente con PBS y se incubaron con el complejo ABC (Vector) a una dilución de 1:500 en Supermix por una hora más a temperatura ambiente con agitación lenta, por último se lavaron nuevamente con PBS y se desarrolló el color con 3-3 diaminobenzidina (Sigma) (DAB) (0.5 mg/ml, en TBS pH 7.2), peróxido de hidrógeno al 30% (15 μl ,) y sulfato de amonio y Níquel al 10% (500 μl por cada 50 ml de solución de DAB). Se detuvo la reacción por medio de dos lavados con PBS y se observó al microscopio, buscando la marca característica de c-Fos.

Se realizó el mismo procedimiento para el anticuerpo secundario anti oveja, buscando la presencia de α -MSH. Solo que en el desarrollo de color no se adicionó el sulfato de amonio y Níquel a fin de obtener una coloración café para las neuronas de α -MSH.

6.3 Cuantificación

Para determinar si existe un patrón circadiano en la expresión de c-Fos en el ARC, en especial en las neuronas α -MSH, se procedió a cuantificar la cantidad total de células que contienen c-Fos, por medio del software Image J y la cantidad total de co-localización entre c-Fos y α -MSH se obtuvo por medio de un conteo manual.

Se tomaron 3 secciones coronales por cerebro, de la región del ARC, tomando una sección rostral, una media y una caudal.

Esto se realizó para cada punto temporal y para cada condición metabólica (ayunados y *ad libitum*).

Para cuantificar la co-localización entre c-Fos y α -MSH, se tomaron en cuenta células marcadas con ambos péptidos que se encuentran al mismo nivel, es decir que ambas marcas estuvieran en el mismo punto focal, dado que no fue posible utilizar inmunofluorescencia.

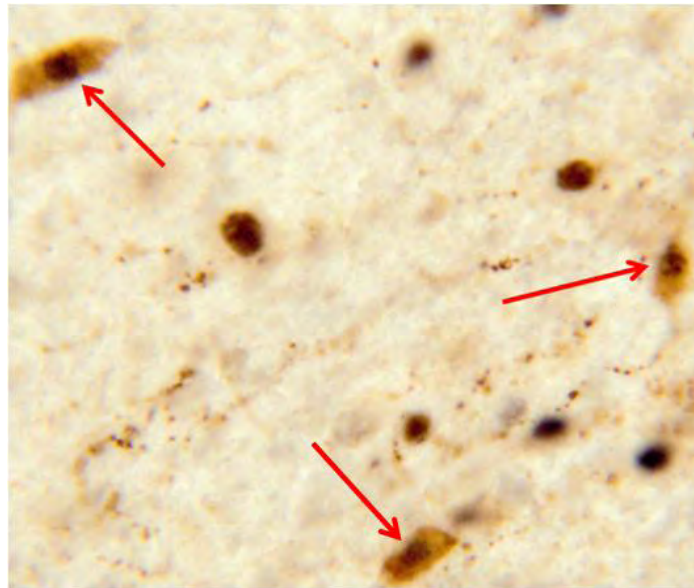


Figura 8. Ejemplo de co-localizaciones. Las flechas indican el tipo de marca que se tomará en cuenta para determinar una co-localización en este trabajo.

6.4. Análisis estadístico

Para determinar si existe una variación diaria en la expresión de c-Fos, y su co-localización con α -MSH se realizaron comparaciones de las medias de los datos

de cada punto temporal usando Análisis de Varianza de una vía para cada una de las condiciones: alimentación *ad libitum* o ayuno. El análisis post Hoc fue realizado con la prueba de Tukey, El nivel de significancia se estableció en $P<0.05$.

En cada tiempo se comparó el número de células positivas en los animales ayunados contra el valor correspondiente de los animales con alimentación *ad libitum* usando una prueba de T. El nivel de significancia se estableció en $P<0.05$.

7. RESULTADOS

7.1. LAS NEURONAS DEL ARC PRESENTAN UN RITMO DE ACTIVACIÓN BAJO CONDICIONES AD LIBITUM.

Para determinar si el ARC presenta un ritmo de activación diaria, se sacrificó un grupo de animales bajo condiciones *ad libitum* a distintas horas del día y se determinó la cantidad de c-Fos total en este núcleo (Figura 9).

