



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**ACTIVACIÓN NEURONAL DEL NÚCLEO DEL TRACTO
SOLITARIO POR LA INGESTA FORZADA DE LECHE EN
RATAS NEONATAS DE 9 Y 18 DÍAS DE EDAD**

TESIS QUE PARA OBTENER EL
GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS
(NEUROBIOLOGÍA)

PRESENTA

QFB. Leticia Aguilar Sánchez

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARÍA TERESA MORALES GUZMÁN

Campus Juriquilla, Querétaro. Abril del 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Instituto de Neurobiología
Campus UNAM-UAQ Juriquilla

Los miembros del Jurado de Examen de Grado certificamos que la tesis elaborada por Leticia Aguilar Sánchez, cuyo título es: “Activación neuronal del núcleo del tracto solitario por la ingesta forzada de leche en ratas neonatas de 9 y 18 días de edad” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los requisitos de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Presidente	Dr. Manuel Salas Alvarado	_____
Secretario	Dra. Ma. Teresa Morales Guzmán	_____
Vocal	Dra. Carolina Escobar Briones	_____
Suplente	Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda	_____
Suplente	Dra. Pilar Durán Hernández	_____

Aprobado por el Comité Académico

Dr. Raúl G. Paredes Guerrero
Coordinador del Programa

Esta tesis fue dirigida por la Dra. María Teresa Morales Guzmán, y se realizó en el Laboratorio de Fisiología del Instituto de Neurobiología de la UNAM. Se contó con el apoyo técnico de la Biol. María Eugenia Ramos Aguilar, Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos, el MC. Leopoldo González Santos y Leonor Casanova Rico.

Este trabajo fue apoyado por la beca de Maestría CONACYT No.185012 ; y el Proyecto PAPIIT IN223402.

AGRADECIMIENTOS

Principalmente a Dios

Por su confianza, apoyo y amor incondicional que me a brindado mi esposo Víctor.

A mis padres y hermanos por todo su apoyo y darme la oportunidad de realizar un posgrado

Por la formación que me ha dado durante 4 años y dejarme ser parte de su grupo de trabajo, también por su conocimiento que me brindo la Dra. Tere

A mis compañeras de laboratorio marú, ale y azucena que siempre me brindaron su ayuda y amistad

A los miembros del comité tutorial, por sus aportaciones durante los cuatro semestres de formación:

Dr. Manuel Salas Alvarado

Dr. Carlos M. Valverde Rodríguez

Dra. María Teresa Morales Guzmán

Por la detallada revisión de la tesis y comentarios a los miembros del jurado:

Dr. Manuel Salas Alvarado

Dra. María Teresa Morales Guzmán

Dra. Carolina Escobar

Dra. Pilar Duran Hernández

Dra. Sofía Y. Díaz Miranda

ÍNDICE GENERAL

	Pag.
AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	v
SUMMARY	vi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	5
A. Regulación de la ingesta	5
1. Señales periféricas que transmiten información metabólica al cerebro	8
a. Temperatura	
b. Nutrimientos	
2. Señales neuronales involucradas en la ingesta	12
a. Señales neurales	
b. Péptidos del tracto gastrointestinal	
c. Otras hormonas	
3. Vía neural que participa en la regulación de la ingesta	17
a. Núcleo del Tracto Solitario	
b. La ingesta y zonas cerebrales relacionadas con la distensión gástrica	
c. El hipotálamo	
B. Succión y conducta anticipatoria en crías	29
C. Neurotransmisores liberados por la vía neural	31
D. C-fos como marcador de activación neuronal en el SNC	34
E. Regulación neonatal de la ingesta en ratas	36
III. HIPÓTESIS	38
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	38

	Pag.
V. OBJETIVOS	39
a. Objetivo General	
b. Objetivos Particulares	
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	40
A. Animales	40
B. Grupos experimentales	40
C. Diagrama de flujo de la formación de los grupos experimentales	42
D. Medición cuantitativa estomacal	42
E. Procesamiento de tejidos e histología	42
F. Inmunohistoquímica	43
G. Doble inmunohistoquímica	43
H. Tinción de Nissl	43
I. Análisis	44
J. Análisis Estadístico	44
K. Ruta crítica del procesamiento	45
VII. RESULTADOS	47
A. Principales áreas del tallo cerebral activadas en respuesta a la distensión gástrica	47
B. Determinación cuantitativa de la expresión de fos en la región caudal del NTS en crías de 9 y 18 días	53
C. Peso promedio de las crías y de los estómagos de cada grupo experimental	54
D. Identificación del fenotipo de las neuronas del NTS activadas por la distensión gástrica	57
E. Porcentaje de neuronas inmunorreactivas a Fos y TH	59
F. Principales áreas del hipotálamo activadas en respuesta a la distensión gástrica	61

VIII. DISCUSION	62
IX. CONCLUSIONES	72
X. REFERENCIAS	73
XI. LISTA DE FIGURAS Y TABLAS	80

I. INTRODUCCIÓN

La ingesta de alimento es tan importante para el mantenimiento de la vida, como es el oxígeno para la respiración. Consecuentemente, no es de extrañar que los circuitos neurales que controlan esta función se ubiquen en la parte del cerebro filogenéticamente más antigua y funcionen de manera casi automática, desde el nacimiento. La región caudal del tallo cerebral de infantes humanos y de ratas contiene varios circuitos neurales necesarios para la ingesta, esto es, la masticación y deglución de alimentos benéficos, así como para rechazar materiales potencialmente peligrosos en el alimento. Esto va acompañado de respuestas autonómicas tales como la secreción de saliva y moco (Conn y Freeman, 2000).

La masticación y la deglución son procesos complejos que dependen de una variedad de estímulos sensoriales y de la cooperación de varios músculos (Ganong, 1998). La protección de las vías de respiración es de mucha importancia, por lo que se requiere que el patrón de movimiento de la quijada, lengua y músculos faciales sea rítmico y secuencial.

La red neural para la regulación de la ingesta y del balance energético comprende a los llamados centros del hambre ubicados en el tallo cerebral, en el hipotálamo y en algunas estructuras corticolímbicas. Dentro de los circuitos del tallo cerebral caudal se encuentran involucrados aquellos del aparato locomotor y oromotor que son importantes en la ingestión del alimento, así como el sistema nervioso simpático que controla los órganos involucrados en la alimentación, por lo que el tallo cerebral es importante en el control de la ingestión, digestión y absorción del alimento, así como en la utilización de metabolitos y energéticos (Berthoud y Seeley, 2000).

El tallo cerebral comprende un circuito neural básico para la ingestión del alimento y del líquido desde la cavidad oral, en el cual participa el sistema nervioso parasimpático ya que regula procesos de ingestión y digestión a través del nervio vago. También, este circuito detiene la ingestión cuando el alimento no es agradable, y funciona como un sistema de retroalimentación enviando señales de saciedad o detectando estímulos tóxicos mediados por los receptores viscerales (Mihai y Robert, 2000). Además, este circuito neural es autónomo y no requiere del cerebro anterior para estas funciones.

Como se mencionó, el hipotálamo, también participa en la regulación de la ingesta. Las señales del estado interno o balance metabólico llegan al hipotálamo mediante vías múltiples que incluyen receptores hormonales, sensores metabólicos y vías neurales aferentes. Esta información es procesada en el hipotálamo y dirigida hacia efectores endocrinos como la pituitaria para la liberación de hormonas y el sistema nervioso autonómico. El neuropéptido Y (NPY), la proteína relacionada con agouti (AgRP) y la proopiomelanocortina (POMC), son algunos de los péptidos involucrados en la regulación de la ingesta. Los dos primeros son sensibles a la leptina y envían proyecciones al núcleo paraventricular, núcleo perifornical y lateral hipotalámicos, teniendo así un papel importante en la traducción e integración de señales sensoriales metabólicas que dan lugar a respuestas autonómicas, endocrinas y conductuales (Berthoud, 2004).

En general, se sabe que la estimulación de ciertas áreas del hipotálamo provoca que un animal experimente un hambre extrema, un apetito voraz y un deseo intenso de buscar comida. El área más estrechamente asociada al hambre es el área hipotalámica lateral, ya que la lesión de ésta provoca en el animal la pérdida del deseo de comer, a veces causando una desnutrición letal. Sin embargo, existe un centro que se opone al deseo de comida, localizado en el núcleo ventromedial, llamado centro de la saciedad. El centro del hambre,¹ o hipotálamo lateral, opera mediante la generación de respuestas motoras del animal, favoreciendo la actividad y especialmente el impulso emocional para buscar alimento; mientras que el centro de la saciedad opera para dar al animal una sensación de saciedad nutricional, que inhibe de forma secundaria el control del hambre (Guyton y Hall, 1997).

También, se han implicado a otras áreas del cerebro como sensores del estado nutricional del organismo o como centros neurales que conducen a un animal a buscar e ingerir alimento. Entre estas áreas se encuentran los núcleos paraventriculares, dorsomediales y arcuato del hipotálamo, así como núcleos del tronco encefálico inferior, como el área postrema, y el núcleo medial caudal del fascículo solitario o del nervio vago, que pueden afectar el grado de ingesta de alimentos.

Si el cerebro se corta por debajo del hipotálamo pero por arriba del mesencéfalo, el animal conserva las características básicas del proceso de ingesta de alimentos, como salivar, lamer, masticar el alimento y tragarlo. Por tanto, los mecanismos reales de la ingestión del alimento están controlados por centros del tronco encefálico. Así, se ha concluido que la función de los otros centros en la ingestión de alimentos consiste en controlar la calidad del alimento ingerido y excitar estos centros de la alimentación mecánicos. Sin embargo, aún existe controversia acerca de cuáles áreas cerebrales son las más importantes para el control de la ingesta (Berthoud y Seeley, 2000), por lo que se ha sugerido que ciertas áreas del tallo cerebral junto con otras del encéfalo y el diencefalo pueden ser consideradas como una unidad de procesamiento central en dicho control.

Los centros superiores al hipotálamo también desempeñan papeles importantes en el control de la ingestión de alimentos, en particular en el control del apetito que es el deseo por un tipo específico de alimento. Estos centros incluyen especialmente a la amígdala y a la corteza prefrontal, que están estrechamente relacionados con el hipotálamo, ya que la estimulación eléctrica de algunas áreas de la amígdala desencadena el acto mecánico de ingerir alimento (Woods y Stricker, 1999).

En la rata recién nacida, la ingesta es estimulada por la deshidratación e inhibida por la distensión gástrica. La respuesta a la ingesta ha sido analizada en animales adultos, y se sabe poco acerca de la activación de neuronas del tallo cerebral durante la succión y la ingesta de leche en neonatos. Ya que en ratas adultas se ha encontrado que la ingesta de comida y la distensión gástrica activan neuronas del núcleo del tracto solitario (NTS) y el nivel de expresión de Fos es afectado por la cantidad de comida ingerida (Rinaman y col., 1999).

Por ello, la finalidad principal de esta tesis fue investigar las áreas del tallo cerebral, que se activan por la distensión gástrica y las señales químicas generadas por la ingesta forzada de alimento (leche), en neonatos. En este trabajo se analizó la respuesta del núcleo del tracto solitario (NTS), y como índice de activación neuronal usamos la detección inmunohistoquímica del producto proteínico del gen de respuesta inmediata c-fos.

El modelo experimental empleado fue la rata Wistar recién nacida de 9 y 18 días de edad (ambos sexos), las cuales, se separaron de la madre durante 6h para inducir las después a amamantar/succionar de manera activa al ser regresadas a la caja materna. Se formaron 4 grupos experimentales de crías diferentes para cada edad, las:

- a) que succionaron de manera continua a la madre,
- b) separadas de la madre por 6 horas,
- c) que después de una separación de 6 horas se regresaron a la caja materna para una succión breve (5-10 minutos, sin obtención de leche)
- d) que después de una separación de 6 horas fueron regresadas a la caja materna para una succión de 90 minutos, con lo cual se indujo una distensión gástrica.

Esta comparación nos fue útil para identificar las neuronas del tallo cerebral (NTS), que responden o se activan en estas cuatro condiciones mencionadas previamente, así como poder identificar las posibles diferencias que se observen por la edad.

RESUMEN

En la rata recién nacida, la ingesta es estimulada por la deshidratación e inhibida por la distensión gástrica. En ratas adultas se ha reportado que la ingesta induce principalmente la activación de neuronas en el núcleo del tracto solitario (NTS) y que el nivel de expresión de Fos es afectado por la cantidad de comida ingerida. En este estudio usamos la detección inmunohistoquímica de Fos para ampliar reportes previos acerca de las áreas de tallo cerebral que se activan específicamente en respuesta a la distensión gástrica. Ratas de 9 y 18 días de edad fueron removidas de la caja materna por 6 horas, después de las cuales fueron regresadas con su madre para un período de succión de 5 ó 90 min. En ambos casos, la perfusión fue realizada 90 minutos después del inicio de la succión. Los grupos controles fueron sacrificados antes o después de las 6 horas de separación y mostraron escasa expresión de Fos. En contraste, el episodio de succión de 90 min, indujo una fuerte expresión de Fos en regiones caudales del NTS y del núcleo espinal del trigémino (SPV). La región rostral del NTS y el núcleo de rafe (obscurus) mostraron una expresión moderada de Fos. Las crías que succionaron únicamente por 5 min, lo cual no causó distensión estomacal, mostraron Fos-ir principalmente en el SPV. Doble inmunotinción de Fos y tirosina hidroxilasa (TH) reveló que sólo el 1% de las neuronas catecolaminérgicas del NTS caudal respondieron a la distensión. El paradigma experimental empleado en este estudio nos permitió distinguir entre áreas del tallo cerebral que se activan por la distensión gástrica y las que se activan por la acción de succionar. A diferencia de las ratas adultas, las neuronas catecolaminérgicas del tallo cerebral parecen contribuir poco en la regulación neonatal de la ingesta. El hallazgo más importante de la presente tesis es la definición de un diseño experimental que puede ser utilizado en estudios subsecuentes. También, la determinación de que el fenotipo de las neuronas activadas por la ingesta no es de naturaleza catecolaminérgica en las ratas neonatas. Esto resulta muy relevante ya que genera una línea de estudio la cual permitirá explorar la maduración neuronal en respuesta a la ingesta de comida, y así ampliar el conocimiento fundamental de la fisiología digestiva.

SUMMARY

In the newborn rat, food ingestion is stimulated by dehydration and inhibited by gastric distension. Fos expression and directly related to the amount of food ingested in brainstems from adult animals has been found to be prominent in the nucleus of the solitary tract (NTS). In this study we used a fos-guided immunohistochemical approach to extend prior reports about brainstem areas activated specifically in response to gastric distension in neonatal rats. Rats of 9 and 18 days old were isolated from the mother for a 6h period, after which they were returned to the mother cage for a suckling period of either 5 or 90 min. In both cases, perfusion was performed 90 minutes after the beginning of suckling. Control groups were sacrificed either before or after the 6h-deprivation period; they showed little or no Fos-ir. In contrast, a 90 min-suckling episode after 6h of deprivation induced strong Fos-ir in the caudal regions of the NTS and in the spinal nucleus of the trigeminal (SPV). Moderate expression was observed in rostral NTS and in the nucleus raphe obscurus. In neonatal rats allowed to suckle for 5 min, which did not cause gastric distension, the main area activated was the SPV in both edge. Double immunostaining for Fos and tyrosine hydroxylase (TH) revealed that only around 1% of the TH-ir in the NTS was responsive (Fos+) to gastric distension. The paradigm employed in this study allowed us to distinguish brainstem areas activated by gastric distension from those activated by suckling action in rat pups. Unlike adult rats, catecholaminergic neurons from caudal NTS seem to contribute little to the regulation of neonatal feeding.

The most important consequences from the present studies are the design of the experimental approach that can be used in subsequent studies; and the determination of the little participation, in ingestion response, of the catecholaminergic neurons in the ages explored here. Relevancy of present results is the generation of a research project on neuronal maturation related to ingestion regulation field.

II. ANTECEDENTES

En esta sección se presenta información general acerca de la regulación de la ingesta de alimento en adultos, posteriormente se presentan antecedentes relevantes para los estudios experimentales que forman este trabajo de tesis.

A. Regulación de la ingesta

En el control de la ingesta de alimento participan mecanismos internos que principalmente regulan el hambre y la saciedad, y factores externos que regulan la disponibilidad de comida, su palatabilidad y el apetito. Como se esquematiza en la Figura 1, los factores internos incluyen señales periféricas como la temperatura, la concentración de glucosa, proteínas y grasas. También incluyen las señales neurales generadas por la distensión estomacal y el volumen gástrico; así como señales hormonales como son los péptidos gastrointestinales. Todos ellos llevan la información del tracto gastrointestinal al SNC (Conn y Freeman, 2000).

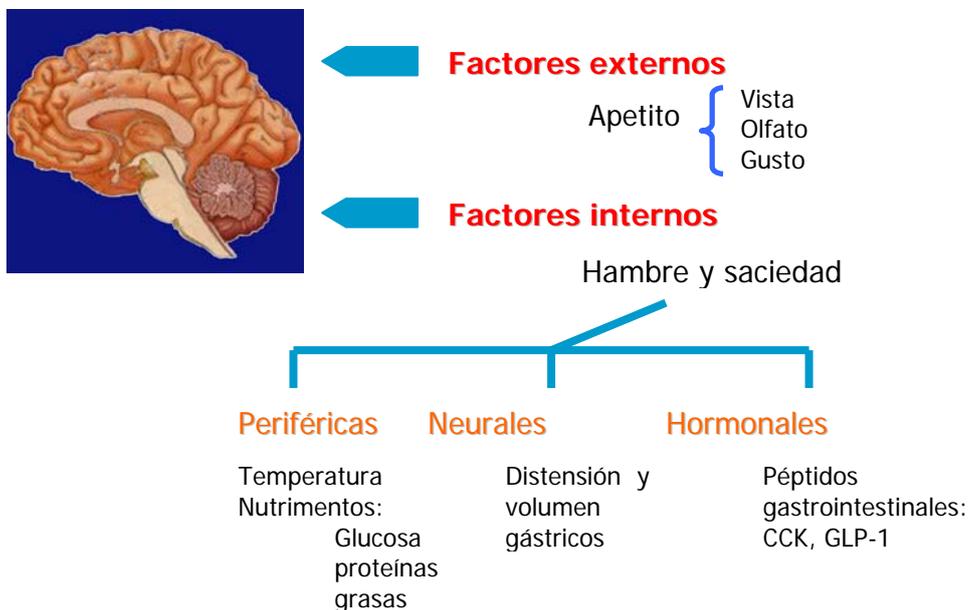


Figura 1. Regulación de la ingesta por factores internos y externos

Las señales externas que regulan la ingesta pueden jugar un papel muy importante en la determinación de la cantidad de comida ingerida y el tipo de alimentación. Asimismo, los sabores, la textura y la apariencia de los alimentos a ingerir son importantes en la selección y la cantidad de la comida que se consume debido a que las señales gustativas, visuales y olfatorias son fundamentales en la selección del alimento y percepción de los sabores (Berthoud, 2004; Conn y Freeman, 2000). Así, los sentidos del gusto junto con el olfato y la vista, nos informan si se debe ingerir el alimento, si la experiencia es placentera y cuándo estamos satisfechos.