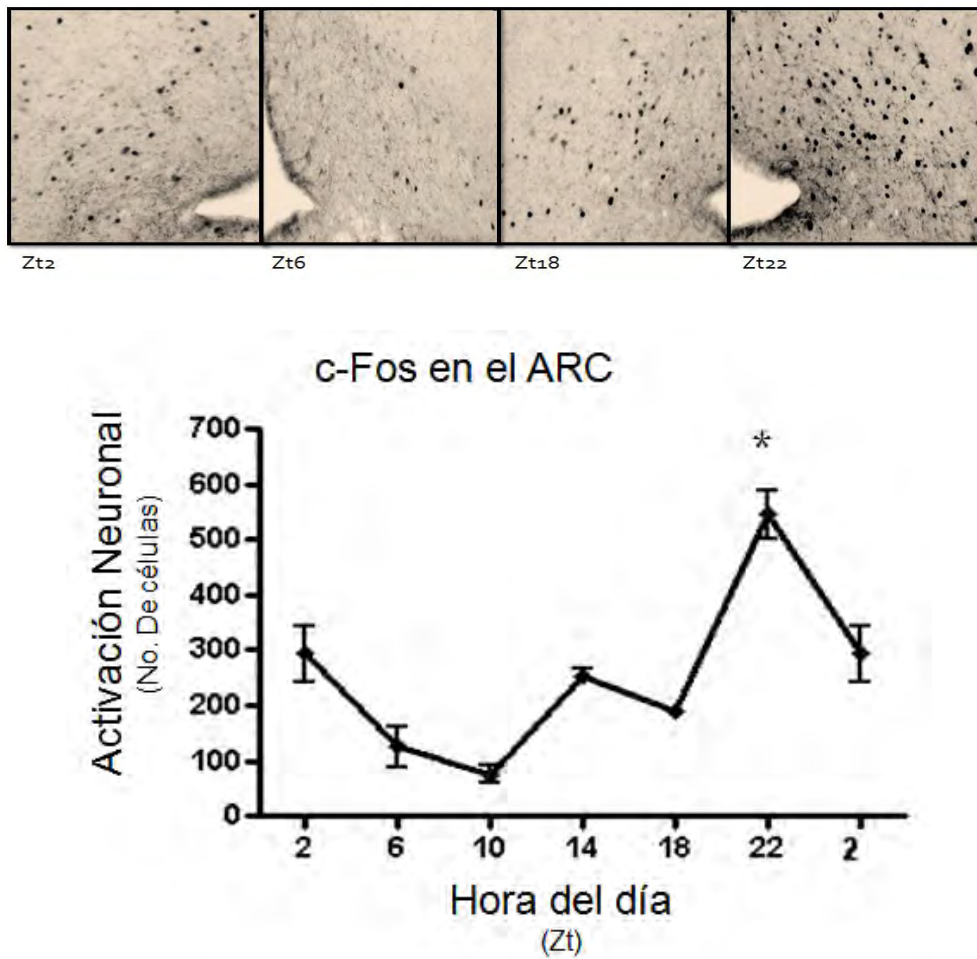


Figura 9. Activación neuronal en el Arqueado en animales alimentados *ad libitum*. En la parte superior de la figura, se muestra una sección significativa de la activación en el ARC. La gráfica inferior, muestra el promedio de la cantidad total de c-Fos en el ARC a distintas horas del día, expresado como el número de células positivas para c-Fos. Se realizaron comparaciones de las medias de los datos de cada punto temporal usando Análisis de Varianza de una vía. El análisis post Hoc fue realizado con la prueba de Tukey, El nivel de significancia se estableció en $P < 0.05$.

El ARC presenta una oscilación diaria en la expresión de c-Fos, con una acrofase en Zt 22, hora que corresponde al final de la fase oscura del ciclo y un nadir en Zt 10.

Se cuantificó solamente la cantidad de neuronas α -MSH activadas en cada uno de los puntos temporales muestreados (Figura 10), es decir, cuántas de estas neuronas presentan c-Fos en su interior, co-localizaciones entre α -MSH y c-Fos. Como muestra la figura 10, Zt 22 es el momento del ciclo en el que se presenta la mayor activación de estas neuronas.

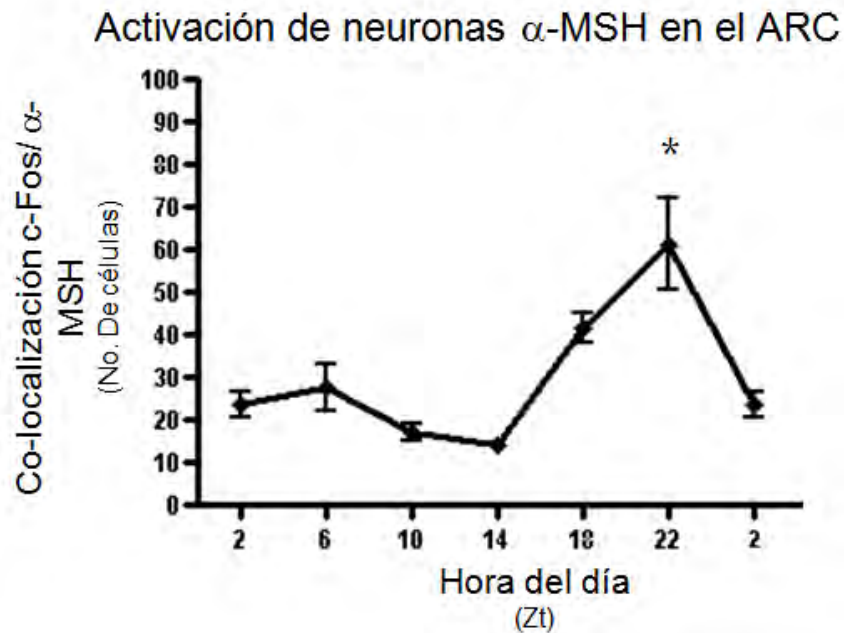
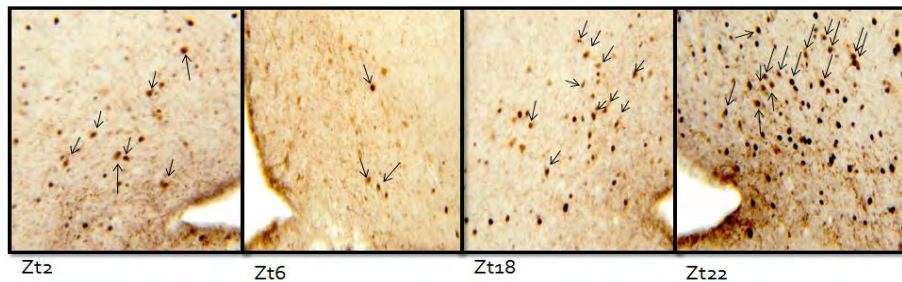


Figura10. Activación de neuronas α -MSH en el Arqueado a distintas horas del día bajo condiciones ad libitum. En la parte superior de la figura, se muestra una sección significativa de la activación de las neuronas α -MSH del ARC. La gráfica inferior, muestra el promedio de la cantidad total de co-localización entre c-Fos y α -MSH en el ARC a distintas horas del día, expresado como el número de células positivas para ambos. Se realizaron comparaciones de las medias de los datos de cada punto temporal usando Análisis de Varianza de una vía. El análisis post Hoc fue realizado con la prueba de Tukey, El nivel de significancia se estableció en $P < 0.05$.

Esto coincide con el hecho de que la rata, es un animal de hábitos nocturnos y por lo tanto, su fase de alimentación normal se presenta durante la noche, puesto que

α -MSH es un péptido que indica saciedad produciendo un efecto anorexigénico, es decir inhibe la ingesta de alimento, es lógico esperar que al final de la noche, del periodo de actividad del animal, cuando los animales están saciados, se presente una alta activación de esta población neuronal que promueve señales de saciedad.

7.2. LAS NEURONAS DEL ARC PRESENTAN UN RITMO DE ACTIVACIÓN AÚN BAJO CONDICIONES DE AYUNO

La aproximación anterior no demuestra que el NSQ sea el responsable del ritmo de activación observado en el ARC y en las neuronas α -MSH del mismo, por lo tanto, ya que las poblaciones neuronales del ARC responden a señales metabólicas resultado de la ingesta de alimento y el estado energético del organismo, se eliminó la señal “alimento” ya que si el NSQ, o señales circadianas son las responsables de dirigir los cambios diarios observados en el ARC bajo condiciones *ad libitum*, entonces la falta de alimento no deberá ser un factor que modifique dicha expresión. Para comprobar esta hipótesis, se ayunó a otro grupo de animales por un período de 48h **previas** al sacrificio, realizado durante los mismos puntos temporales ya mencionados y se cuantificó la cantidad total de c-Fos en el ARC así como su co-localización con α -MSH.

En el caso de la activación total del ARC (Figura 11), se encontró que el patrón diario de expresión de c-Fos no se encuentra modificado a causa del ayuno a excepción de tres puntos temporales mostrados en la figura 11 con un asterisco.

A pesar de que los animales fueron ayunados, el ARC sigue presentando un perfil de actividad en la expresión de c-Fos, similar al que presenta cuando los animales se encuentran bajo condiciones de alimentación *ad libitum*. Podemos observar que en tres puntos temporales se muestra una diferencia significativa entre los animales *ad libitum* y ayunados (Zt2, 14 y 22), la expresión total de c-Fos en el ARC se ve disminuida en estos puntos durante las condiciones de ayuno.

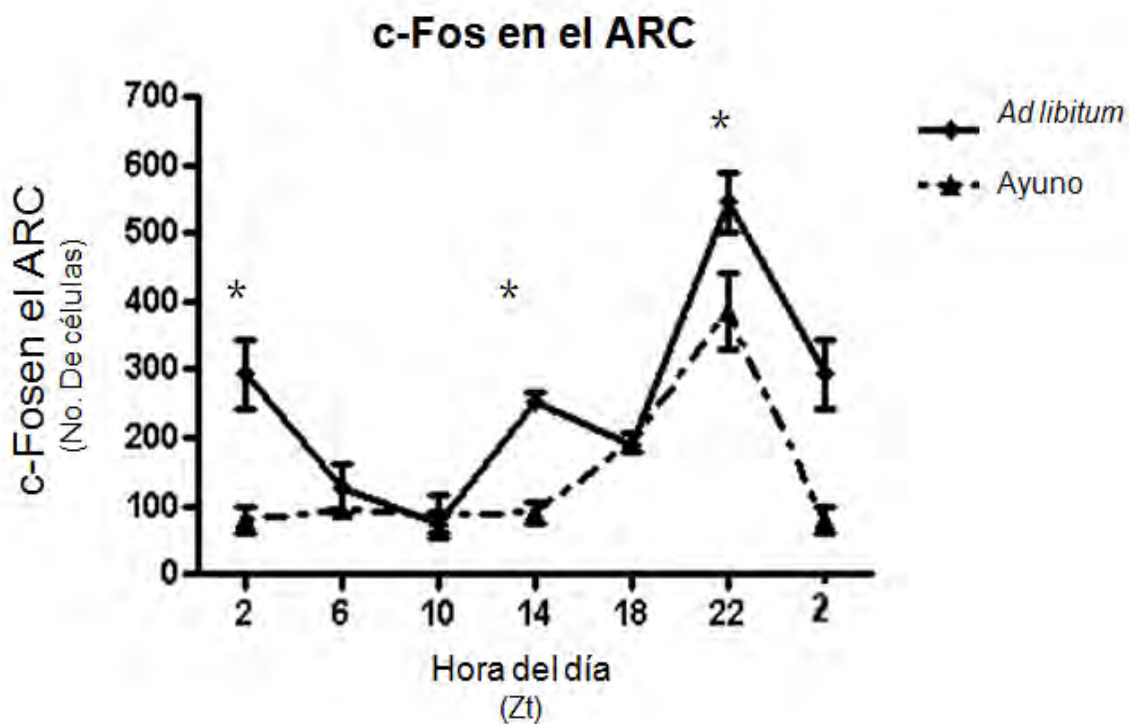
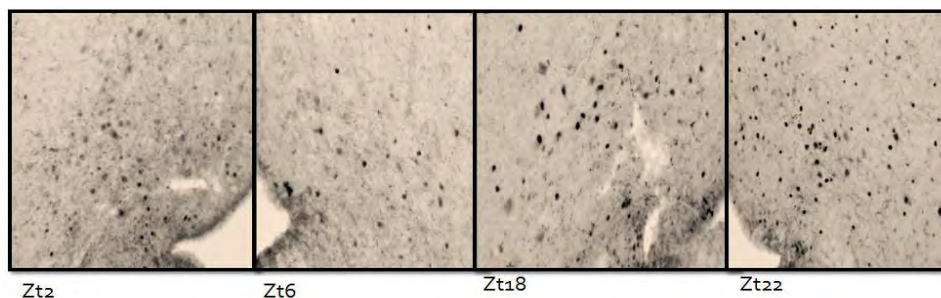
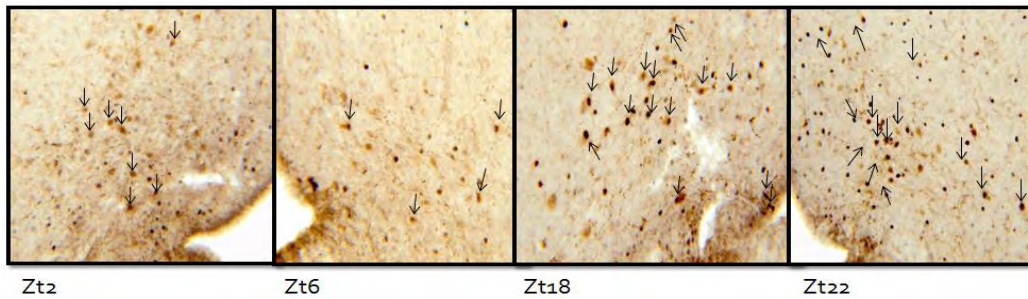