La vía visual informa indirectamente al cerebro acerca del valor nutricional de un alimento particular, ya que involucra varias estructuras corticales antes de generar la respuesta a la alimentación. En el caso de la vía olfatoria, los receptores que son quimiorreceptores son activados por el olor de los alimentos, quizás el olor de aminoácidos o proteínas, pero no hay mucha evidencia experimental de que el sistema olfativo codifique directamente para diferentes macro o micronutrientes. Las vías y núcleos de relevo para la percepción olfatoria están organizados de forma diferente que los otros sistemas sensoriales. La información llega a varias áreas corticales incluyendo la corteza entorrinal, y la información desde la corteza olfatoria primaria, la corteza piriforme, es entonces transmitida a áreas de asociación polimodal tales como la corteza orbitofrontal e insular así como también la amígdala, donde ésta se integra junto con las vías gustatoria, visceral, y somatosensorial, y desde la corteza entorrinal a la formación hipocámpica (Berthoud y Seeley, 2000).

La entrada gustativa vía receptores de las células gustativas que están sobre la lengua y el paladar son considerados los más importantes en la ingesta y la selección del alimento. La textura y la temperatura de los alimentos son detectadas por mecanorreceptores vía el trigémino y termorreceptores presentes en la lengua y en la cavidad oral. Las cuatro modalidades de sabores han sido interpretadas como los detectores para alimentos aceptables, tóxicos y alimentos indispensables como agua y sal (Berthoud y Seeley, 2000). La activación de estos receptores llevan la información hacia la región rostral del NTS conocida como el núcleo gustativo, siendo posteriormente transmitida ipsilateralmente al núcleo parabraquial y de aquí toma dos rutas, una que va

hacia el núcleo ventral posterior del tálamo, donde terminan en la mitad medial de la porción parvocelular del núcleo ventroposteromedial (VPMpc) y finalmente a la corteza gustativa; la otra ruta va hacia la amígdala, el hipotálamo y otras áreas del cerebro anterior ventral (Figura 2). Es probable que estas proyecciones influyan en la saciedad, sabor agradable y otros estados afectivos asociados con el gusto, por lo tanto, el sabor se considera una combinación de información gustativa y olfatoria a partir de un estímulo particular (Paxinos, 1994).

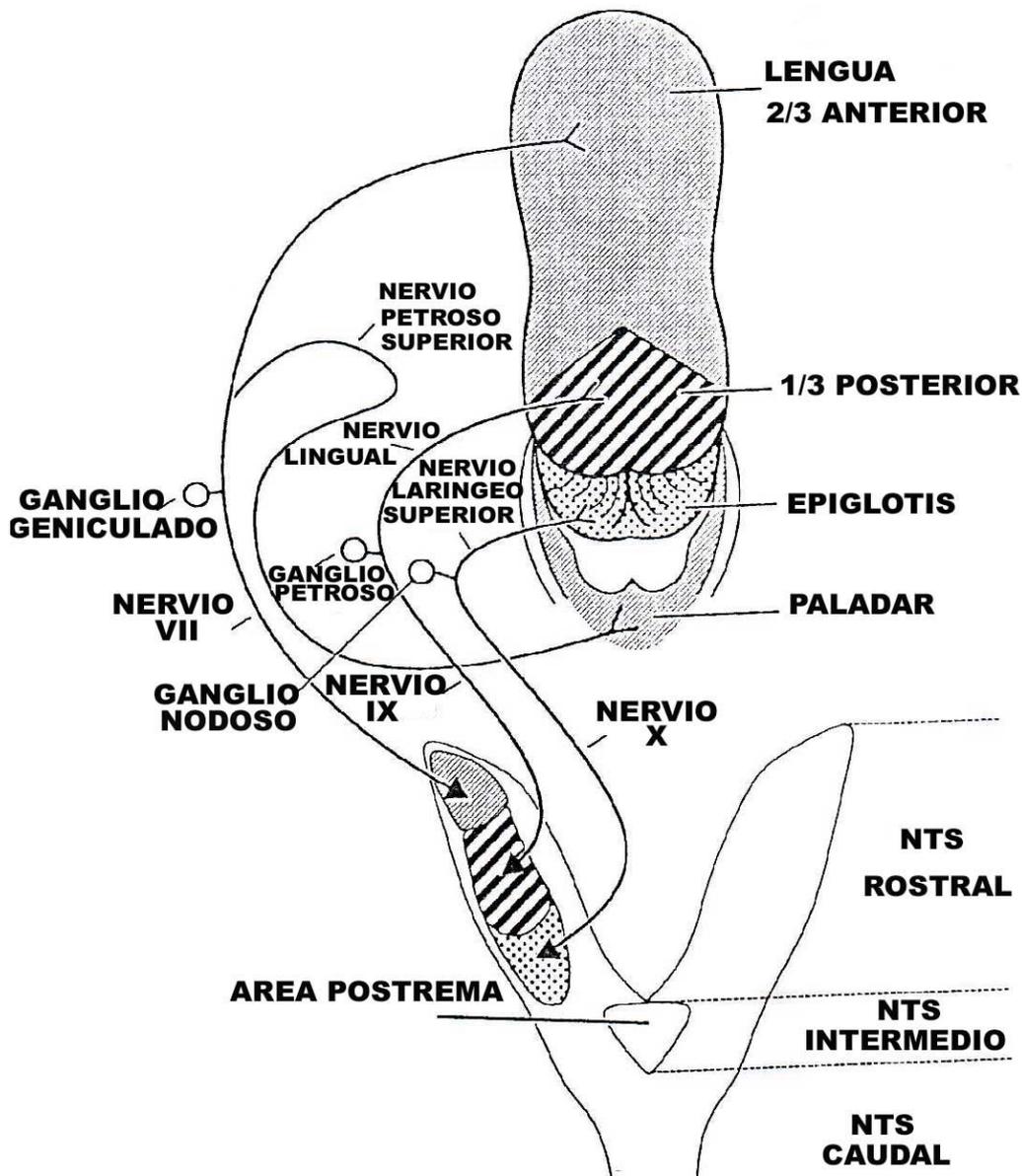


Figura 2. Distribución de la vía gustativa y sus sitios de terminación en el NTS (Modificado de Paxinos, 1994).

Por ejemplo, la ingesta de un alimento que provoca náuseas hará que se detenga su consumo y además causará rechazo. Por el contrario, cuando se ingiere un alimento placentero y se tiene una experiencia agradable entonces aumentará la probabilidad de que este alimento se consuma otra vez. Sin embargo, la demanda interna de la concentración de nutrientes particulares puede también jugar un papel importante en el patrón de la ingesta, con mecanismos fisiológicos establecidos para estimular el consumo de sal, fluidos, minerales esenciales y nutrientes específicos, en particular proteínas (Conn y Freeman, 2000).

1. Señales periféricas que transmiten información metabólica al cerebro

Como se mencionó, existen factores periféricos tales como la temperatura, nutrientes, señales neurales y hormonales que regulan la ingesta, proporcionando información acerca del status energético corporal al sistema nervioso central (SNC).

a.- Temperatura

Se sabe que los cambios tanto en la temperatura externa como en la interna modifican la ingesta. La temperatura del cuerpo está regulada por mecanismos neurales de retroalimentación y casi todos ellos operan a través de los centros reguladores de la temperatura localizados en el hipotálamo, cuyos núcleos principales son el preóptico y el hipotálamo anterior. En estas áreas se ha visto que el calor procedente de un térmico (dispositivo similar a una aguja que se calienta y que se coloca en un área específica del cerebro) afecta al control de la temperatura corporal en estos núcleos (Elmqvist y col., 1999).

Para que estos mecanismos de retroacción actúen, existen receptores periféricos y profundos, llamados también termorreceptores. Los receptores periféricos detectan la temperatura exterior fresca y fría; los receptores profundos que están por todo el cuerpo, principalmente en la médula espinal y en las vísceras abdominales como el estómago, actúan de forma diferente a los cutáneos porque están expuestos a la temperatura corporal central en lugar de a la temperatura superficial y es posible que tengan que ver con la evitación de

la hipotermia o temperaturas corporales bajas. Así, el hipotálamo anterior responde con una inhibición en la ingesta a un incremento en la circulación sanguínea (Guyton y Hall, 1997).

b.- Nutrimientos

De la misma manera, los nutrimentos y las hormonas están involucrados en la regulación de la ingesta. Debido a que los nutrimentos viajan por el torrente sanguíneo pueden actuar directamente a nivel del SNC o también mediante quimiorreceptores en el tracto gastrointestinal, vena portal e hígado. Entre las hormonas que modulan la ingesta se encuentran las que son producidas por órganos endocrinos, incluyendo glándula adrenal y páncreas, y las producidas por células endocrinas dentro de otros tejidos corporales incluyendo el tracto gastrointestinal y el tejido adiposo (Conn y Freeman, 2000).

Los nutrimentos involucrados son:

- 1.- Glucosa
- 2.- Proteínas
- 3.- Grasas

Glucosa.- Uno de los nutrimentos implicados en la regulación de la ingesta. Desde hace tiempo se sabe que una disminución pequeña en la concentración sanguínea de glucosa promueve que se ingiera un alimento, lo que ha llevado a la teoría glucostática del hambre propuesta por Mayer en 1953 (Guyton y Hall, 1997) y de la regulación de la ingesta del alimento (Tabla 1). Esta teoría propone que si la disponibilidad de glucosa disminuye, el animal aumenta de forma automática la ingestión de alimento, que finalmente devolverá las concentraciones sanguíneas de los metabolitos a la normalidad.

Se ha visto que neuronas en el hipotálamo ventromedial y lateral son activadas en respuesta a la aplicación de glucosa. La insulina y la leptina son reguladas por el metabolismo de la glucosa, así como otros mecanismos indirectos como la estimulación por glucosa de señales gastrointestinales involucradas en la saciedad tales como, el polipéptido gástrico inhibitorio (GIP) y el péptido similar al glucagón (GLP-1) (Vella y Rizza, 2004).

Proteínas.- Otro de los nutrimentos, como alimentos ricos en proteínas, inducen un efecto de saciedad. Alimentos bajos en proteína pueden estimular el apetito por alimentos ricos en proteínas (Tabla 1). Se ha observado que la administración de ciertos aminoácidos, como triptófano, tirosina y fenilalanina, que son precursores de la serotonina y de las catecolaminas suprimen la ingesta. Los aminoácidos podrían influir en la ingesta actuando directamente sobre el SNC o vía de quimiorreceptores u otra vía secundaria como es la región hepatoportal. Por ejemplo, los aminoácidos absorbidos pueden actuar indirectamente en la regulación de la ingesta mediante la estimulación del péptido colecistoquinina (CCK) (Campfield, 1997), o en algunos casos mediante la estimulación de la secreción de insulina, la cual puede, a su vez, estimular la producción de leptina (Conn y Freeman, 2000).

Grasas.- Las grasas ingeridas y/o niveles elevados de grasa en la circulación pueden inhibir la ingesta (Tabla 1). Sin embargo, dietas altas en grasas dificultan la capacidad de las dietas altas en carbohidratos para inducir la producción de leptina, lo cual a la larga puede conducir a un incremento en la ingesta y por lo tanto un aumento de peso como parte de la regulación de la ingesta a largo plazo (Conn y Freeman, 2000). Existen otros productos metabólicos que pueden también afectar la ingesta, como el lactato, piruvato y cetonas como el beta-hydroxibutarato, que actúan inhibiendo la ingesta.

También se ha demostrado el mismo efecto de la glucosa para la concentración sanguínea de aminoácidos y de productos del metabolismo de los lípidos como los cetoácidos y algunos ácidos grasos, lo que conduce a las teorías aminostáticas y lipostática de la regulación.

Así mismo, estudios neurofisiológicos de la función de ciertas áreas específicas del cerebro han apoyado estas teorías por las siguientes observaciones:

- 1) un aumento de la glucosa sanguínea aumenta la velocidad de descarga de las neuronas glucorreceptoras en el centro de la saciedad del núcleo ventromedial del hipotálamo,

2) el mismo aumento de la glucosa sanguínea reduce, de forma simultánea, la descarga de las neuronas llamadas neuronas glucosensitivas en el centro del hambre del hipotálamo lateral.

Además, algunos aminoácidos y sustancias lipídicas afectan a las velocidades de descarga de estas mismas neuronas o de otras estrechamente asociadas (Russek, 1981).

NUTRIMENTOS	INGESTA
Disminución de glucosa	Aumenta
Disminución de proteínas	Aumenta
Aumento de grasas	Inhibición

Tabla 1. Efectos sobre la ingesta por distintos nutrimentos.

Hemos visto que los nutrimentos son importantes en la regulación de la ingesta, por lo que cabe mencionar que el contenido de éstos en la leche de rata son los siguientes:

Proteínas : 7- 12 %

Azucares : 3 –3.5 %

Grasa : 10 –15 %

Agua : 70 –74 %

De esta forma, podemos decir que las proteínas y las grasas son los principales nutrimentos que juegan un papel importante en la regulación de la ingesta de las crías, al igual que la distensión gástrica inducida por el alimento. Este último aspecto será revisado mas adelante.

2. Señales neuronales involucradas en la ingesta

a. Señales neurales

Otras señales involucradas en la ingesta son las señales neurales, las cuales se originan a partir de receptores localizados en el tracto gastrointestinal disparando señales aferentes que llegan al SNC y que regulan la ingesta (Berthoud y Seeley, 2000; Conn y Freeman, 2000). Estas señales son las provocadas por el volumen gástrico y los péptidos gastrointestinales.

Volumen.- La activación de los mecanorreceptores gástricos por la distensión gástrica en el tracto gastrointestinal envían la señal mediante una vía aferente al SNC, lo que juega un papel importante en la ingesta, así como también tiene importancia en el consumo de la energía a corto plazo. Por lo tanto, si se incrementan las calorías se consumirán pequeñas porciones de alimento. En este caso la detección del volumen no juega un papel primario importante en la regulación de la ingesta en un tiempo corto. De esta manera, se cree que el volumen no participa en la regulación a largo plazo del balance energético y del tejido adiposo (Conn y Freeman, 2000).

Las señales que actúan inhibiendo o retrasando el vaciamiento gástrico (tal como la presencia de grasas dentro del duodeno o la liberación de un número de péptidos gastrointestinales como gastrina, CCK, GIP y GLP-1), conducirán indirectamente a la saciedad y a una disminución en la cantidad del alimento mediante la activación de sus receptores presentes en duodeno e hígado (Mihai y Robert, 2000). Los quimiorreceptores gastrointestinales, responden a nutrimentos y pueden también regular la ingesta mediante la vía vagal aferente, mientras que los mecanorreceptores informan al sistema entérico y central del grado de estiramiento de la pared del aparato gastrointestinal y del movimiento del contenido luminal a medida que éste roza la superficie mucosa, por lo tanto la señal de la distensión gástrica juega un papel importante en el proceso de saciedad, pero por sí solo, este estímulo no lleva información sobre la composición química de la ingesta. Por lo que se requiere de la combinación con las señales de los quimiorreceptores para determinar la cantidad ingerida

de un macronutriente específico y por consiguiente el efecto sobre la distensión gástrica (Berthoud y Seeley, 2000).

b. Péptidos del tracto gastrointestinal

El péptido CCK es liberado por células endocrinas en el duodeno en respuesta a la presencia de grasas y productos de la degradación de proteínas en el intestino proximal (Figura 3). La administración periférica exógena de CCK disminuye la cantidad del alimento ingerido en ratas y en humanos (Conn y Freeman, 2000). CCK actúa periféricamente en receptores CCK-A presentes en hígado bloqueándolos para provocar la saciedad. También tiene un efecto potente para inhibir el vaciamiento gástrico, el cual puede conducir a una activación de los receptores. Este péptido es liberado en el núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo por neuronas que proyectan desde el núcleo del tracto solitario (NTS) en respuesta al alimento, y la administración intracerebroventricular de CCK inhibe la ingesta de manera más eficiente que la administración periférica (Conn y Freeman, 2000).

En 1902, Bayliss y Starling demostraron por primera vez que el efecto excitatorio de la estimulación duodenal sobre la secreción pancreática se debía a un factor transportado por la sangre. Sus investigaciones condujeron a la identificación de la secretina, ahora conocida como CCK, la cual aumenta la contracción del esfínter pilórico, evitando de esta manera el reflujo de contenido duodenal al estómago (Figura 3). Así mismo, la CCK estimula la secreción de glucagon. Ellos también sugirieron que muchos agentes químicos podrían ser secretados por células en el cuerpo y pasar a la circulación afectando órganos situados a cierta distancia, por lo que introdujeron el nombre de hormona (Lee y col., 1994).

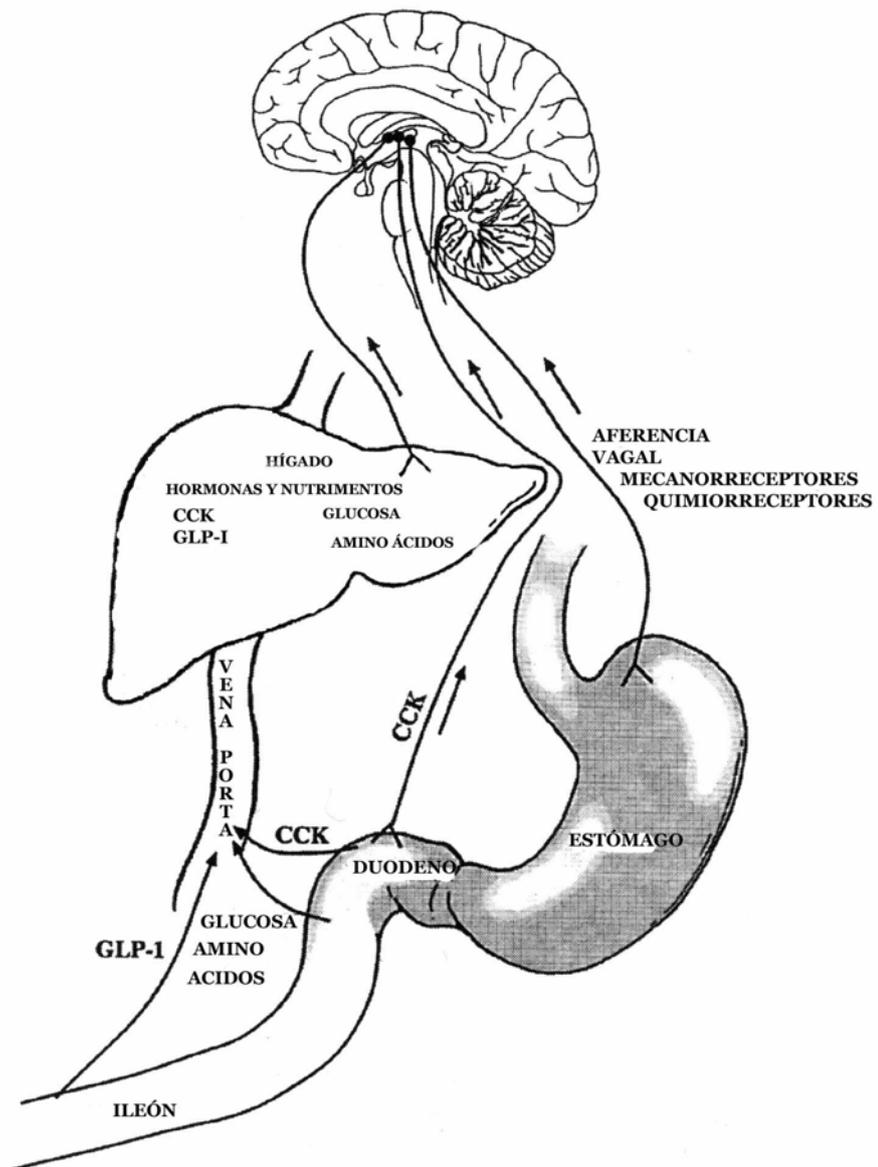


Figura 3. Señales que juegan un papel importante en la regulación de la ingesta.