Figura 11. Comparación del ritmo de activación neuronal del Núcleo Arqueado bajo condiciones *ad libitum* y bajo condiciones de ayuno. En la parte superior de la figura, se muestra una sección significativa de la activación en el ARC en animales ayunados. La gráfica inferior, muestra el promedio de la cantidad total de c-Fos en el ARC a distintas horas del día, expresado como el número de células positivas para c-Fos tanto en animales alimentados *ad libitum* como en animales ayunados. Se realizaron comparaciones de las medias de los datos de cada punto temporal usando una serie de pruebas de T para muestras no pareadas. El nivel de significancia se estableció en $P < 0.05$, diferencias encontradas entre las horas de las dos condiciones, se encuentran marcadas con un asterisco.

De la misma manera se evaluó la cantidad de co-localizaciones entre c-Fos y α -MSH para determinar si existe alguna diferencia en la activación diaria de estas neuronas bajo condiciones de ayuno (Figura 12), a pesar del ayuno la activación de estas neuronas de actividad anorexigénica persiste.



Activación de neuronas α -MSH en el ARC

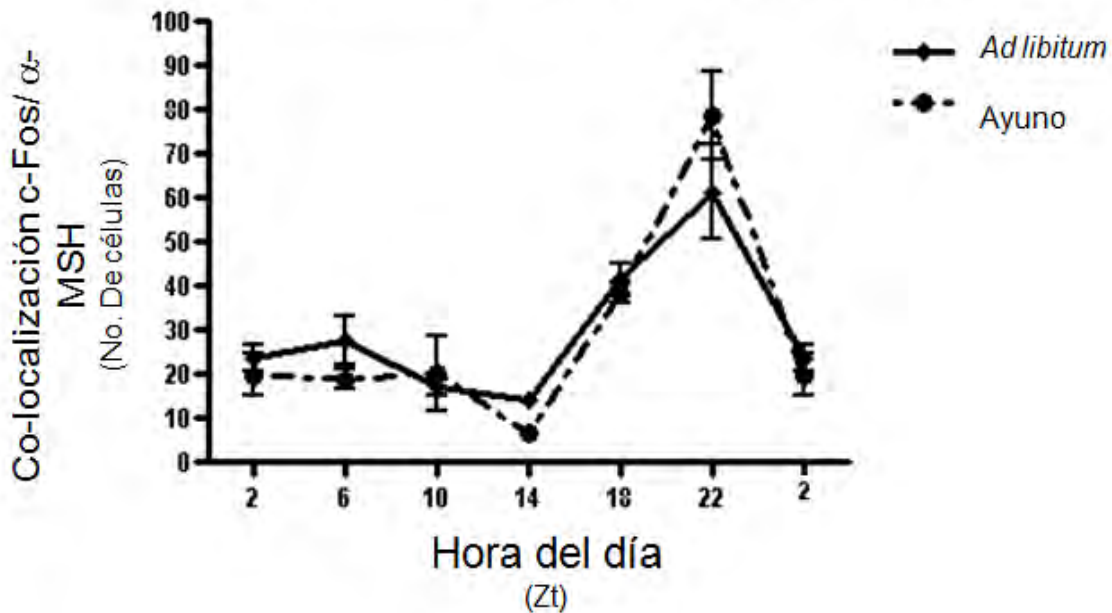


Figura 12. Comparación del ritmo de activación de las neuronas α -MSH del Núcleo Arqueado bajo condiciones *ad libitum* y bajo condiciones de ayuno. En la parte superior de la figura, se muestra una sección significativa de la co-localización de c-Fos y α -MSH en el ARC en animales ayunados. La gráfica inferior, muestra el promedio de la cantidad de co-localizaciones en el ARC a distintas horas del día, expresado como el número de células positivas para c-Fos y α -MSH tanto en animales alimentados *ad libitum* como en animales ayunados. Se realizaron comparaciones de las medias de los datos de cada punto temporal usando una serie de pruebas de T para muestras no pareadas. El nivel de significancia se estableció en $P < 0.05$, diferencias encontradas entre las horas de las dos condiciones, se encuentran marcadas con un asterisco.

La co-localización entre c-Fos y α -MSH no mostró ninguna diferencia significativa entre animales *ad libitum* y ayunados, es decir la expresión diaria de estas neuronas no se ve afectada por el ayuno.

8. DISCUSIÓN

Nuestros resultados demuestran que los animales que se encuentran bajo condiciones de alimentación *ad libitum* presentan un ritmo diario en la activación en el ARC, con una acrofase en Zt 22, tanto en la activación total del ARC, como en la activación de las neuronas α -MSH, por lo que se podría pensar que está dada en respuesta a la ingesta de alimento nocturna, con respecto a la función del péptido α -MSH, esto coincide con una señal de saciedad al final del período de alimentación del organismo.

Estos resultados no demuestran que la actividad observada en el ARC, esté siendo dirigida por el NSQ, dado que el patrón de expresión de estas neuronas podría estar siendo determinado por el cambio normal de los niveles metabólicos y sobre todo la conducta alimenticia que afecta al ARC. De esta manera, se determinó si este patrón de actividad era, de alguna manera distinta o similar al observado bajo condiciones *ad libitum*, si se retiraba la señal ingesta de alimento. Bajo condiciones de ayuno, 48h previas al sacrificio, este patrón de actividad en la activación total del ARC y en la actividad específica de las neuronas α -MSH, persiste.

Trabajos previos, han caracterizando el ritmo de secreción diaria de la proteína α -MSH, en la glándula Pineal (O'donohue T, et al. 1980), este coincide con el demostrado en esta tesis, con la excepción de que dicho trabajo no demuestra la influencia del NSQ en la secreción de α -MSH en la Pineal, y es independiente del ARC.

Una comparación estadística entre las distintas horas muestreadas en condiciones *ad libitum* y condiciones de ayuno, muestra que en cuanto a la actividad total del ARC existen tres momentos en los que este núcleo disminuye su activación total en el ayuno, Zt 2, 14 y 22, sin embargo, la activación observada en las neuronas α -MSH, no presenta diferencias significativas entre animales *ad libitum* y ayunados. Esta persistencia en el patrón de activación neuronal del ARC que

responde principalmente a señales metabólicas, específicamente la persistencia de la activación en las neuronas α -MSH, en ayuno, sugiere la influencia de señales circadianas que dirigen la activación.

A pesar de esto, podemos observar que en Zt 22, aproximadamente el 10% de las neuronas activadas del ARC en condiciones *ad libitum*, son neuronas α -MSH, mientras que en condiciones de ayuno, el porcentaje de neuronas α -MSH aumenta al 20%, estas observaciones sugieren una acción distinta de las neuronas α -MSH del ARC.

Es importante mencionar que el marcador de activación c-Fos, que se observa en el momento del sacrificio es marca de la activación de 40 a 90 min anteriores a la perfusión.

En general las neuronas α -MSH del ARC, se piensa se encuentran involucradas en la inhibición de la ingesta de alimento, así como en el gasto energético (Hoggard N, 2004 y Sarkar S, et al., 2002), el presente estudio sugiere que sus funciones podrían percibirse más allá de la visión de su acción anorexigénica a nivel central, puesto que su activación persiste aún bajo condiciones de ayuno. Observándose un máximo de activación en estas neuronas, solamente cerca del final de la fase de actividad del organismo, tanto bajo condiciones *ad libitum* como en ayuno, la señal producida por estas neuronas en el ARC, podría estar relacionada con procesos fisiológicos de transición, de la fase de actividad a la fase de reposo. Contrario a lo que se esperaría de un neuropéptido que señala saciedad en la fase de reposo, el cual debiera presentarse por un período de tiempo más prolongado, lo cual no se observa, ya que existe una disminución en la activación de α -MSH durante Zt 2.

La persistencia de la oscilación en la actividad de estas neuronas, α -MSH, a pesar del estado de ayuno, es una evidencia de que el NSQ podría estar influenciando su actividad, aunado a esto, se sabe que existen referencias directas del NSQ al ARC y viceversa (Yi C., et al. 2006). Sin embargo, no es claro cómo se lleva a cabo dicha modulación circadiana.

Una posible explicación es, que el NSQ se encuentra inhibiendo a las neuronas α -MSH, dado que podemos observar una disminución de la activación después del

encendido de la luz en Zt 2 y los niveles permanecen bajos, hasta Zt 18, sugiriendo que la señal de α -MSH tiene la función de permitir la transición del estado de vigilia y al estado de reposo. Estas hipótesis tendrán que ser profundizadas en estudios posteriores.