Estos péptidos y nutrientes actúan inhibiendo o retrasando el vaciamiento gástrico (grasas, gastrina, CCK, GIP y GLP-1), lo cual conduce indirectamente a la saciedad mediante la activación de mecanorreceptores. Los quimiorreceptores del tracto gastrointestinal responden a los nutrientes y pueden también regular la ingesta por la activación de la vía vagal aferente.

El péptido similar al glucagón (GLP-1) es liberado por células endocrinas en el tracto gastrointestinal y tiene acción periférica para reducir la ingesta. Este péptido es producido también por una población de neuronas hipotalámicas,

tiene un efecto similar de inhibición en el SNC, y actúa en neuronas presentes en la región caudal del núcleo del tracto solitario (NTS), ya que esta región recibe información vagal aferente desde el tracto gastrointestinal y desde el NTS esta información pasa al PVN. Este núcleo hipotálmico está densamente innervado por fibras ascendentes GLP-1 (Sawchenko y col., 1996) y contiene receptores a GLP-1, por lo que se ha propuesto que el PVN es el sitio primario de acción del GLP-1 en la regulación de la ingesta. Este péptido producido por dos diferentes tipos de tejido puede tener un papel importante en la regulación de la ingesta, como un agente endocrino en la periferia y como un neurotransmisor en el SNC ya que el GLP-1 es producido también por células L endocrinas en el íleon y es secretado en respuesta a nutrientes en el intestino (Figura 3). La administración intravenosa de GLP-1 produce sensación de saciedad en humanos. Es probable que este efecto sea mediado, en parte, por la inhibición del vaciamiento gástrico (Conn y Freeman, 2000).

Otro péptido de origen gástrico es el péptido liberador de gastrina (GRP) el cual es producido por células endocrinas en la mucosa gástrica, induciendo la sensación de saciedad y disminuyendo la ingesta.

También son importantes en la regulación de la ingesta la insulina y leptina, ya que la insulina en colaboración con GIP y GLP-1 disminuye la ingesta, actuando en receptores localizados en varias áreas del cerebro que regulan la ingesta como son el hipotálamo, la región olfatoria y el hipocampo (Conn y Freeman, 2000).

La leptina es producida por el tejido adiposo, actúa sobre receptores en diferentes áreas del SNC principalmente en el hipotálamo, disminuyendo la ingesta (Campfield, 1997). Se ha propuesto que la leptina modula las fibras vagales aferentes que inervan al tracto gastrointestinal mediante la liberación de CCK (Berthoud y Seeley, 2000).

Las concentraciones circulantes de leptina no son constantes en el curso del día. En el humano, un patrón circadiano caracterizado por un pico nocturno, que generalmente ocurre en la medianoche, está relacionado con la secreción de la insulina, ya que al ingerir alimentos altos en carbohidratos y bajos en grasas, se produce insulina y se incrementa por lo tanto la producción de leptina 4 a 6h después de consumir alimento. Sin embargo, el pico nocturno se

da igual cuando se ingiere alimento bajo en carbohidratos y alto en grasas. De esta manera, está regulada por los macronutrientes contenidos en el alimento. La disminución de leptina puede contribuir a los efectos de dietas altas en grasas y así incrementar el peso corporal y provocar la obesidad (Conn y Freeman, 2000).

Acerca del glucógeno hepático, se ha postulado que genera una señal al cerebro, mediante la activación del potencial de membrana del hepatocito y por aferencias vagales. Esto aún no sea aceptado, pero se especula que esta señal del glucógeno hepático es análoga a la leptina (Berthoud y Seeley, 2000).

En la siguiente tabla se resume la regulación de la ingesta por los péptidos gastrointestinales.

PÉPTIDOS GASTROINTESTINALES	INGESTA
CCK	inhibe
GLP-1	inhibe
GRP	inhibe
GIP	inhibe
LEPTINA	inhibe
INSULINA	inhibe

Tabla 2. Regulación de la ingesta mediante los péptidos gastrointestinales

c. Otras hormonas

Otras señales endocrinas que influyen en la regulación de la ingesta son los glucocorticoides, los cuales tienen acción catabólica debido a que su administración en el SNC estimula la ingesta actuando de manera opuesta a la insulina y leptina. Por lo tanto, la interacción de glucocorticoides, insulina y leptina son cruciales en la regulación de la ingesta en un período largo (Conn y Freeman, 2000). La secreción de insulina por las células β de los islotes

pancreáticos es influida por varios factores, principalmente por la glucosa sanguínea. La secreción de insulina aumenta en relación directa con la concentración de glucosa en el páncreas. Otros substratos como los aminoácidos y cuerpos cetónicos también estimulan la secreción de insulina. La actividad parasimpática colinérgica estimula la secreción de insulina y la simpática α -adrenérgica la inhibe (Zigmond y col., 1999).

Por otra parte, las hormonas tiroideas juegan también un papel importante en la regulación energética, el mecanismo por el cual influyen en la ingesta esta poco comprendido, es probable que los efectos de la administración de esta hormona incremente la ingesta. El hipertiroidismo incrementa el metabolismo lo cual produce reducción del peso corporal, así como la disminución de leptina e insulina, por lo tanto incrementa la ingesta y en el hipotiroidismo lo que ocurre es un efecto opuesto (Conn y Freeman, 2000).

3. Vía neural que participa en la regulación de la ingesta

Como se mencionó, en la regulación de la ingesta existe un control neural y vías específicas por las que la información del tracto digestivo llega al cerebro. El SNC ejerce un control sobre la ingesta a varios niveles: la médula espinal y el tallo cerebral, los cuales influyen en todos los aspectos de homeostasis calórica por medio del sistema nervioso autónomo. El hipotálamo y el sistema límbico reciben señales acerca de la comida ingerida y la grasa corporal y la integran con la información acerca del sabor de los alimentos, la memoria de la ingesta, la experiencia de comidas previas, la competencia con otras necesidades y aspectos del medio ambiente. Así, el control central de la ingesta implica muchas áreas del SNC en el mantenimiento de la homeostasis calórica (Berthoud y Seeley, 2000).

Para ejercer dicho control, el sistema nervioso recibe información del tipo de nutrimentos o metabólica. En la figura 4 se muestra un diagrama del flujo general de la regulación neural de la ingesta, donde el sistema nervioso es esencial en la tarea de integrar la información e iniciar las respuestas apropiadas de los sistemas autónomo y endocrino.

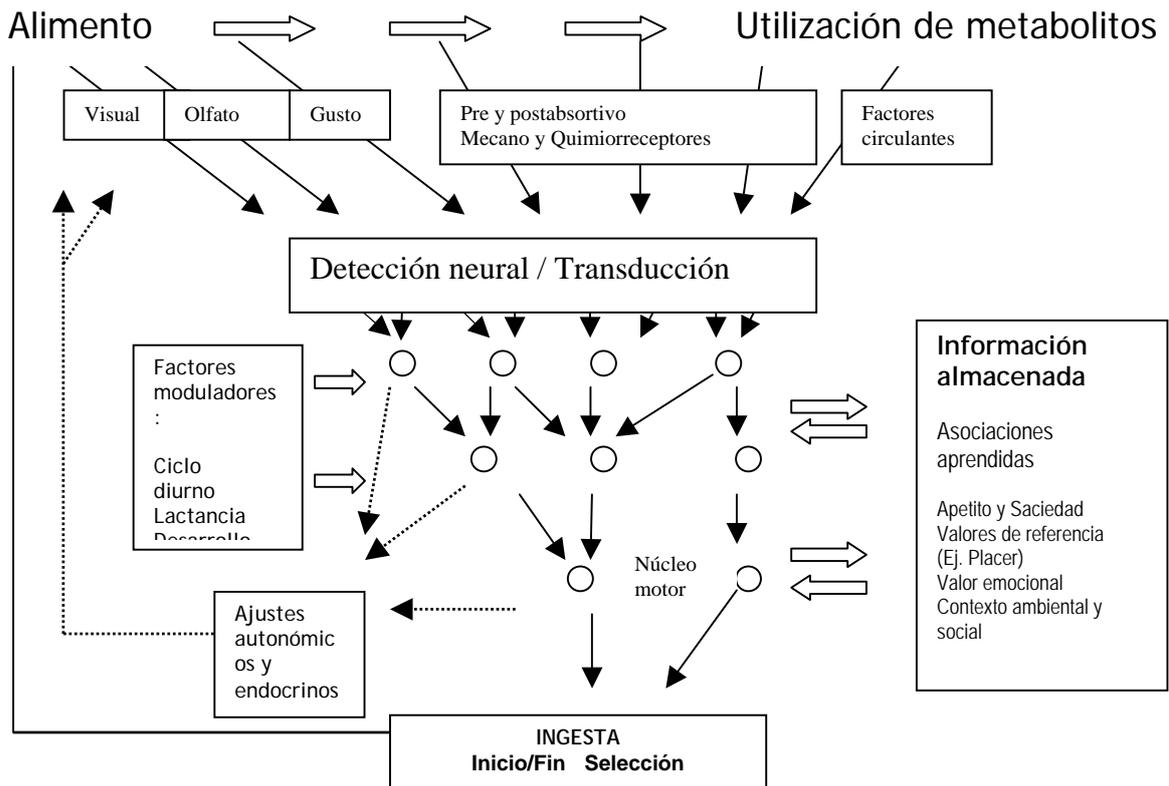


Figura 4. Flujo general de la información requerido en la regulación neural de la ingesta. La tarea esencial para el sistema nervioso es reducir e integrar las múltiples fuentes de la información relevante e informar a los sistemas endocrino, autonómico y conductual para iniciar las respuestas apropiadas. Para explicar el control en términos neurológicos, cada paso es representado por círculos, los cuales indican que no han sido caracterizados e identificados (modificado de Berthoud y Seeley, 2000).

Los estímulos externos son percibidos por la vista, el olfato y el gusto. Los estímulos internos son generados por la comida después de su ingestión y se pueden dividir según el estímulo generado en cada segmento del canal alimentario en pregástrico (principalmente el sabor), gástrico (distensión) y postgástrico o estímulo preabsortivo.

El estímulo preabsortivo incluye aquellos generados por:

- 1) mecanismo de transporte de nutrientes en la mucosa y la liberación asociada de hormonas locales (CCK, etc.) actuando en nervios viscerales sensoriales,

- 2) nutrimentos, metabolitos y hormonas actuando sobre receptores en el sistema portal-hepático (glucosa),
- 3) procesamiento de los metabolitos y sus mensajeros locales asociados y hormonas en el hígado (ATP, glucagón); y
- 4) metabolitos, hormonas y otros factores circulando en la sangre y activando receptores directamente en el cerebro (glucosa, amino ácidos, insulina y leptina).

Así, la información puede ser derivada directamente de la ingesta, de acciones metabólicas u hormonales, e indirectamente de representaciones en la memoria asociadas con los alimentos (Berthoud y Seeley, 2000).

Se ha demostrado que cuando el alimento llega al estómago, las paredes de éste, que se encuentran cubiertas de mecano- y quimiorreceptores, incrementan su actividad en proporción al volumen del mismo y estas señales son llevadas por medio del nervio vago al núcleo del tracto solitario, área postrema y al núcleo parabraquial, en el tallo cerebral. Posteriormente dichas señales viajan al hipotálamo donde son integradas y finalmente llegan a la corteza cerebral (Woods y Stricker, 1999).

La señal sobre la distensión gástrica juega un papel importante en los procesos de saciedad, pero por sí misma no da información sobre la composición química de la ingesta. Sin embargo, si la combinamos con las señales de los quimiorreceptores, podemos inferir cuantitativamente la cantidad de macronutriente que fue ingerido. Esto es debido a que a lo largo del canal alimentario hay varios mecano- y quimiorreceptores que transmiten las señales a través de la vía aferente vagal por el nervio trigémino (V), facial (VII), glosofaríngeo (IX) y nervio vago hacia el tallo cerebral. En la figura 5 se muestra el papel importante que juegan las aferencias vagales primarias en la transmisión de las señales involucradas en la regulación de la ingesta al cerebro.

Existen reportes también de la presencia de quimiorreceptores en el intestino, así como también en vena portal y en hígado; estos receptores son sensibles principalmente a glucosa y otras hexosas, varios aminoácidos y ácidos grasos (Appenzeller y Oribe, 1997). Estas aferencias vagales llevan información

principalmente al núcleo del tracto solitario del tallo cerebral (figura 5), las señales mecánicas y químicas del tracto digestivo activan mecano- y quimiorreceptores presentes en la pared del peritoneo y en la piel, los cuales, contribuyen a la percepción de llenado gástrico después de ingerir abundantes alimentos (Berthoud y Seeley, 2000).

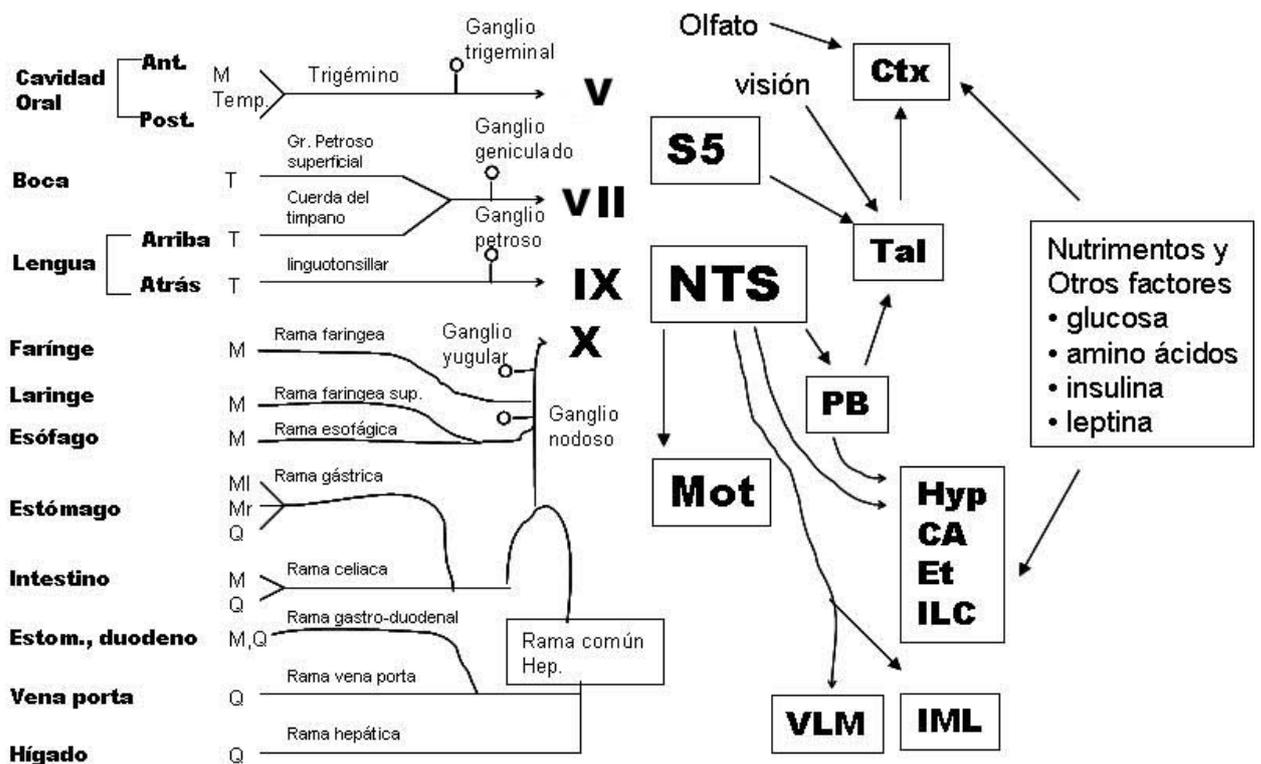


Figura 5. Vía neural visceral involucrada en la regulación de la ingesta y la integración en el cerebro. V= trigemino, VII= facial, IX= glossofaríngeo, X= nervio vago. La modalidad sensorial transmitida por cada nervio esta indicada por las letras: M= mecanorreceptores, (MI= mecanorreceptor de lenta adaptación, Mr= mecanorreceptores de rápida adaptación), T= receptores gustativos, Temp= termorreceptores, Q= quimiorreceptores. Abreviaciones: Et= núcleo de la estría terminalis, CA= núcleo central de la amígdala, Hyp= hipotálamo, ILC= corteza insular; IML= columna intermediolateral de la médula espinal, Mot= núcleo motor oral del tallo cerebral, NTS= núcleo del tracto solitario, PB= complejo nuclear parabraquial, S5= núcleo sensorial primario del nervio trigémino, Ctx= corteza sensorial, Tal= tálamo y VLM= médula ventrolateral (modificado de Berthoud y Seeley, 2000).

En la figura 5, la primera columna representa al tracto digestivo, en sus estructuras descendentes. La segunda columna enumera cada uno de los receptores presentes en cada parte del tracto digestivo, posteriormente se indican las ramas de los nervios V, VII, IX y X y cómo estos nervios llevan la

información hacia el tallo cerebral, donde el nervio V llega al núcleo del trigémino y los otros al núcleo del tracto solitario. La información a partir del NTS puede llevarse al núcleo parabraquial o al hipotálamo y áreas del sistema límbico. El núcleo parabraquial es un relevo para enviar la información al tálamo y de aquí hacia la corteza cerebral. Existen también eferencias a partir del NTS que llegan al núcleo motor del vago, médula ventrolateral y médula intermediolateral. Como vimos anteriormente, la visión y el olfato juegan un papel importante en la regulación de la ingesta ya que estos estímulos llegan a tálamo y corteza respectivamente. La presencia de nutrimentos y otros factores también son importantes en la regulación de la ingesta llegando a corteza, hipotálamo y algunas áreas del sistema límbico.

a. Núcleo del tracto solitario

Es el relevo principal sensorial involucrado en la regulación de la ingesta, este núcleo se divide en tres regiones: rostral, intermedia y caudal en relación con la posición del área postrema (Figura 6).