α -MSH, tiene otras funciones en la periferia, tales como, la estimulación de la producción de melanina en melanocitos, supresión de la respuesta inmune (Chang S, et al., 2008 y Luger T, et al., 2003), adaptación de la pigmentación en piel con respecto a cambios de temperatura ambientales en *Xenopus leavis* (Tonosaki Y, et al. 2004) y como un péptido antipirético cuando es inyectado específicamente en el Área Septal (Roth J. 2006), por lo que no es difícil pensar, que pudiera estar involucrado en otros procesos a nivel central, distintos a la inhibición de la ingesta de alimento.

Se sabe que las neuronas POMC del ARC, precursoras de α -MSH, presentan diferentes fenotipos, GABAérgicos y Colinérgicos (ACh) (Meister B, et al., 2006 y Hentges S, et al., 2004), lo que sugiere una separación en las funciones de las poblaciones neuronales que contienen a este péptido. Sin embargo, no se ha explorado ni la posibilidad de una colocalización con GABA y ACh en la misma neurona POMC, ni la co-liberación de estos neuropéptidos, es decir la dinámica de actividad y regulación de estas neuronas, no se ha sido explorada por completo.

Es por esto, que pensamos que existen distintas funciones para las subpoblaciones de α -MSH, ya que no todas estas neuronas se activan al mismo tiempo, estas observaciones tendrán que ser estudiadas posteriormente, dado que existe la posibilidad de que las neuronas presentes en la zona rostral del ARC sean una población que responde a la señal del NSQ, y las más caudales, población que generalmente es analizada en protocolos que involucran ingesta de alimento, sean las que responden a esta señal principalmente, aunque un patrón circadiano también se encuentre presente en ellas.

9. CONCLUSIÓN

Este trabajo provee evidencia a cerca de la interacción funcional del NSQ sobre el ARC, a pesar de que existen trabajos que han descrito una oscilación en la activación y transcripción en el ARC, ninguno ha demostrado que esta expresión sea debido a una influencia circadiana y no a la generación de ritmos metabólicos periféricos que modifiquen la expresión del ARC, esta posibilidad tendrá que ser descartada con futuros experimentos que demuestren la influencia directa del NSQ sobre el ritmo de activación del ARC, de manera independiente a las oscilaciones de los niveles metabólicos en la periferia.

10. BIBLIOGRAFÍA

- **Aschoff J.** (1981). A survey in biological rhythm. En: handbook of behavioral neurobiology. Vol. 4. Biological rhythms (Ed Aschoff). Plenum Press. Nueva York: 3-11.
- **Barsh GS y Schwartz MW.** (2005). Genetic approaches to studying energy balance perception and integration. *Nature Reviews* 3: 589- 600.
- **Beck B.** (2006). Neuropeptide Y in normal eating and in genetic and dietary-induced obesity. *Philosophical Transactions of the royal Society* 361(1471):1159-85.
- **Broberger C,** Johansen J, Johansson C, Schalling M y Hökfelt T. (1998). The Neuropeptide Y/Agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate- treated mice. *Neurobiology* 95; 15043–15048.
- **Broberger C.** (2005). Brain regulation of food intake and appetite: molecules and networks. *Journal of Internal Medicine* 258; 301–327.
- **Buijs RM y Kalsbeek A.** (2001). Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nat Rev Neurosci* 2:521-526.
- **Chang S,** Jung E, Lim D, Park Y, MeeWee Y, Kim J, Kim Y, Choi M, Koo S, Cho K, Han D and Kim S. (2008). Anti-inflammatory action of alpha-melanocyte stimulating hormone (α -MSH) in anti-CD3/CD28-mediated spleen and CD4+CD25⁻ T cells and a partial participation of IL-10. *Immunology Letters* 118:44-48.
- **Cheunsuang O,** Stewart A, Morris R. (2006). Differential uptake of molecules from the circulation and CSF reveals regional and cellular specialization in CNS detection of homeostatic signals. *Cell Tissue Res.*
- **Cone RD,** Cowley MA, Butler AA, Fan W, Marks DL y Low MJ. (2001). The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *International Journal of Obesity* 25(5):S63-S67.
- **Cone RD.** (2005). Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nature Neuroscience* 8(5); 571-578.
- **Cui L,** Corredere E y Ranaud L. (2001). Glutamate and GABA mediate suprachiasmatic nucleus inputs to spinal-projecting paraventricular neurons. *American Journal of Phys Regulatory Integrative Comp Physiol* 281: R1283-R1289.
- **Date Y,** Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M. (2000). Ghrelin, a novel growth hormonereleasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* 141:4255-4261.