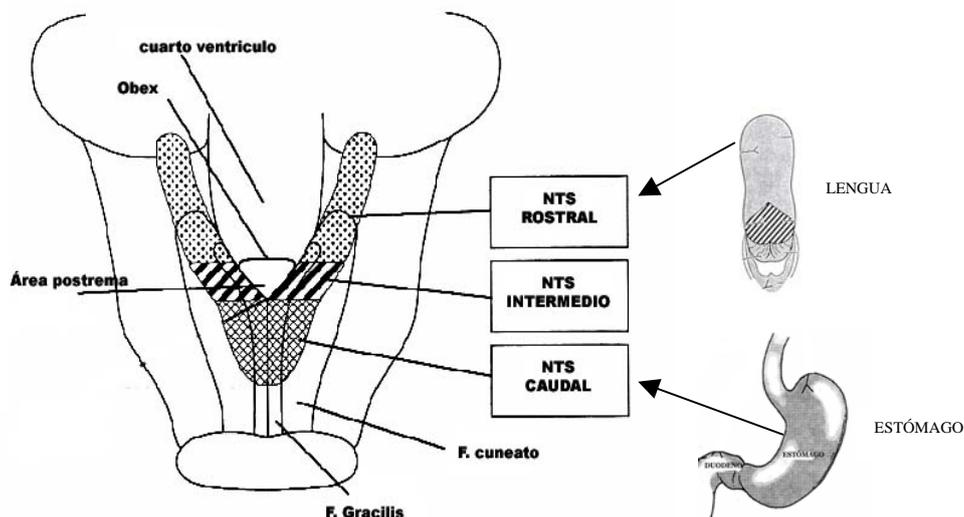


Figura 6. División del núcleo del tracto solitario.

La parte rostral del núcleo solitario recibe principalmente fibras aferentes viscerales especiales (del gusto) que provienen de los nervios facial y glossofaríngeo, y se le denomina núcleo gustativo (Figura 6). Los núcleos

solitarios caudal y medial reciben la mayor parte de las fibras aferentes viscerales generales del nervio vago, estos núcleos contienen neuronas catecolaminérgicas y peptidérgicas (karimnamazi, 2002).

Este núcleo presenta una forma ovoide y está constituido por un número diferente de subnúcleos, la entrada primaria aferente visceral que proyecta al NTS está organizada de dos maneras. La primera involucra proyección órgano específica a un subnúcleo individual del NTS y la segunda es dada por una serie de aferencias superpuestas que proyectan a una región común del NTS. Un área del NTS en particular, es única porque recibe entradas desde todos los sistemas viscerales principales excepto aquellos relacionados con órganos pélvicos, esta región es el núcleo comisural y su continuación rostral es el NTS medial. Sin embargo, no hay evidencia fisiológica para dar soporte a la idea de que neuronas individuales en la comisura media del NTS recibe entradas convergentes desde diferentes órganos, pero está bien documentado que las neuronas en esta región contribuyen a los axones que proyectan hacia áreas del cerebro anterior (Paxinos, 1994).

b. La ingesta y zonas cerebrales relacionadas con la distensión gástrica

Las aferencias de diferentes partes del núcleo solitario se proyectan a los núcleos parabraquiales medial y lateral. Berthoud y Seeley (2000), han sugerido que ciertas áreas del tallo cerebral junto con otras áreas del cerebro anterior podrían considerarse como la unidad central del circuito involucrado en la ingesta, donde intervienen cuatro áreas que están interconectadas y que muestran relevancia importante para el control de la ingesta (Figura 7).

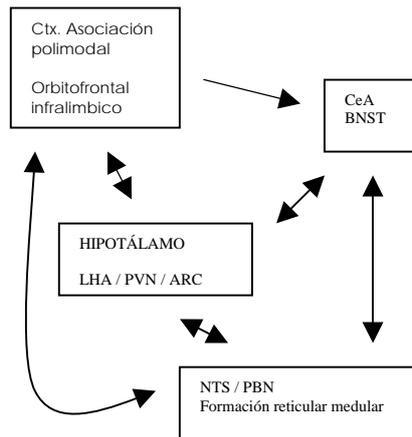


Figura 7. Circuito involucrado en el control de la ingesta propuesto por Berthoud H.R. Ctx= corteza, LHA= hipotálamo antero lateral, PVN= núcleo paraventricular, ARC= núcleo arcuato, NTS= núcleo del tracto solitario, PBN= núcleo parabraquial, CeA= núcleo central de la amígdala. (tomado de Berthoud y Seeley, 2000).

Corteza

Las áreas corticales que parecen estar involucradas en el control de la ingesta son aquellas que contienen alta información sensorial polimodal o supramodal, así las señales individuales sensoriales (visual, gusto y tacto) tienen relevos en el tálamo y corteza sensorial, las señales olfatorias llegan a través del bulbo olfatorio y corteza piriforme. También, la corteza motora primaria está involucrada en los movimientos motores voluntarios necesarios para la ingestión de alimentos. La zona lateral del hipotálamo provee la entrada no talámica a la corteza, sugiriendo que la integración de la información requiere de la modulación por el hipotálamo para ser procesada en la corteza. En la rata la corteza prefrontal es la parte rostral de la zona de transición iso y alo-corteza, incluyendo al cíngulo anterior, corteza insular agranular y a las áreas orbitofrontales (Berthoud y Seeley, 2000)

Amígdala

Los núcleos central y medial de la amígdala son importantes en la regulación de la ingesta por sus acciones directas sobre la conducta de ingesta determinada en estudios de ablación o estimulación, y además por su conexión con otras áreas cerebrales. Existen 4 categorías de aferencias a la amígdala.

La primera es el sitio de terminación de las proyecciones descendentes de la corteza insular agranular y de otras áreas corticales cuyos relevos están en el núcleo lateral y basal de la amígdala, y recibe información sensorial de la corteza orbitofrontal. La segunda es que recibe información sensorial visceral desde el núcleo del tracto solitario y del parabraquial del tallo cerebral. La tercera son las aferencias desde el núcleo paraventricular y el hipotálamo lateral. Finalmente, hay entradas desde el núcleo accumbens, el cual posiblemente está relacionado con el aspecto emocional sobre un estímulo particular de algún alimento.

Proyecciones del núcleo amígdalino central y medial incluye al paraventricular, dorsomedial, ventromedial arcuato, preóptico, núcleo premamilar, e hipotálamo lateral; varias partes de la vía sensorial olfatoria, el hipocampo, núcleo accumbens y tálamo medial, al área tegmental ventral y sustancia negra; así como del núcleo parabraquial y núcleo del tracto solitario, núcleo motor del vago, medula ventrolateral, médula espinal. Sin embargo, muchas de estas proyecciones son directas y usan al hipotálamo lateral, ventromedial y dorsomedial como relevos. El núcleo basomedial amígdalino proyecta a áreas corticales incluyendo corteza insular, piriforme y límbica. Por lo tanto, la amígdala es considerada como parte integral del circuito del control de la ingesta (Figura 7) (Berthoud y Seeley, 2000).

c. El hipotálamo

El hipotálamo es un área cerebral que juega un papel importante en la regulación central de la ingesta. Tradicionalmente, el hipotálamo lateral era considerado el sitio del sistema nervioso inhibitorio de la ingesta y el hipotálamo ventromedial el sitio que podría estimular la ingesta. Sin embargo, estudios recientes revelan que la regulación del apetito y del peso corporal no es tan sencilla como dos sitios cerebrales con acciones opuestas sobre la ingesta. Otras áreas hipotalámicas como el núcleo paraventricular y el núcleo arcuato también juegan un papel crítico en la regulación de la ingesta (Ganong, 1998; Berthoud y Seeley, 2000).

El hipotálamo está dividido en 3 regiones lateral, medial y periventricular, y en dirección rostro-caudal se divide en anterior, medio y posterior. Las neuronas

relacionadas en la regulación de la ingesta están organizadas preferentemente en núcleos dentro de la región medial, la cual puede dividirse en sentido rostrocaudal en tres regiones diferentes:

- 1) una región supraóptica rostral, que se encuentra por encima del quiasma óptico,
- 2) una región tuberal media y
- 3) una región mamilar que continúa en dirección caudal con la sustancia gris periacueductal.

La región supraóptica contiene a los núcleos paraventricular (PVN) y el núcleo supraóptico (NSO). El PVN está situado dorsalmente y consta anatómicamente y funcionalmente de poblaciones celulares distintas, entre las cuales se halla un grupo medial de predominio parvocelular y un prominente grupo magnocelular lateral, identificadas fácilmente por su citoarquitectura diferente, por el contenido de neurotransmisores.

Los componentes magnocelulares de los núcleos supraóptico y paraventricular proyectan fibras al lóbulo neural de la hipófisis y envían vasopresina u oxitocina por diferentes fibras. Una pequeña proyección de estos núcleos llega hasta la zona externa de la eminencia media. Las regiones del PVN que contienen elementos parvocelulares dan origen a axones descendentes que se proyectan al tronco del encéfalo hacia el núcleo dorsal del vago y a médula espinal. Cada una de las células que contienen oxitocina o vasopresina de estos núcleos está asociada con una neurofisiña distintiva, las cuales forman parte de una molécula precursora, así la neurofisiña I está relacionada con la oxitocina y la neurofisiña II con la vasopresina (Carpenter, 1994).

El núcleo paraventricular recibe información sobre los niveles circulantes de leptina, insulina, glucocorticoides, y glucosa sanguínea, la información sobre la ingesta y absorción de macronutrientes es transportada desde el tracto gastrointestinal pasando por el tallo cerebral, principalmente por el NTS y luego de éste, la información es dirigida al hipotálamo para la liberación de hormonas (Sawchenko y col., 1996). Para responder a esta estimulación, el PVN está organizado para actuar principalmente mediante tres tipos de eferencias: Hipotálamo-neurohipofisiarias, hipofisiotrópicas y neurales (Conn y col., 2000).

Las fibras hipotálamo-neurohipofisarias son neuroendocrinas y se originan desde el cuerpo celular magnocelular y son proyectadas a la pituitaria posterior, desde la cual son liberadas las hormonas oxitocina y vasopresina.

Las fibras hipofisiotrópicas también son neuroendocrinas y se originan desde células parvocelulares en la región periventricular, estas neuronas proyectan a la zona externa de la eminencia media donde liberan sus contenidos de factores hipofisiotrópicos que son llevados por el sistema portal-hipofisario hacia la pituitaria anterior.

Las fibras neurales salen del PVN desde cuerpos celulares de tamaño intermedio y son proyectadas hacia los cuerpos celulares preganglionares autonómicos en la parte baja del tallo cerebral y médula espinal (Sawchenko y col., 1996, Conn y Freeman, 2000).

El núcleo arcuato (ARC) es altamente heterogéneo con diferentes patrones de flujo desde subnúcleos individuales, está localizado en la parte más ventral del tercer ventrículo, cerca de la entrada al receso infundibular y se extiende a la eminencia media, la cual es un área circumventricular, libre de la barrera hematoencéfalica en la que penetran venas del sistema portal hipotalámico-pituitaria. Esta área parece tener dos funciones, ahí son liberados los factores hipotalámicos que regulan la función de la pituitaria anterior y es probable que funcione como una ventana hacia el sistema circulatorio, también se registran los niveles de insulina, leptina y otras hormonas que influyen en la ingesta. Las células de este núcleo contienen dopamina, que es liberada al sistema porta-hipofisario. En la porción ventral del ARC existen neuronas que sintetizan una variedad de neuropéptidos que afectan la ingesta, incluyendo estimulación del neuropéptido Y (NPY) y CART (regulación de transcritos de cocaína, anfetaminas), como se mencionará más adelante. Las neuronas de este núcleo son inmunocitoquímicamente reactivas para la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), hormona β -endorfina (β -END). Por lo tanto, las sustancias químicas del núcleo arcuato desempeñan un papel importante en la regulación de la secreción hormonal de la adenohipófisis (Conn y Freeman, 2000; Lawrence, 1999).

El núcleo ventromedial hipotalámico (VMH) también está implicado en la ingesta y sus neuronas están situadas dorsomedialmente y esta región está recíprocamente conectada al núcleo dorsomedial hipotalámico (DMH), las neuronas del VMH responden a la tasa de utilización de la glucosa, siendo el centro de la saciedad. El DMH está íntimamente conectado a numerosos núcleos del tallo cerebral, incluyendo el NTS, el locus coeruleus, núcleo parabraquial y la médula ventrolateral. En el hipotálamo el DMH está conectado al PVN y al área del hipotálamo lateral (Carpenter, 1994).

El sistema de salida en el control de la ingesta incluye al sistema motor, incluyendo vías finales comunes para el control motor orofaríngeo y de locomoción. El sistema nervioso entérico y el autónomo junto con el eje endocrino-pituitaria podrían ser considerados, ya que ellos modulan significativamente la ingesta (Berthoud y Seeley, 2000).

Diferentes regiones hipotalámicas participantes en el control de la ingesta.

FUNCIÓN	ÁREAS INTEGRADAS
Regulación de la temperatura	Hipotálamo anterior
Estimulación gastrointestinal, control neuroendocrino	Núcleo dorsomedial (Bernardis y Bellinger, 1987)
Control del hambre	Núcleo peritrigonal
Saciedad	Núcleo ventromedial
Reflejos de alimentación	Cuerpo mamilar
Control endocrino, prolactina	Núcleo arcuato
Conducta del apetito y sed	Hipotálamo lateral (Bernardis y Bellinger, 1996)
Liberación de oxitocina	Núcleo paraventricular (Swanson y Sawchenko, 1983)
Liberación de Vasopresina	Núcleo supraóptico (Swanson y Sawchenko, 1983)

Tabla 3. Regiones del hipotálamo implicadas en la regulación de la ingesta de alimento (Guyton y col., 1997).

B. Succión y conducta anticipatoria en crías

Las ratas poco antes del parto, comienzan la construcción del nido. Barnett (1963) afirma que la construcción del nido es una actividad homeostática ya que contribuye a mantener constante la temperatura corporal de las crías. Después del parto, la madre provee un intenso cuidado hacia las crías, les lame el cuerpo, para mantenerlos limpios y activar sus movimientos, como la región anogenital para estimularles la micción y la defecación, ingieren su orina y heces fecales, los acarrea al nido si se alejan y los amamanta frecuentemente (Rosenblatt y Siegel, 1981). Desde 1933 Wiesner y Sheard sugirieron que el desarrollo de este comportamiento parecía estar sincronizado con el nacimiento de las crías, puesto que poco tiempo después del parto las hembras puerperales proporcionaban todo tipo de cuidados maternos a sus crías. Por lo tanto, la madre construye un nido, alumbra, reúne, limpia, y atiende a sus crías bajo la influencia de los niveles cambiantes de las hormonas (Fleming y col., 1999).

A pesar de que las crías nacen sin pelo, con los párpados y el conducto auditivo externo cerrados, pueden detectar el pezón de la madre (Fleming y col., 1999). Porque después de nacer, las crías desarrollan una atracción química hacia el vientre materno y se adhieren a los pezones como consecuencia de la experiencia intrauterina con el líquido amniótico. El reconocimiento de la madre se da por el olor que ella emana (Fleming y col., 1999). Esto es debido a que las hembras producen 2 feromonas para la atracción de la cría, la primera es producida en el ciego de la madre y sale por las heces de la misma, la segunda se produce en la piel del abdomen y ésta estimula a las crías para que succionen el pezón de la madre (Manual de Prácticas, 1980). La estimulación causada por la lactancia provoca que la leche sea expulsada directamente dentro de la boca de las crías. Existen dos tipos de ultrasonidos producidos por las crías: el primero en respuesta al frío, desencadena la actitud de búsqueda por parte de la madre, el segundo en respuesta a un trato brusco de la madre, causa que ésta deje de provocar el estímulo que molesta a la cría.

Así, las crías mueven y levantan sus cabezas dirigiéndolas hacia el vientre de ésta; realizando una búsqueda rápida del pezón y sujetándolo para realizar la succión. El contacto físico entre madre y crías, particularmente el que se da en la lactancia, es el que sigue desencadenando el comportamiento materno (citado por Zubritsky, 1997). La influencia hormonal y la exposición a las crías, hacen que la madre involucre respuestas motoras ante ellas, como el levantarlas, movilizarlas hacia sitios seguros y colocarse sobre ellas (Fleming y col., 1999); además de evitar el hacerles daño (Peters y col., 1991). La sensibilidad hacia las crías aún se mantiene alta, semanas después del destete. La expresión de la conducta materna está determinada por el balance entre el sistema neural excitatorio y el inhibitorio, al final de la gestación y al parto, la balanza favorece al sistema excitatorio en el cual están involucrados el área preóptica medial (APOm) el núcleo de la base de la estría Terminal (NBET) y sus proyecciones eferentes hacia la corteza motora y hacia áreas del tallo cerebral. El sistema inhibitorio, por otra parte, comprende al sistema límbico; bulbos olfatorios, amígdala (parte medial y cortical), corteza cingulada, hipocampo.

El APOm es la más importante área neural involucrada en el inicio y mantenimiento de la conducta materna y es considerada como la vía común final de la expresión de dicha conducta.

En las crías durante la lactancia, la succión es controlada por la distensión gástrica, ya que las crías ingieren tanta leche como sus estómagos se los permiten (Hall, 1990). Esta succión por sí sola involucra la intervención de nervios y musculatura asociada a ella, siendo el más importante el nervio trigémino en la prensión del pezón y succión de la leche en las crías. También está involucrado con la integración de las señales gustativas y gástricas, el apetito y la aversión a los sabores, las cuales son afectadas por lesiones del núcleo del trigémino (Karimnamazi, y col., 2002).

Una de las vías involucrada en la acción de succionar es la del nervio trigéminoespinal.

El nervio trigémino lleva impulsos exteroceptivos (sensibilidad dolorosa, térmica y táctil) que son transmitidos desde 1) la cara y la frente, 2) las mucosas de la

nariz y la boca, 3) los dientes y 4) extensas regiones de la duramadre. Además, se transmiten impulsos en dirección central desde los receptores de estiramiento de los músculos de la masticación.

Así, a la parte caudal del núcleo trigéminoespinal llega la información referente a la succión, ya que esta región posee grandes campos receptores de la frente, mejillas y la mandíbula, la cual podemos decir está involucrada en la acción de succionar (Carpenter, 1994).

C. Neurotransmisores liberados por la vía neural

Como se mencionó previamente, también están implicadas señales hormonales en la regulación de la ingesta. Los neurotransmisores que realizan esta función se dividen en dos clases químicas, una consiste en aminas clásicas y el otro son los neuropéptidos. Estudios recientes han revelado que un número grande de neuropéptidos tienen efectos sobre la alimentación mediante la interacción con receptores específicos en el hipotálamo (Conn y Freeman, 2000).

Dentro de las aminas clásicas están las neuronas catecolaminérgicas, en las que están presentes los neurotransmisores noradrenalina y adrenalina que estimulan la ingesta mediante receptores presentes en la región medial hipotalámica, donde el PVN y el VMH son componentes centrales del circuito noradrenérgico del SNC implicados en la regulación de la ingesta. El efecto estimulador de la noradrenalina sobre el alimento está mediada por receptores α_2 , situados en el PVN y VMH; donde la activación de α_1 -adrenoceptores en el PVN causa la inhibición de la ingesta. La entrada catecolaminérgica al PVN deriva del NTS y médula oblonga ventrolateral (VLM) de la región caudal del tallo cerebral, y las neuronas del NTS y VLM son activadas por la vía vagal aferente y probablemente llevan la información sobre la digestión, así como también los niveles de glucosa en la circulación y la insulina al PVN, VMH y DMH (Conn y Freeman, 2000).

Otro neurotransmisor es la serotonina que es análogo a las catecolaminas, éste es activado en núcleos del hipotálamo, y tiene efecto inhibitorio sobre la ingesta. Las neuronas serotoninérgicas van desde el NTS hacia el hipotálamo en la región lateral, en particular al PVN. Ahí, la serotonina actúa como un factor de saciedad, esta acción podría realizarse por sinergismo con un número de neuropéptidos como el CCK.

En el SNC la histamina es sintetizada en un grupo distinto de neuronas magnocelulares situadas en el núcleo tuberomamilar, este tiene efecto agonista en receptores H1 o antagonista en receptores H3 en el VMH y PVN mediante los cuales suprime la ingesta (Conn y Freeman, 2000).

Otro de los neurotransmisores es el ácido gamma-aminobutírico (GABA) que es uno de los más abundantes en el SNC, varios tipos de receptores a GABA presentes en el hipotálamo tienen efecto inhibitorio. También se ha visto que al inyectar GABA en el VMH incrementa la ingesta. Debido a que GABA está presente en al menos la mitad de las neuronas hipotalámicas incluyendo las que contienen NPY en el ARC, es difícil conocer cuál es el que interviene en la regulación de la ingesta (Conn y Freeman, 2000).

El neuropéptido Y (NPY) tiene el efecto de estimular la ingesta, y la principal vía responsable para inducir la liberación de éste es la proyección ARC-PVN. Las neuronas ARC responden a la reducción de la ingesta aumentando su síntesis de NPY, y también aumenta la liberación de NPY en el PVN. Este núcleo (PVN) recibe inervación de neuronas positivas a NPY desde el tallo cerebral originadas en el locus coeruleus y el NTS, pero este circuito probablemente sirva para otros mecanismos porque no se han encontrado alteraciones en la síntesis de NPY en estas áreas en respuesta al hambre (Conn y Freeman, 2000).

El neuropéptido galanina es importante en la ingesta de grasas, ya que se ha visto que su administración produce una fuerte respuesta a ingerir dietas altas en grasas, lo cual está mediado por la proyección desde el PVN a la eminencia media. Existen 3 tipos diferentes de receptores a galanina que están presentes

en núcleos del hipotálamo relacionados con la ingesta pero es incierto este mecanismo.

También se encuentran péptidos opioides en los cuales la β -endorfina es derivada desde la molécula común proopiomelanocortina (POMC), el cual interactúa con receptores μ , estimulando la ingesta. Así la expresión de POMC en el SNC está restringida al ARC y NTS de los cuales salen proyecciones al PVN.

Las melanocortinas y péptido relacionado agouti (AGRP) influyen en la ingesta. La hormona estimulante de melanocitos (α -MSH), la cual en su forma acetilada inhibe la ingesta. Las melanocortinas derivan del procesamiento post-translacional de POMC y éstas realizan este efecto de inhibición mediante las proyecciones del ARC-PVN, donde el sitio central responsable de la inhibición por las melanocortinas son los receptores hipotalámicos MC4. Las neuronas hipotalámicas del ARC también producen un antagonismo endógeno en el receptor MC4 que lo realiza el AGRP bloqueando la acción estimulatoria de las melanocortinas en receptores MC3 y MC4 y provocando un incremento de la ingesta. En suma, el AGRP provoca un incremento en la ingesta y por consiguiente conduce a la obesidad (Conn y Freeman, 2000).

Otros péptidos que se involucran en la ingesta son las orexinas que están marcadamente elevadas durante el hambre, la hormona melanocortina (MCH) que se encuentra muy elevada en los períodos de hambre y el transcrito regulador de anfetaminas y cocaína (CART) que se descubrió recientemente como un factor de la saciedad, y probablemente tenga un papel importante en la limitación de la duración de la ingesta (Conn y Freeman, 2000).

En la siguiente tabla se muestra un resumen sobre la regulación de la ingesta por los neurotransmisores.

NEUROTRANSMISORES	INGESTA
Catecolaminas	Aumenta
Serotonina	Inhibe
Histamina	Inhibe
GABA	Aumenta
Neuropéptido Y	Aumenta
Galanina	Aumenta
POMC	Aumenta
Melanocortinas	Inhibe
AGRP	Aumenta
Orexinas	Aumenta
MCH	Aumenta
CART	Inhibe

Tabla 4. Control de la ingesta mediante diferentes neurotransmisores. Tomado de Conn y Freeman, 2000.

D. C-fos como marcador de activación neuronal en el SNC

La razón de incluir esta sección es que la detección inmunohistoquímica de la proteína Fos como indicador de activación neuronal es la principal herramienta usada en este estudio.

La expresión de c-fos y otras proteínas es un signo frecuente de activación celular y su detección por inmunocitoquímica o la medida de sus mRNAs, se utiliza para determinar qué células en el sistema nervioso son activadas por un estímulo en particular (Ganong, 1998). Existen dos características de la expresión de c-fos que hacen a este gen de acción temprana una excelente herramienta de mapeo:

1. Los bajos niveles de transcripción de c-fos bajo condiciones basales y
2. Su inductibilidad ante un amplio rango de estimulación transináptica/transcripcional.

En condiciones basales, el RNA mensajero (mRNA) de c-fos y la proteína Fos se encuentran en niveles muy bajos (Hughes y *col.*,1992). En varias regiones cerebrales el mRNA es inducido en un par de minutos después del estímulo y el pico se encuentra entre 30 y 60 minutos. El nivel máximo de la proteína Fos

ocurre entre una y tres horas y desaparece gradualmente del núcleo celular entre 3 y 4 horas después del tratamiento (Chan y *col.*, 1993; Cullinan y *col.*, 1995; Kovacs y Sawchenko, 1996).

El patrón de expresión de Fos es específico para el tipo de estímulo aplicado, por lo que se han hecho investigaciones sobre tareas motoras o hipertermia en ratas, que después del estímulo hay una gran cantidad de neuronas inmunorreactivas a Fos en regiones cerebrales implicadas con esos estímulos y no en otras áreas. Lo anterior pone de manifiesto que las regiones donde la actividad neuronal es detectada, por la expresión de la proteína Fos, dependen del tipo de estímulo aplicado. Por lo tanto, la detección de las proteínas producidas por genes tempranos como c-fos, refleja las regiones neuronales involucradas en el procesamiento neuronal de un estímulo determinado (Kovacs, 1998).

Existe un número de factores que inducen la expresión de c-fos:

1. Factores neurotróficos
2. Neurotransmisores, Neuropéptidos
3. Despolarización
4. Incremento del flujo de calcio y elevación del calcio intracelular e intranuclear.

El gen c-fos y otros genes incluyendo c-jun, junF y zif/268 (erg-1), son fuerte y rápidamente inducidos en respuesta a una variedad de estímulos neurales. Por esta característica se les conoce como genes de respuesta temprana (IEGs, por sus siglas en inglés) y se usaron ampliamente como marcadores en neuroanatomía funcional. Por ejemplo, bajo condiciones sin estimulación c-fos mRNA y proteína Fos casi no son detectadas en algunas células tipo. Sin embargo, estímulos neurales que inducen AMPc, Ca²⁺, proteína C cinasa, Ras/AMP cinasa, producen una rápida y poderosa inducción de la expresión del gen c-fos (Kovacs, 1998).

La falta de expresión y niveles altos de inducción contribuyen a una alta sensibilidad de la inmunohistoquímica para la detección de Fos y más

recientemente la hibridación *in situ* para sus mRNA por lo que éstas son herramientas de gran utilidad para mapear células y circuitos activados por los neurotransmisores, drogas, factores de crecimiento, citoquinas y por daños celulares. El mayor problema con el uso de IEGs para mapear la activación celular son la falta de respuesta de éstos a neurotransmisores inhibidores, la observación de que no todas las células tipo expresan c-fos y que dan sensibilidad a la técnica (Zigmond y col., 1999).

En suma, la detección inmunohistoquímica del producto del oncogen c-fos, se ha utilizado ampliamente como un marcador de actividad neuronal que ocurre en respuesta a una gran variedad de estímulos homeostáticos o sensoriales, por todas las características mencionadas anteriormente (Kovacs, 1998).

E. Regulación neonatal de la ingesta en ratas

En la rata recién nacida, la ingesta es estimulada por la deshidratación e inhibida por la distensión gástrica. En ratas adultas, la expresión de Fos en el tallo cerebral en respuesta a la ingesta de comida o a la distensión gástrica se ha utilizado como un indicador de activación neuronal y se ha encontrado que principalmente se activan neuronas en el NTS y que el nivel de expresión es afectado por la cantidad de comida ingerida o grado de distensión (Fraser y Davison, 1993; Fraser y col.,1995; Rinaman y col.,1998; Willing y Berthoud, 1997).

En ratas alimentadas con comida sólida y en cantidad diferente, así como alimentadas con dieta líquida en distintas concentraciones muestran una activación hasta en un 40% de la expresión de Fos en neuronas catecolaminérgicas en el NTS. Con esto, los autores concluyen que un incremento en la cantidad de comida ingerida induciendo distensión gástrica provoca un aumento de la estimulación vagal aferente y ello incrementa la expresión de Fos en neuronas del NTS, por lo que esta activación sería proporcional al grado de distensión gástrica (Fraser y Davison, 1993; Fraser y col.,1995; Rinaman y col.,1998). Estudios de otro laboratorio han reportado un aumento en la expresión de Fos en el NTS en proporción a la distensión gástrica inducida por una pequeña pelota inflable, lo cual eliminaría señales químicas ocasionadas por el alimento (Willing y Berthoud, 1997). Estos autores

encontraron que neuronas catecolaminérgicas del NTS son activadas por la distensión gástrica sólo cuando aplicaron distensiones repetidas y de gran magnitud (Willing y Berthoud, 1997). Neuronas de la formación reticular también se activan por la ingesta y el nivel de expresión aumenta por la estimulación del circuito oromotor (DiNardo y Travers, 1997).

Si bien la expresión de Fos en respuesta a la ingesta ha sido analizada en animales adultos, poco se sabe acerca de la activación de neuronas del tallo cerebral durante la succión y la ingesta de leche en neonatos.

Reportes recientes han mostrado que la expresión de Fos en el NTS en ratas recién nacidas es similar a la reportada en el adulto después de la ingesta de comida (Hironaka y col., 2000). Esta expresión es más alta en ratas en los días 1 a 7 postparto en comparación con las de 14 días de edad. La inducción de Fos por la distensión gástrica también se manifiesta en la formación reticular medular. Esto es distinto de lo que se ha reportado en el adulto (Rinaman y col., 1998), en el cual esta área está aparentemente relacionada con el gusto (DiNardo y Travers, 1997). Se sabe que ambas regiones cerebrales, el NTS y la región caudal ventrolateral de la médula oblonga, envían proyecciones al hipotálamo, en especial al núcleo paraventricular (Cunningham y Sawchenko, 1991).

Así, otro aspecto relacionado con la regulación de la distensión gástrica incluye a las hormonas neuroendocrinas hipotalámicas, principalmente la oxitocina. Algunos reportes acerca de esto, señalan a la oxitocina como una hormona de la saciedad. En ratas adultas, se ha mostrado que la oxitocina reduce la ingesta de fluidos y alimento (Arletti y Benelli, 1990; Olson y col., 1991), y las neuronas OT se activan por la distensión gástrica y la administración del péptido colecistoquinina (CCK-8) (Rinaman, 1995). En ratas de 10 días de edad, la distensión gástrica dada por la leche de la madre o por solución salina, induce la liberación de OT, sugiriendo con ello que el eje vagal-hipotalámico madura entre los días 2 a 10 de edad (Nelson y col., 1998).

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La vía aferente del tracto digestivo al SNC se conoce y algunos de sus relevos son el NTS, el núcleo parabraquial y algunas áreas hipotalámicas.

La mayoría de los estudios sobre ingesta se han realizado en adultos. Existe poca información acerca de los mecanismos cerebrales de regulación de la ingesta, principalmente en animales recién nacidos. Se desconoce también cuáles poblaciones neuronales están respondiendo a estímulos gástricos y cuál es su maduración durante el desarrollo.

III. HIPÓTESIS

La distensión gástrica y las señales químicas generadas por la ingesta forzada de leche estimulan la vía vagal aferente del tracto digestivo activando neuronas del núcleo del tracto solitario del tallo cerebral en las ratas neonatas. Existe una activación diferencial de las neuronas de estas áreas en respuesta a la distensión o a la sola acción de succionar.

V. OBJETIVOS

A - OBJETIVO GENERAL

Investigar áreas de la región caudal del tallo cerebral activadas por la ingesta de leche en neonatos de 9 y 18 días.

B - OBJETIVOS PARTICULARES

1. Investigar los patrones de la expresión del gen de respuesta inmediata c-fos en las áreas del tallo cerebral inducidos por la distensión gástrica. Principalmente, determinar la activación neuronal en el NTS caudal.
2. Iniciar la caracterización del fenotipo de neuronas activadas en NTS mediante el uso de métodos de doble marcaje, analizando la participación de las neuronas adrenérgicas.

Además del NTS, se analizaron otras áreas del tallo cerebral, como el núcleo caudal del trigémino. También, para la determinación del fenotipo neuronal de las células que responden a la ingesta en el tallo cerebral se hizo el conteo del NTS y de la región ventrolateral de la médula oblonga ya que estas regiones albergan a dos importantes poblaciones adrenérgicas denominadas A2 y A1, respectivamente.

Además, se realizó una exploración visual de las áreas del hipotálamo que se activan por los distintos tratamientos y se incluyen una tabla al final de la sección de Resultados.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

A. Animales

Para el presente estudio se utilizaron 4 crías de ratas Wistar lactantes de sexo indistinto, de 9 y 18 días de edad para cada grupo experimental formado, nacidas en el bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM, Campus Juriquilla. Desde el día 1 posparto, cada madre fue mantenida con una camada de 8 a 10 crías, bajo condiciones de 12 h de luz por 12 h de oscuridad con temperatura controlada a $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, humedad del 40 – 50%, y con agua y comida *ad libitum*. Se usaron crías de etapa predestete ya que estas edades se ubican antes y después del inicio de la ingesta de alimento sólido, y el destete se da a los 21 a 23 días post parto. El protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología de la UNAM, y los animales fueron manejados de acuerdo con los lineamientos de las normas internacionales para el manejo y uso de animales de laboratorio de la National Academy of Sciences 2003.

B. Grupos experimentales

En los experimentos se utilizaron 4 ratas de 9 y 18 días de edad y sexo indiferente, para cada grupo formado. La privación de alimento se hizo por medio de la separación de la madre. Se compararon 4 grupos experimentales diferentes para cada edad (Figura 9):

a) Grupo control (Succión normal):

Se integraron camadas de 8 a 10 crías al día siguiente del parto y permanecieron con la madre sin perturbaciones hasta el día del experimento.

b) Grupo con separación de 6h:

Se separaron las crías 6h de la madre, fueron colocadas en cajas separadas y controlando la temperatura, esto era realizado por la mañana (7:00 h), 6h antes del experimento. Este grupo fue un segundo control para obtener un nivel bajo en la expresión de Fos y para inducir una ingesta alta en las crías.

c) Grupo con separación de 6h y una succión de 5 minutos:

Las crías fueron separadas por 6 h y después se regresaban con la madre para obtener una succión de 5 minutos, al cabo de los cuales eran separadas otra vez. Noventa minutos después eran sacrificadas. Este grupo se realizó con la finalidad de investigar posibles diferencias entre la acción de succionar y la distensión estomacal. En este corto tiempo de succión no se llega a una obtención de leche.

d) Grupo con separación de 6h y una succión de 90 minutos:

Las crías fueron separadas 6h de la madre y colocadas en otra caja controlando la temperatura, después se regresaron con la madre para una succión de 90 minutos y así provocar una distensión gástrica con la ingesta de leche.

En todos los grupos experimentales se disecó el estómago y se pesó. El estómago se extrajo realizando un corte al final del esófago y cercano al cardias, posteriormente se hizo un corte entre el píloro y duodeno.

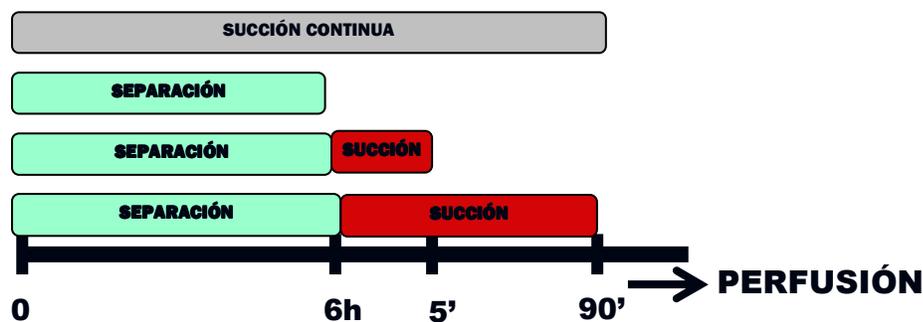
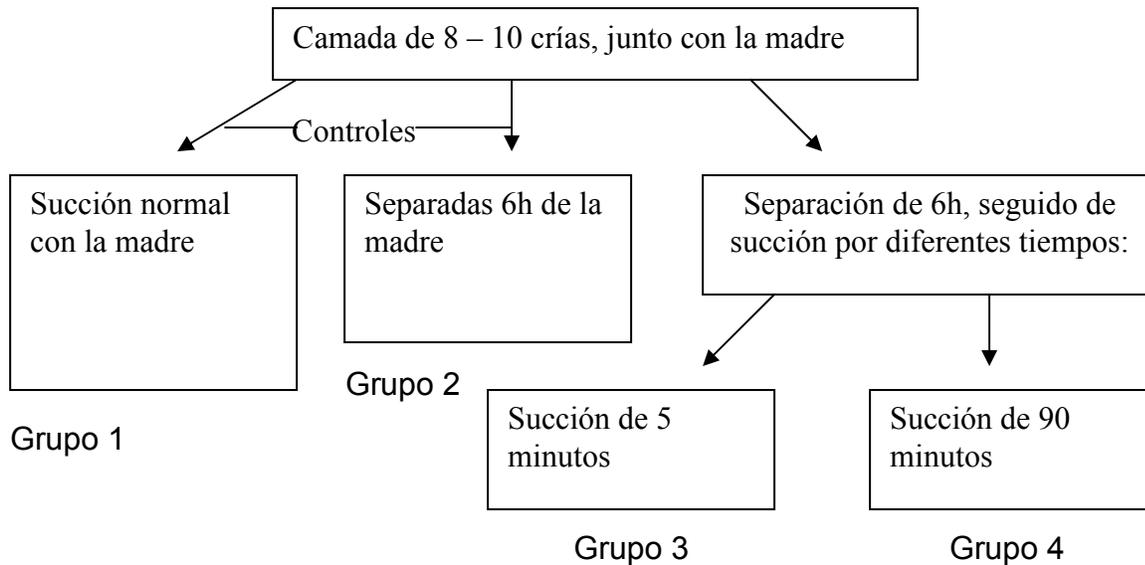


Figura 8. Esquema de los grupos experimentales formados a los diferentes tiempos.

Nota: Todas las crías se sacrificaron a los 90 minutos.

C. Diagrama de flujo de la formación de los grupos experimentales



D. Medición cuantitativa estomacal

A los cuatro grupos de cada edad se les determinó el peso del estómago, mediante su disección en las crías de cada grupo y se registró el peso del mismo, así como también la edad, sexo y peso corporal de las crías.