- **Dunlap J**, Jennifer L, De Coursey P.J. (2004). Chronobiology. Biological timekeeping. Sinauer Associates, Inc Publishers. Sunderland Massachusetts, USA. Cap 3 y 4: 67-140.
- **Fahrenkrug J**. (2006). PACAP: A multifaceted neuropeptide. *Chronobiol. Int.* 23:53-62.
- **Flier J**. (2006). AgRP in energy balance: Will the real AgRP please stand up? *Cell Metabolism* 3, 83-85.
- **Fu Y**, Liao, HW, Do, MT, Yau KW. (2005). Non-image-forming ocular photoreception in vertebrates. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15:415–422.
- **Geiser F**, Körtner G, Schmidt I. (1998). Leptin increases energy expenditure of a marsupial by inhibition of daily torpor. *J. Physiol.* 275 (*Regulatory Integrative Comp. Physiol.* (44)); R1627-R1632.
- **Gruart A**, Delgado J.M., Escobar C., Aguilar-Roblero R. (2002). Los relojes que gobiernan la vida. La ciencia para todos. Vol. 188. Fondo de Cultura Económica. México, D.F.
- **Hannibal J**, Møller M, Ottersen OP, Fahrenkrug J. (2000). PACAP and glutamate are co-stored in the retinohypothalamic tract. *J. Comp. Neurol.* 418:147–155.
- **Hannibal J**. (2006). Regulation of melanopsin expression. *Chronobiol. Int.* 23:159–166.
- **Hentges S**, Nishiyama M, Overstreet L, Stenzel-Poore M, Williams J and Low M. (2004). GABA Release from Proopiomelanocortin Neurons. *The Journal of Neuroscience.* 24(7):1578 –1583.
- **Hermes M**, Coderre E, Buijs RM and Renaud L. (1996). GABA and glutamate mediate rapid neurotransmission from Suprachiasmatic Nucleus to Hypothalamic Paraventricular Nucleus in rat. *Journal of Physiology*, 496.3, pp.749-757.
- **Hoggrad N**, Rayner DV, Johnston SL y Speakman JR. (2004). Peripherally administered [Nle⁴, D-Phe⁷]- α -Melanocyte Stimulating Hormone increases resting metabolic rate, while peripheral agouti related protein has no effect, in wild type C57BL/6 and *ob/ob* mice. *Journal of Molecular Endocrinology* 33:693-703.
- **Ibata Y**, Okamura H, Tanaka M, Tamada Y, Hayashi S, Iijima N, Matsuda T, Munekawa K, Takamatsu T, Hisa Y, Shigeyoshi Y y Amaya F. (1999). Functional Morphology of the Suprachiasmatic Nucleus. *Frontiers in Neuroendocrinology* 20:241-268.
- **Jéquier E**. (2002). Leptin Signaling, Adiposity, and Energy Balance. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 967:379-388.
- **Kalsbeek A**, Fliers E, Franke AN, Wortel J and Buijs RM. (2000). Functional connections between the suprachiasmatic nucleus and the thyroid gland as revealed by lesioning and viral tracing techniques in the rat. *Endocrinology* 141:3832–3841.
- **Kalsbeek A**, Palm IF, La Fleur SE, Scheer F, Perreau-Lenz S, Ruitter M, Kreier F, Cailotto C y Buij RM. (2006 a). SCN Outputs and the Hypothalamic Balance of Life. *J Biol Rhythms* 21; 458.

- **Kalsbeek A**, Perreau-Lenz, and Buijs RM. (2006 b). A network of (Autonomic) clock outputs. *Chronobiology International*, 23(3): 521–535.
- **Kalsbeek A**, Vanheerikhuijze JJ, Wortel J, Buijs RM. (1996). A diurnal rhythm of stimulatory input to the hypothalamo-pituitary-adrenal system as revealed by timed intrahypothalamic administration of the vasopressin V-1 antagonist. *J Neurosci* 16:5555–5565.
- **Kohno D**, Gao HZ, Muroya S, Kikuyama S, Yada T. (2003). Ghrelin Directly Interacts With Neuropeptide-Y– Containing Neurons in the Rat Arcuate Nucleus Ca²⁺ Signaling via Protein Kinase A and N-Type Channel-Dependent Mechanisms and Cross-Talk With Leptin and Orexin. *Diabetes* 52; 948–956.
- **la Fleur SE**, Kalsbeek A, Wortel J, Fekkes ML, Buijs RM. (2001). A daily rhythm in glucose tolerance: a role for the suprachiasmatic nucleus. *Diabetes* 50:1237–1243.
- **Lehninger A**, Nelson D y Cox M. (1995). *Principios de Bioquímica*. Segunda edición, Worth publishers Inc. Ediciones Omega, Barcelona. Cap. III.
- **Long MA**, Jutras MJ, Connors BW, Burwell RD. (2005). Electrical synapses coordinate activity in the suprachiasmatic nucleus. *Nat. Neurosci.* 8:61–66.
- **Lu XY**, Shieh KR, Kabbaj M, Barsh GS, Akil H y Watson SJ. (2002). Diurnal Rhythm of Agouti- Related Protein and its Relation to Corticosterone and Food Intake. *Endocrinology* 143(10):3905–3915.
- **Luger T**, Scholzen T, Brzoska T and Böhm M. (2003). New Insights into the Functions of α -MSH and Related Peptides in the Immune System. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 994; 133-140.
- **Meister B**, Gömüc B, Suarez E, Ishii Y, Dürr K and Gillberg L. (2006). Hypothalamic proopiomelanocortin (POMC) neurons have a cholinergic phenotype. *European Journal of Neuroscience.* 24:2731–2740.
- **Moore RY** y **Eichler VB**. (1972). Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res* 42:201-206.
- **Morton G** y **Schwartz M**. (2001). The NPY/AgRP neuron and energy homeostasis. *International Journal of Obesity* 25(5):S56–S62.
- **Nagoshi E**, Saini C, Bauer C, Laroche T, Naef F, Schibler U. (2004). Circadian gene expression in individual fibroblasts: cell-autonomous and self-sustained oscillators pass time to daughter cells. *Cell.* 119:693–705.
- **O'donohue T**, Miller R, Pendleton R and Jacobowitz D. (2008). Demonstration of an endogenous circadian Rhythm of α -Melanocyte Stimulating Hormone in the rat Pineal Gland. *Brain Research*, 186: 145-155.
- **Palm IF**, Van Der Beek EM, Swarts HJ, Vliet J, Wiegant VM, Buijs RM, Kalsbeek A. (2001). Control of the estradiol-induced prolactin surge by the suprachiasmatic nucleus. *Endocrinology.* 142:2296–302.