E. Procesamiento de tejidos e histología

Las crías fueron anestesiadas con hidrato de cloral (35mg/Kg ip), inmediatamente después fueron perfundidas por medio de una cánula intracardíaca con solución salina seguida de 100 ml de una solución de paraformaldehído al 4% en buffer de fosfatos de sodio 0.1M con ácido pícrico al 0.2%.

Los cerebros fueron post fijados durante 24h y crioprotectados en solución de sacarosa al 10% en buffer de fosfatos durante 24h a 4°C. El tallo cerebral y la región hipotalámica fueron obtenidos y cortados en rebanadas coronales de 50 micras de espesor, estos cortes se hicieron en base al atlas de Swanson (Swanson y col., 1992). Los tejidos fueron preservados en solución crioprotectora fría y almacenados a -20°C hasta el procesamiento histoquímico.

F. Inmunohistoquímica

La detección inmunohistoquímica de la proteína Fos se realizó usando un antisuero policlonal (Santa Cruz, California, EUA) purificado por afinidad, inducido en conejo contra un péptido sintético correspondiente a los residuos 4-17 de la porción N-terminal de la proteína Fos humana, el cual no muestra actividad cruzada con cualquier antígeno identificado que esté relacionado con dicha proteína (Sawchenko y col., 1996).

El revelado de la proteína Fos se realizó usando una técnica convencional de peroxidasa asociada con avidina-biotina, ya que da una mayor sensibilidad en términos de la cantidad de marca enlazada al sitio antigénico.

G. Doble inmunohistoquímica

El doble marcaje para Fos y tirosina hidroxilasa (TH) o para otro péptido se realizó localizando primero la inmunorreactividad a Fos usando un protocolo estándar con níquel (coloración negra). A continuación se hizo la incubación en antisuero para TH generado en conejo, en dilución 1:5000 (Pel-freez biologicals) y la identificación de la inmunorreactividad de TH se realizó sin la intensificación con níquel (color café).

H. Tinción de Nissl

Una de las series de tejido colectadas se procesó con la tinción de Nissl para referencia anatómica.

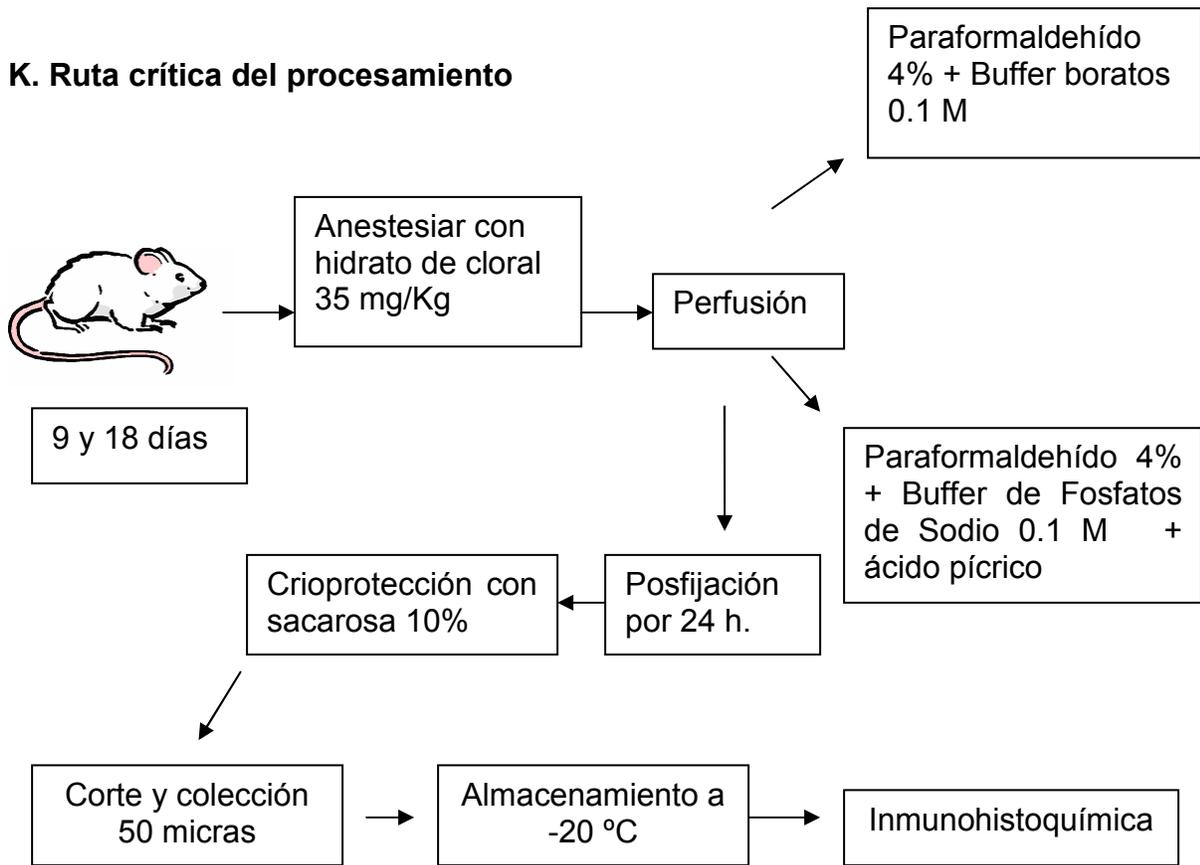
I. Análisis

Se determinaron los niveles relativos de expresión de Fos con el uso de un microscopio y se tomaron fotografías de secciones representativas de las áreas cerebrales que muestran activación, con ayuda del atlas de Swanson (1992) para la localización precisa de nuestras áreas de interés. Se realizó un conteo de células en el sistema digital con el que se dispone en la Unidad de imágenes de esta dependencia universitaria.

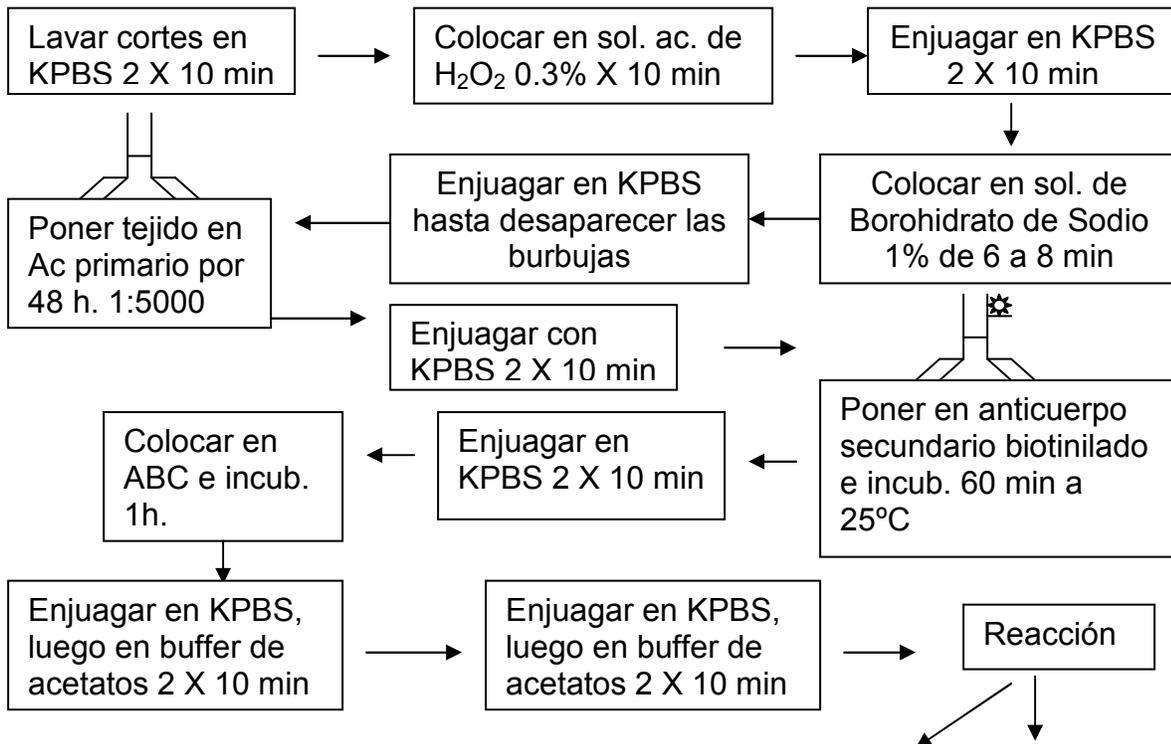
J. Análisis Estadístico

Para analizar las diferencias estadísticas entre los grupos experimentales, los datos fueron procesados con el programa Prisma. Las comparaciones se realizaron con una ANOVA de 1 vía, seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, donde se compara un grupo experimental con otro (grupo 1 vs grupo 2, grupo 3 vs grupo 4). El nivel de significación mínimo fue del $p \leq 0.05$.

K. Ruta crítica del procesamiento



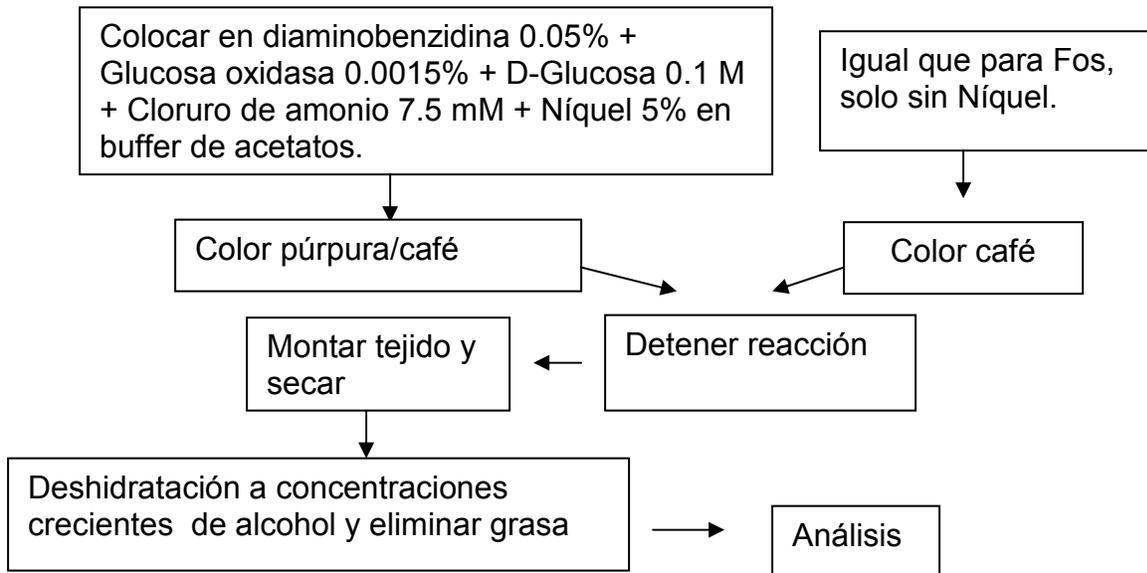
Inmunohistoquímica:



Doble inmunohistoquímica

Fos:

Tirosina-Hidroxilasa:



VII. RESULTADOS

A. Principales áreas del tallo cerebral activadas en respuesta a la distensión gástrica

La inmunohistoquímica para Fos de las secciones coronales del tallo cerebral de las crías de 9 días mostró una señal positiva distinguible del fondo. En las figuras 9 y 11 se presenta un esquema que muestra la localización de la región rostral del NTS y la región caudal respectivamente. La figura 10 muestra la región rostral del NTS en tallo cerebral de los distintos grupos experimentales de las crías de 9 días. En general, la inmunorreactividad a Fos fue escasa en las crías del grupo control, y menor aún en las crías que permanecieron separadas de su madre por 6h. En contraste, en ratas separadas y reunidas para una succión de 90 minutos, se observó un aumento de la expresión de Fos en la parte correspondiente a la región rostral (gustatoria) del núcleo del tracto solitario (NTS). Las ratas de 18 días de edad no mostraron Fos en este nivel del NTS.

En la figura 12, se puede ver la parte caudal del tallo cerebral, correspondiente al área caudal del NTS de los distintos grupos experimentales de las crías de 9 días, la expresión de Fos fue escasa en ratas control, y menor en las crías separadas de sus madres por 6h. En contraste, en ratas separadas y reunidas para una succión de 90 minutos, se observó un intenso aumento de la expresión de Fos en la región caudal del NTS. Mientras que a las crías que sólo se les permitió succionar durante 5 minutos, mostraron una activación menor en la región caudal del NTS y de mayor intensidad en la región caudal del núcleo espinal del trigémino (SPVI).

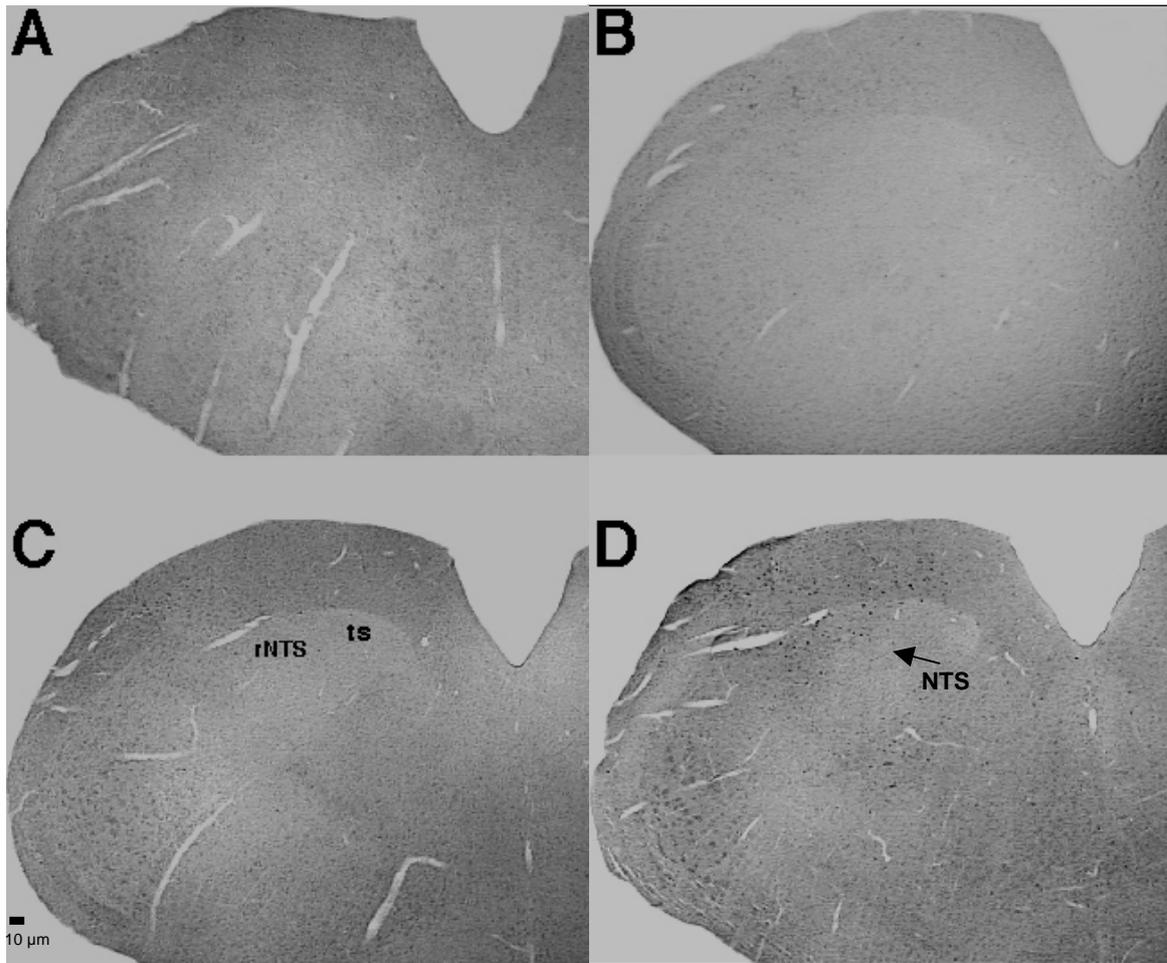


Figura 10. Expresión de Fos en la región rostral (gustatoria) inducida por la distensión gástrica, en crías de 9 días.

Micrografías de tallo cerebral (-12mm caudal a Bregma) en ratas Control (A), Separadas por 6h (B) y reunidas con su madre para una succión de 5 min (C), ó 90 min (D). Amplificación: 100X.

Abrev. *rNTS*: parte rostral del núcleo del tracto solitario; *ts*: tracto solitario.

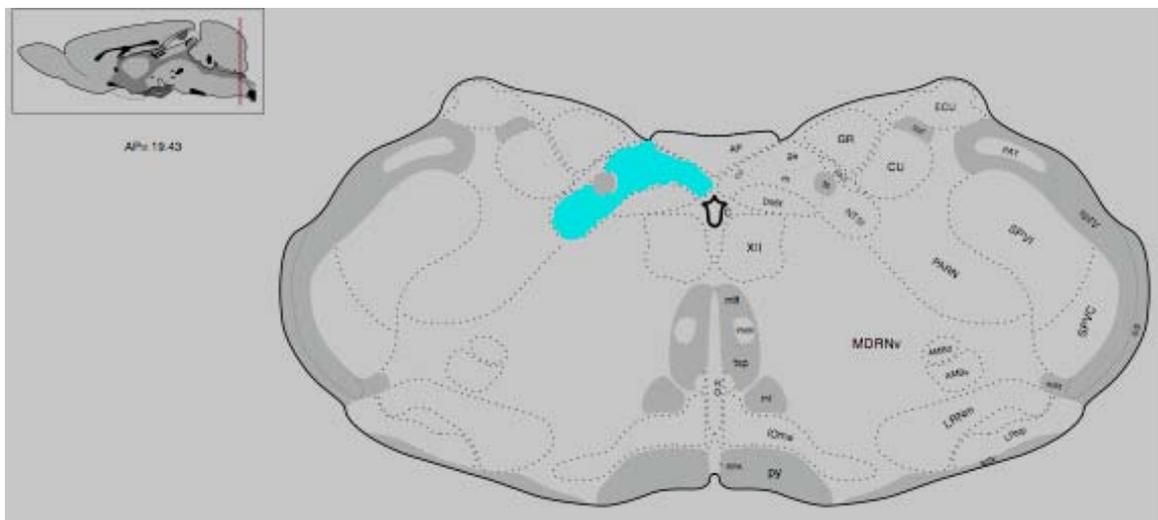


Figura 11. Corte del tallo cerebral en la región caudal que presenta la localización del NTS (color azul). En el recuadro superior izquierdo se muestra el sitio del corte. AP= 19.43, a nivel 69. Tomado del atlas de Swanson (1992).

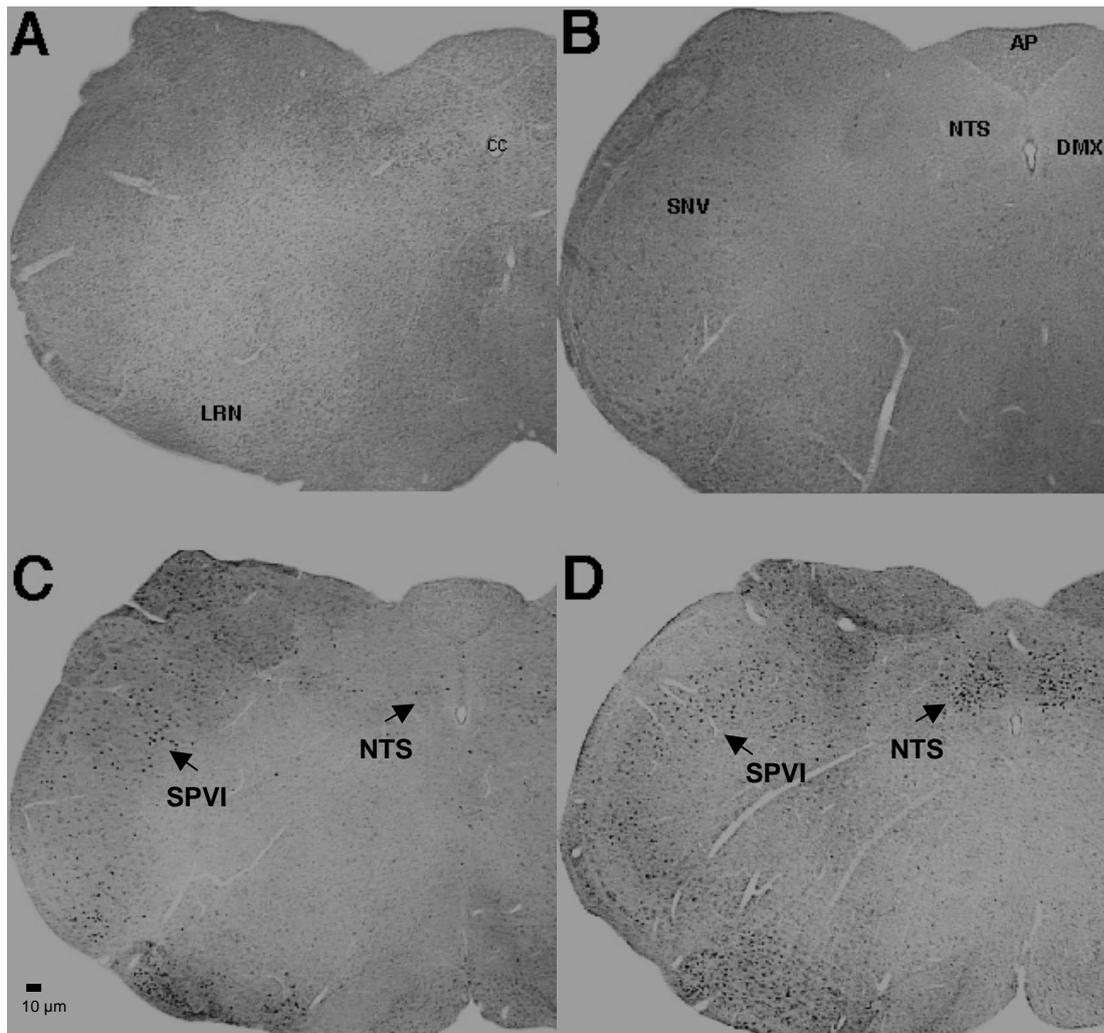


Figura 12. Expresión de Fos en la parte caudal del NTS inducida por la distensión gástrica, en crías de 9 días.

Micrografías de tallo cerebral (-16mm caudal a Bregma) en ratas Control (A), Separadas por 6h (B) y reunidas con su madre para una succión de 5 min (C), ó 90 min (D). Amplificación: 100X.

Abrev. AP: área postrema; cc: canal central; DMX: núcleo dorsal motor del vago; LRN: núcleo lateral reticular; NTS: núcleo del tracto solitario; SNV: núcleo espinal del trigémino.

Con respecto a las crías de 18 días, en el área caudal del NTS, la expresión de c-fos fue escasa en ratas control, así como en las crías separadas 6h de la madre. En las crías que se separaron y reunieron para succionar 90 minutos se observó una intensa activación de la expresión de Fos en la región caudal del NTS, así como en el núcleo espinal del trigémino (SPVI). Finalmente en las crías que solo succionaron 5 minutos, presentaron activación baja en NTS y mayor en el trigémino (Figura 13).

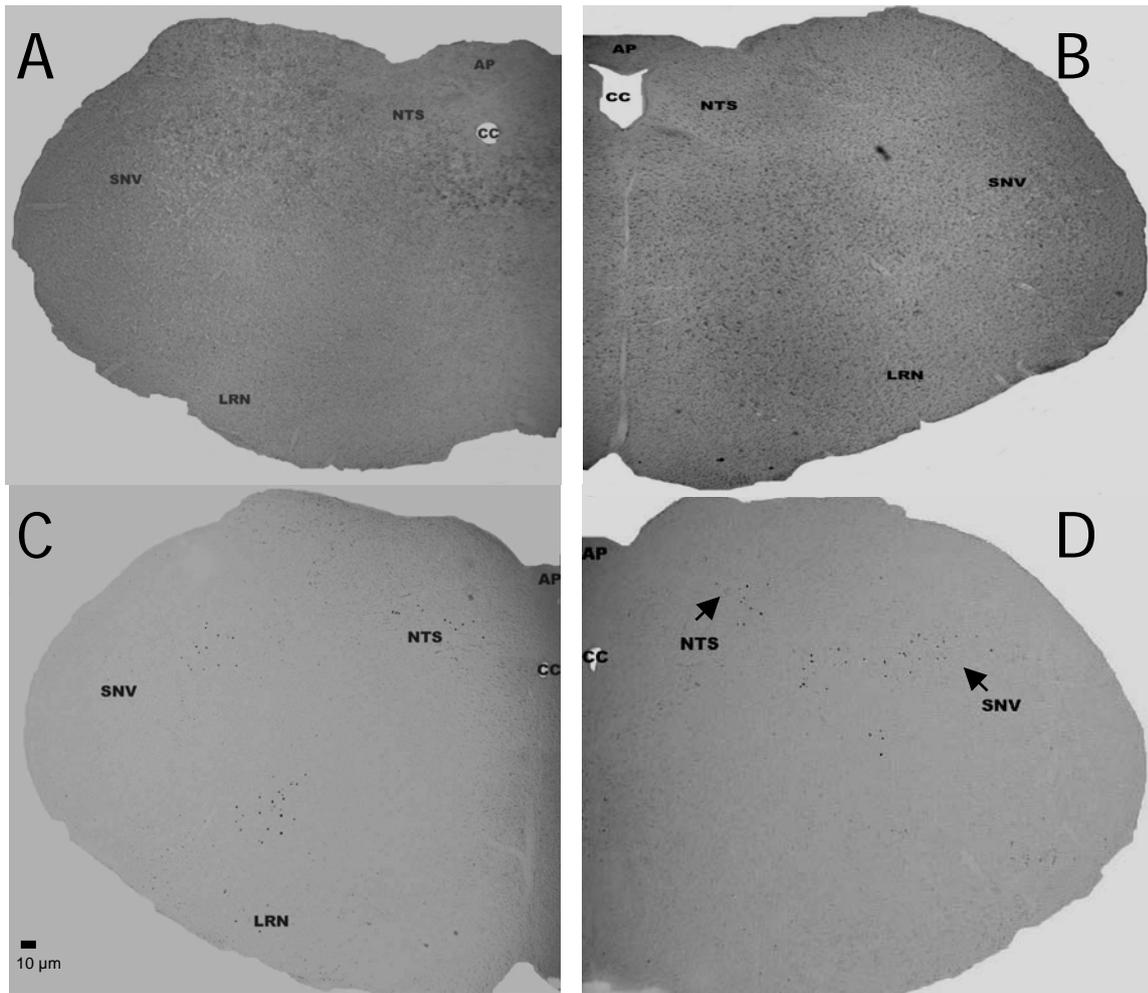


Figura 13. Expresión de Fos en la parte caudal del NTS en tallo cerebral de crías de 18 días.

Micrografías de tallo cerebral en ratas control (A), separadas por 6h (B) y reunidas con su madre para una succión de 5 min (C), ó 90 min (D). Amplificación: 100X.

Abrev. AP: área postrema; cc: canal central; NTS: núcleo del tracto solitario; LRN: núcleo lateral reticular; SNV: núcleo espinal del trigémino.

B. Determinación cuantitativa de la expresión de fos en la región caudal del núcleo del tracto solitario en crías de 9 y 18 días

Se realizó el conteo de los núcleos positivos a Fos en todas las rebanadas de tejido de una de las series colectadas, para cuantificar si había una diferencia significativa entre los grupos experimentales de cada edad. La figura 14 nos indica que el período de separación de la madre, antes de la succión, es importante tanto para el nivel basal de Fos, como para la inducción del mismo. Asimismo, encontramos diferencias significativas entre los grupos experimentales de las crías de 9 días. El análisis estadístico empleado fue el ANOVA de 1 vía.

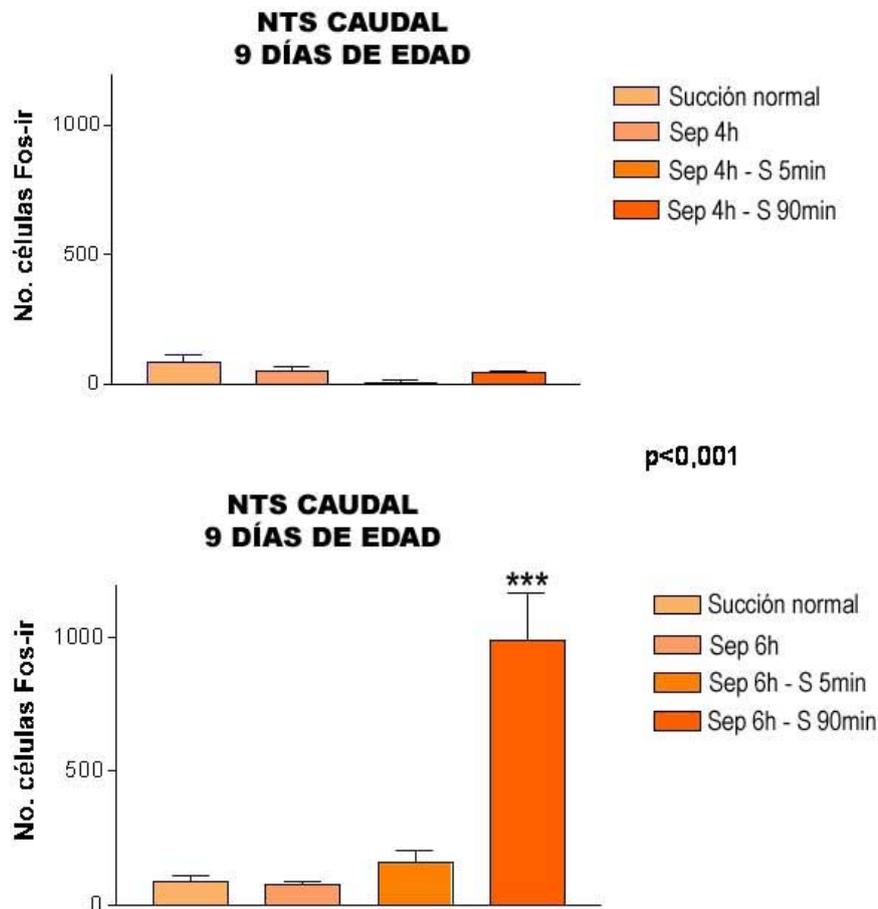


Figura 14. Número de células inmunorreactivas a Fos en la región caudal del NTS, en respuesta a la ingesta de leche en crías de 9 días. Las gráficas muestran los promedios y el E.E. de cada grupo, n= 4. No existen diferencias significativas entre los grupos cuando se separa 4h de la madre, debido a que no hay inducción de fos.

En la figura 15 se muestra el número de células Fos-ir que respondieron a la ingesta de leche, donde podemos observar que en las crías de 18 días en la región caudal del NTS hay diferencia significativa entre el grupo que succionó 90 min y los demás grupos que sirvieron como controles. El análisis estadístico empleado fue el ANOVA de 1 vía.

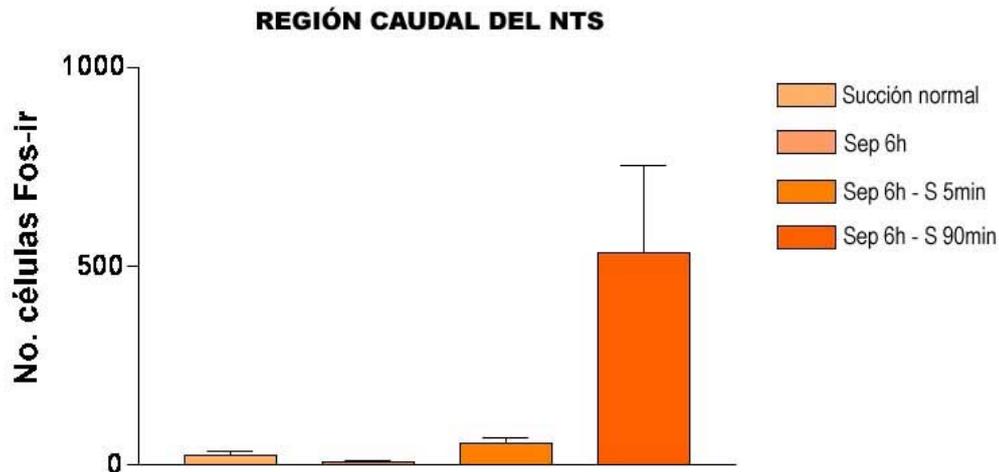


Figura 15. Número de células inmunorreactivas a Fos en la región caudal del NTS, en respuesta a la ingesta de leche en crías de 18 días. La gráfica muestra los promedios y el E.E de cada grupo, n=4. No existen diferencias significativas.

C. Peso promedio de las crías y de los estómagos de cada grupo experimental

Las siguientes graficas muestran los pesos de las crías de 9 y 18 días, en ambas puede verse que el peso incrementa en las crías que succionaron 90 minutos, al igual que los pesos de los estómagos (figuras 16 y 17). Se registró el sexo de las crías para investigar si existía una diferencia en la respuesta y se observó que no había diferencias significativas en la expresión de Fos inducido por la ingesta de leche.



Figura 16. Peso corporal promedio de las crías de 9 y 18 días de edad. La gráfica muestra los promedios y el E.E de cada grupo, n=4. No hubo diferencias significativas entre los grupos.

Los pesos de los estómagos de las crías de 9 y 18 días de edad se presentan en la siguiente figura, donde se ve como aumenta el peso en las crías que succionaron 90 minutos.

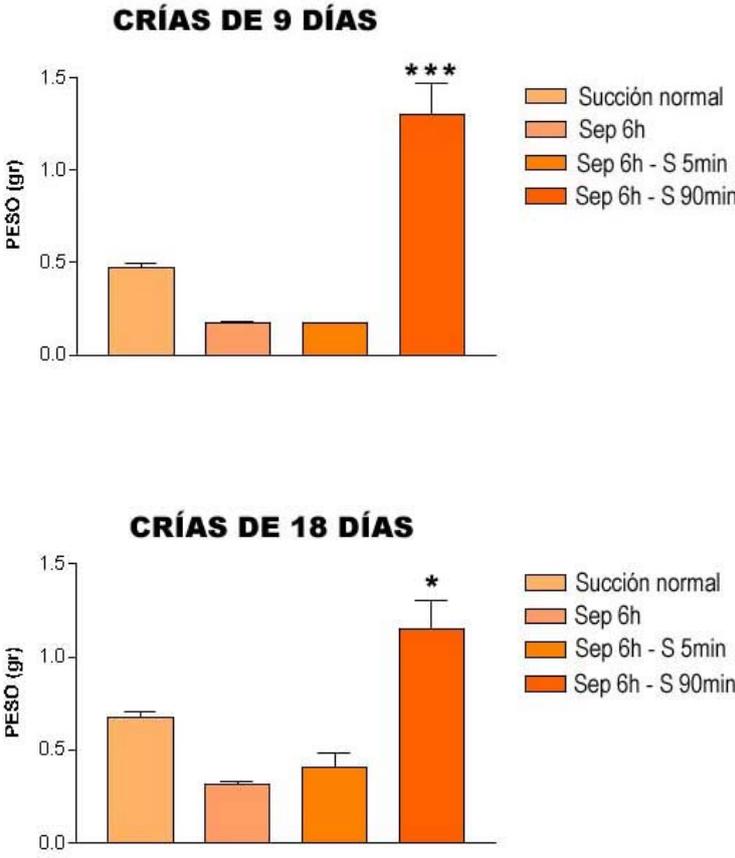


Figura 17. Peso promedio del estómago de las crías de 9 y 18 días de edad. La gráfica muestra también el E.E, n=4.

D. Identificación del fenotipo de las neuronas del NTS activadas por la distensión gástrica

Como se mencionó en la sección de los Antecedentes, en la región caudal del NTS existen varias poblaciones neuronales con fenotipo diferente. Por una parte, están las catecolaminérgicas, que se sabe que expresan norepinefrina y que se localizan principalmente en la parte medial y comisural del NTS caudal. Por otro lado, las neuronas peptidérgicas que se sabe que sintetizan somatostatina, péptido similar al glucagon (GLP-1), inhibina- β y encefalina (Sawchenko y col., 1995) se localizan en la parte lateral del NTS. Otra población de neuronas peptidérgicas localizadas principalmente en la parte medial y comisural del NTS caudal expresan proopiomelanocortina (POMC), que recientemente se ha reportado como un posible mediador y regulador de las señales aferentes y eferentes de la ingesta (Zheng y col., 2005). Como un primer intento de caracterizar el fenotipo de las neuronas que mostraron activación por la distensión gástrica, se realizó una doble inmunohistoquímica para Fos y tirosina hidroxilasa (TH) (Figura 18). Esta enzima participa en la síntesis de las catecolaminas y se usa como un marcador común para la identificación de neuronas catecolaminérgicas.

En la Figura 18 puede observarse la escasa activación de las neuronas TH-ir en el NTS de crías de 9 días. Esto sugiere que la principal población neuronal que se activa por la distensión gástrica en las ratas de esta edad no son de naturaleza catecolaminérgica. Asimismo, en las crías de 18 días la activación de neuronas TH-ir fue escasa en respuesta a la distensión gástrica.

Aparte de estas neuronas, existen otras dos poblaciones principales formadas por neuronas peptidérgicas. Una de ellas expresa somatostatina, péptido similar al glucagon (GLP-1), inhibina- β y encefalina y otra POMC y sus péptidos derivados, y existe la posibilidad de que éstas últimas sean las que se activan por este estímulo. Un análisis mas detallado de este aspecto será objeto de otro estudio.