- **Paxinos G y Watson C** (2007). The rat Brain in stereotaxic coordinates, sexta edición, Academic press. Cap XXXI: placas 40, 45, 59 y 73.
- **Paxinos G.** (2001). The Rat Nervous System. Elsevier Academic Press. China. 335-362.
- **Perreau-Lenz E,** Kalsbeek A, Pévet Paul and Buijs RM. (2004). Glutamatergic clock output stimulates melatonin synthesis at night. *European Journal of Neuroscience* 19:318-324.
- **Pittendrig CS.** (1993). Temporal organization: Reflections of a Darwinian Clock- Watcher. *Annual Review of Physiology* vol. 55: 17-54.
- **Ralph MR,** Foster RG, Davis FC, Menaker M. (1990). Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* 247:975-978.
- **Randall D,** Burggren W y French K (2002) Eckert, *Animal Physiology, mechanisms and adaptations.* W.H. Freeman and Company, 5° Edición, Cap 1:8-10.
- **Roth J.** Endogenous antipyretics. (2006). *Clinica Chimica Acta* 371:13-24.
- **Sarkar S,** Légrádi G, Lechan M. (2002). Intracerebroventricular administration of α -melanocyte stimulating hormone increases phosphorylation of CREB in TRH- and CRH-producing neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Research* 945:50-59.
- **Singru PS,** Sánchez E, Fekete C, Lechan RM. (2006). Importance of Melanocortin Signaling in Refeeding-Induced Neuronal Activation and Satiety. *Endocrinology* 148(2):638-646.
- **Skibicka KP,** Alhadeff AL y Grill HJ. (2009). Hindbrain Cocaine-and Amphetamine-Regulated Transcript Induces Hypothermia Mediated by GLP-1 Receptors. *The Journal of Neuroscience* 29(21):6973-6981.
- **Stanley S,** Wynne K, Mcgowan B y Bloom S. (2005). Hormonal Regulation of Food Intake. *Physiol Rev* 85:1131-1158.
- **Stephan FK y Zucker I.** (1972) Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 69:1583-1586.
- **Reppert SM,** Weaver DR. Weaver et al. (2002) Coordination of circadian timing in mammals *Nature* 418, 935-941.
- **Sujino M,** Masumoto K, Yamaguchi S, van der Horst GTJ, Okamura, H., Inouye, S.I.T. (2003). Suprachiasmatic nucleus grafts restore circadian behavioral rhythms of genetically arrhythmic mice. *Curr. Biol.* 13:664-668.
- **Swanson LW.** (1987). The hypothalamus. In: *Integrated systems of the CNS, Part I. Hypothalamus, hippocampus, amygdala, and retina.* Amsterdam: Elsevier. p 1–124.
- **Tonosaki Y,** Cruijisen M, Nishiyama K, Yaginuma H and. Roubos E. (2004). Low temperature Stimulates α -Melanophore-Stimulating Hormone Secretion and Inhibits Background Adaptation in *Xenopus laevis*. *Journal of Neuroendocrinology*, Vol. 16, 894–905.

- **van den Hoek AM**, Voshol PJ, Karnekamp BN, Buijs RM. (2004). Intracerebroventricular Neuropeptide Y Infusion Precludes Inhibition of Glucose and VLDL Production by Insulin. *Diabetes*, 53:2529-2534.
- **Van den Pol AN** y Tsujimoto KL. (1985) Neurotransmitters of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus: Immunocytochemical analysis of 25 neuronal antigens. *Neuroscience*; 15: 1049–1086.89.
- **Van den Pol AN**. (1980). The hypothalamic suprachiasmatic nucleus of rat: Intrinsic anatomy. *J Comp Neurol*; 191; 661–702.
- **Vrang N**. (2006). Anatomy of hypothalamic CART neurons. *Peptides* 27; 1970-1980.
- **Wang J**, Osaka T y Inoue S. (2003). Orexin-A-sensitive site for energy expenditure localized in the arcuate nucleus of the hypothalamus. *Brain Research* 971:128–134.
- **Wang L**, Saint-Pierre DH y Taché Y. (2002). Peripheral ghrelin selectively increases Fos expression in neuropeptide Y– synthesizing neurons in mouse hypothalamic arcuate nucleus. *Neuroscience Letters* 325; 47–51.
- **Weaver DR**. (1998). The suprachiasmatic nucleus: A 25-year retrospective. *J. Biol. Rhythms* 13: 100–112.
- **Wren AM**, Small CJ, Abbott CR, Dhillo WS, Seal LJ, Cohen MA, Batterham RL, Taheri S, Stanley SA, Ghatei MA, Bloom SR. (2001). Ghrelin causes Hyperphagia and Obesity in Rats. *Diabetes* 50:2540-2547.
- **Yi CX**, van der Vliet J, Dai J, Yin G, Ru L, Buijs RM. (2006). Ventromedial Arcuate Nucleus Communicates Peripheral Metabolic Information to the Suprachiasmatic Nucleus. *Endocrinology* 147(1):283-294.