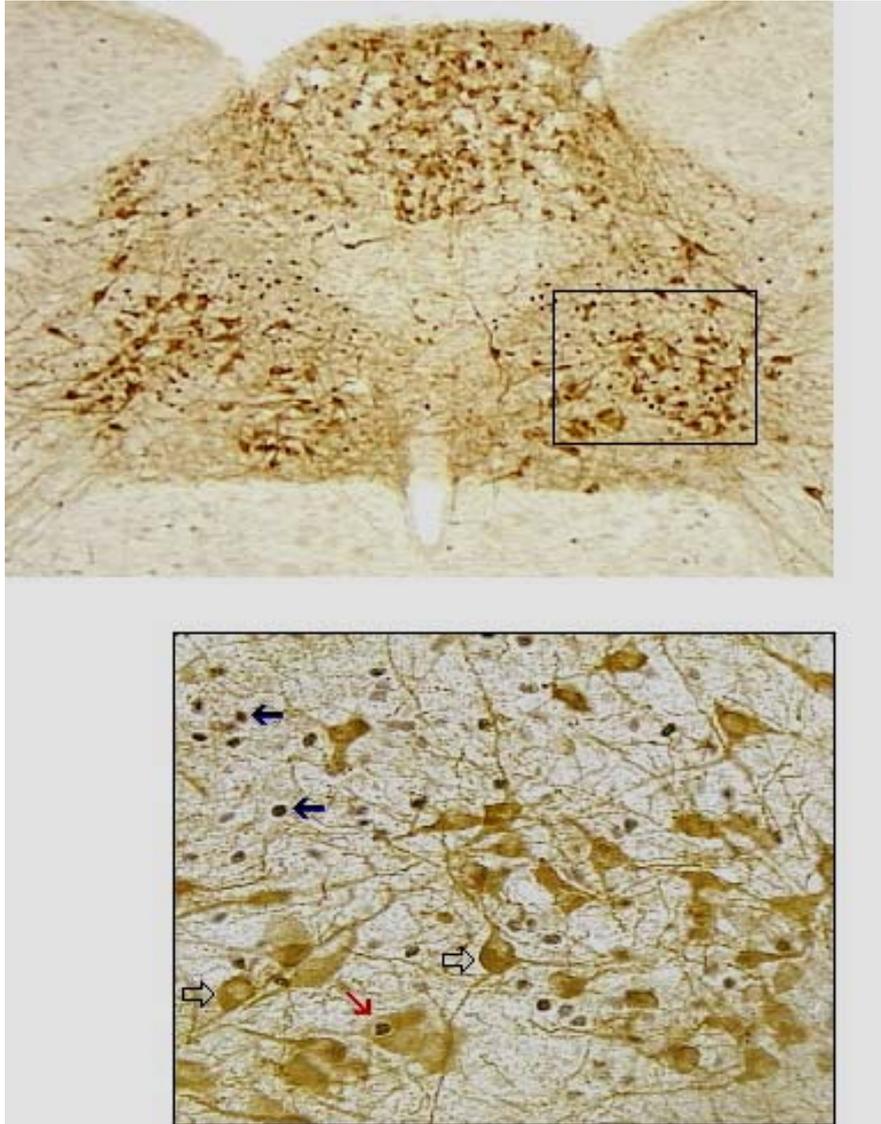


Figura 18. Doble inmunohistoquímica para Fos y tirosina hidroxilasa (TH). Esta micrografía muestra una doble tinción para Fos y TH (arriba). Amplificación: 100X. En la parte de abajo se muestra una mayor amplificación (200X). Las flechas vacías señalan neuronas TH-ir, flechas negras indican inmunorreactividad a Fos y flechas rojas señalan la localización de ambas proteínas.

E. Porcentaje de neuronas inmunorreactivas a Fos y TH.

Se hizo también la determinación cuantitativa del porcentaje de células positivas a tirosina hidroxilasa que son activas (Fos+), para determinar la proporción de neuronas catecolaminérgicas que son activadas en respuesta a la distensión gástrica por la ingesta de leche forzada. La figura 19 muestra los porcentajes obtenidos de neuronas que presentaron el doble marcaje en crías de 9 días y en la figura 20 los porcentajes de las crías de 18 días.

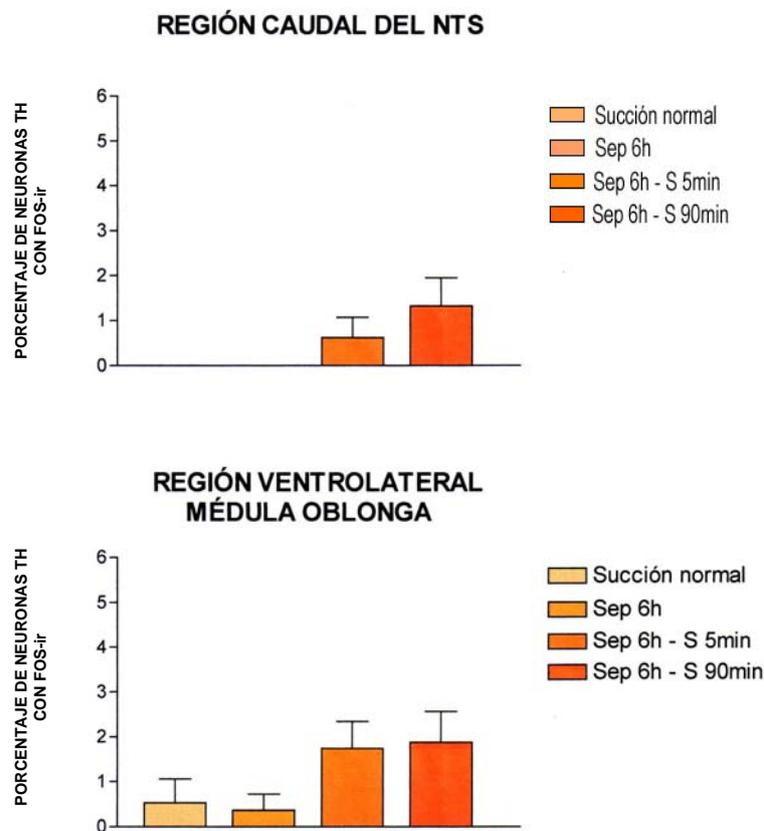


Figura 19. Porcentaje de neuronas inmunorreactivas a Fos y Tirosina Hidroxilasa (TH) en la región caudal del NTS y médula oblonga ventrolateral de crías de 9 días de edad. N= 4. *No hubo diferencias significativas entre los grupos.* Nota: en la grafica de arriba el porcentaje de neuronas con doble marcaje es de cero.

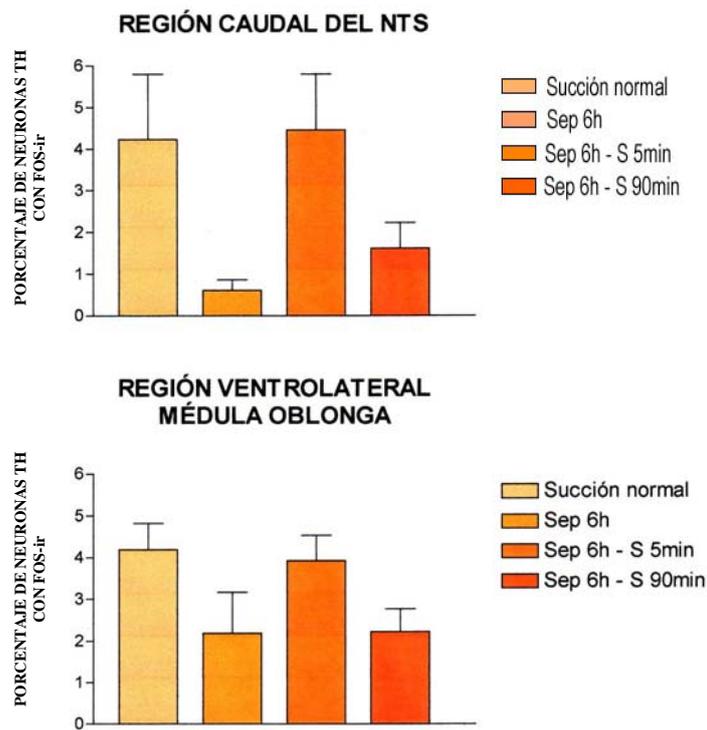


Figura 20. Porcentajes de neuronas inmunorreactivas a Fos y Tirosina Hidroxilasa (TH) en la región caudal del NTS y médula oblonga ventrolateral de crías de 18 días. N= 4. *No hubo diferencias significativas entre los grupos.*

F. Principales áreas del hipotálamo activadas en respuesta a la distensión gástrica

Con respecto a la inducción de la expresión de fos en el hipotálamo por la ingesta de leche, no se ha observado una clara activación en los diferentes núcleos analizados (núcleo supraóptico, paraventricular y arcuato). Los resultados de las crías de 9 días están resumidos en la Tabla 5. Los hipotálamos de las crías de 18 días no presentaron activación en los distintos núcleos.

	NPV	ARH	SO
CONTROL	-	+	+++
SEPARADAS POR 6H	-	-	++
SUCCIÓN 5'	+	++	+
SUCCIÓN 90'	-	++	++

Tabla 5. Expresión de Fos en áreas hipotalámicas inducida por la ingesta de leche.

VIII. DISCUSIÓN

La detección del producto proteínico del gen c-Fos ha sido usada ampliamente como herramienta de mapeo para identificar células y circuitos que son activados en respuesta a varios estímulos. En las neuronas, este gen es expresado alrededor de 30 minutos después del estímulo, teniendo un pico máximo entre 1 y 3 horas, por lo que ha sido muy útil en estudios del campo del estrés (Kovács, 1998). También, en estudios sobre la regulación de la ingesta por el SNC se ha empleado ampliamente (Berthoud, 2004; Chan y col., 1993; Cullinan y col., 1995; DiNardo y col., 1997; Fraser y Davison, 1993; Hironaka y col., 2000; Hughes y col., 1992; Willing y Berthoud 1997; Rinaman y col., 1998) ya sea para determinar el grado de respuesta a la distensión estomacal, a la aplicación de CCK, o a la ingesta de alimento.

En la presente tesis se investigó la expresión de Fos en áreas del tallo cerebral caudal, principalmente en el núcleo del tracto solitario, provocada por la ingesta de leche a mediados y finales de la lactancia. La estrategia experimental usada para inducir deshidratación y hambre en las crías fue la separación materna. Empleamos inicialmente 4 horas de separación, pero no fueron suficientes para tener un nivel basal de Fos que nos permitiera detectar cambios por los tratamientos. La separación por 6h de la madre y sus crías fue el tiempo mínimo adecuado que nos permitió tener un nivel basal bajo y una clara inducción de Fos por la ingesta de leche durante 90 min.

Este protocolo experimental nos pareció más adecuado para el objetivo de este trabajo, ya que en un estudio de otro laboratorio donde se investigaron áreas del tallo cerebral que responden a la ingesta, utilizaron la separación diaria de la madre (tratamiento crónico) y sus crías durante 12 horas, y un período de succión de 3 horas (Hironaka y col., 2000). A pesar de las diferencias de tratamientos, estos autores encuentran que la succión subsecuente a un período de separación, induce la expresión de Fos en el NTS y en algunas áreas de la formación reticular, de manera similar a lo que ocurre en ratas adultas (Hironaka y col., 2000). Sin embargo, ellos observaron activación en algunas áreas, como el área postrema, que no se observó en nuestros animales.

Un aspecto interesante que encontraron Hironaka y col. (2000), fue la disminución de la respuesta dependiendo de la edad de los animales. Nuestros resultados mostraron una tendencia a disminuir la expresión de Fos dependiendo de la edad (este aspecto se discute mas adelante). De esta manera, nuestro diseño experimental nos permitió determinar que esto es un efecto de la edad y no del condicionamiento y de la atenuación de la respuesta que se da cuando un animal se expone repetidamente a un estímulo (Li y col., 1996).

Otro de los factores importantes es la separación maternal, la cual está caracterizada como un estrés en la vida temprana de la rata, indicando que esta interferencia produce cambios en el desarrollo del SNC incluyendo a los sistemas involucrados en la regulación de la respuesta al estrés (Ladd y col., 2000), los estímulos táctiles, olfatorios y auditivos que la madre provee a sus crías durante las primeras dos semanas de vida (Caldji C y col.; 1998). Separaciones de corto tiempo provocan una disminución en la respuesta al estrés (Kalinichev y col., 2001) y estas separaciones entre madre y cría están asociadas con desordenes neuroendocrinos y conductuales (Kuhn y Schanberg, 1998). Sin embargo, éstos son efectos a largo plazo y el efecto de la separación que se usó en nuestro experimento fue agudo y previo al sacrificio.

Este estudio sugiere que el estrés provocado por la separación materna no afectó significativamente nuestros resultados ya que no hubo expresión de Fos en las crías separadas 6 horas de la madre tanto en las crías de 9 días como en las de 18 días. Por esto, podemos suponer que la expresión de Fos en el NTS es provocada principalmente por la ingesta de leche, ya que no se observó en animales que succionaron sólo 5 minutos y que no tuvieron ingesta, aunque no se analizó la expresión de fos en los núcleos amigdalinos relacionados con el circuito del estrés.

Las principales áreas neuronales del tallo cerebral en las que detectamos una diferencia significativa entre los animales que succionaron 90 minutos y el grupo control, fueron la región rostral y la caudal del NTS de las crías de ambas edades. Se sabe que la región rostral del núcleo del tracto solitario recibe la inervación aferente de los botones gustativos, que provienen de los

nervios facial y glossofaríngeo (Figura 21, Carpenter, 1994; Paxinos 1994). La activación presente en la región rostral de las crías que succionaron 90 minutos puede deberse a que en el NTS existen neuronas de segundo orden que responden a estímulos de componentes de la dieta, es decir, son activadas por la presencia de ácidos grasos, carbohidratos, así como por sustancias de los cuatro sabores básicos como dulce, salado, agrio y picoso (Berthoud, 2004), por lo que podemos decir que hubo estimulación probablemente por el contenido lácteo.

A su vez, los estímulos internos generados por la comida después de su ingestión se dividen según los estímulos generados en cada uno de los segmentos del tracto digestivo en pregástrico, gástrico, posgástrico o preabsortivo. Esta expresión de Fos puede deberse a que cada neurona dentro de la red neural es más o menos sensible a las señales químicas que son transportadas a través del tracto digestivo (Berthoud, 2000).

La expresión de Fos en la región caudal del NTS de crías que succionaron 90 minutos puede explicarse porque esta región recibe inervación proveniente del estómago que es activada por la estimulación de los mecanorreceptores a través del nervio vago (Figura 22, Paxinos, 1994; Berthoud y Seely, 2000), debido al llenado gástrico, además de las señales químicas que principalmente es la CCK (Appleyard y col., 2005). Resultados experimentales de otros grupos han concluido que la información proveniente de los nutrimentos y que activan quimiorreceptores son producidos por el intestino y no por el estómago (Phillips y Powley, 1996). También, se ha investigado el efecto de la distensión *per se* y se ha encontrado que provoca activación de neuronas del NTS (Willing y Berthoud, 1997). En nuestros estudios no es posible separar los efectos químicos de los mecánicos de la ingesta de leche.

Estos resultados sobre la expresión de Fos en el NTS pueden indicar que el aumento en la cantidad de comida provocado por la ingesta forzada de leche incrementa la estimulación vagal aferente debido a la distensión gástrica y así activar la expresión de c-Fos en neuronas postsinápticas del NTS. Estudios electrofisiológicos muestran que neuronas del NTS reciben entradas sinápticas desde mecanorreceptores gástricos y que son excitados por la distensión

gástrica (Cann y col., 1992), mostrando que los resultados obtenidos son debido al llenado gástrico provocado la ingesta forzada de leche.

Uno de los aspectos más interesantes y que puede relacionarse con el desarrollo, es que las crías de 18 días de edad, que succionaron 90 minutos después de 6h de separación, presentaron una clara expresión de Fos en el NTS, aunque de menor magnitud en comparación con las de 9 días. La obtención de estos resultados concuerdan con los estudios hechos en crías de 1,3,5,7 y 14 días, donde encuentran mayor expresión de Fos en el NTS en las crías de 1,3,5 y 7 días que succionaron por 3h después de la separación de 12h, y en las crías de 14 días no hubo diferencias con respecto a las controles (Hironaka y col., 2000). Estos autores proponen que esta disminución se debe a un cambio durante el desarrollo de las señales inducidas por la ingesta de leche. Sin embargo, por el protocolo de separación y succión diaria empleada por ellos no era posible definir si este era un fenómeno natural o efecto del condicionamiento por la comida (Escobar y col., 2005) y atenuación de Fos por la exposición repetida a un estímulo (Kovács, 1998).

Esta modificación en la intensidad de la respuesta puede también deberse a la transición del período de succión a la ingesta de sólido que ocurre entre los días 9 y 15 de edad (Rinaman y col., 1998). Posiblemente, la menor activación de Fos en las crías de 18 días se debe a que las crías ya ingieren comida sólida en combinación con leche materna, y la leche acumulada durante 6h y la ingerida en los 90 minutos empleados en nuestro experimento no son suficientes para que se lleve a cabo el llenado gástrico y la distensión. Por lo que en este caso se requeriría de un tiempo mayor de separación de la madre para favorecer una mayor acumulación de leche ya que los estómagos de estas crías (18 días) son más grandes, lo cual se refleja en el peso estomacal registrado.

Otro posible factor en este fenómeno es la frecuencia de succión. Las crías de 9 días presentan mayor frecuencia de succión y las de 18 días es menor, ya que empiezan a consumir sólido (Knobil y Neill, 1994). Esto podría ser un factor interesante de analizar, así como la intensidad de la succión por las crías.

Los pesos corporales obtenidos de cada cría mostraron que no hubo diferencias relacionadas con el sexo del animal. Tampoco observamos una diferencia en la expresión de Fos dependiente del sexo, aún cuando hay reportes de variaciones de este tipo en la rata. Como vimos, los pesos corporales como los de los estómagos se comportan igual ya que aumentan en las crías que succionaron los 90 minutos para la obtención del llenado gástrico, tanto en las crías de 9 días como en las de 18 días.

La escasa expresión de Fos en el NTS en crías que succionaron 5 minutos puede deberse a que no hay evacuación de leche en ese lapso de tiempo. Sin embargo, dado que las ratas tenían una separación de 6h pudo existir una mínima expulsión de leche, por lo que en este lapso de tiempo se pudieron activar algunos mecanorreceptores en el estómago y por esto se observa una expresión de Fos menor en esa zona.

Un aspecto interesante que encontramos fue la activación del área del núcleo del trigémino, ya que se observó en animales que succionaron 5 ó 90 minutos. Se sabe que esta área está relacionada con la inervación de los músculos de la boca, específicamente de la mandíbula y de la lengua (Purves y *col.*, 1997). Es posible que esto refleje la actividad de esos músculos en los animales que succionaron solamente por 5 minutos.

También esta activación en el núcleo del trigémino puede deberse a que este nervio es considerado el tercer sistema quimiosensitivo, cuyas fibras son activadas por sustancias químicas clasificadas como irritantes. Los receptores polimodales sensibles a las sustancias irritantes alertan al organismo de los estímulos químicos nocivos que han sido ingeridos, respirados o que han entrado en contacto con el rostro y está ligado íntimamente al sistema trigeminal (Cann y Rogers, 1992).

Asimismo, la información quimiosensitiva proveniente del rostro y de las membranas mucosas de las cavidades oral y nasal es transmitida a través de las tres ramas sensitivas mayores del nervio trigémino: oftálmica, maxilar y mandibular, siendo el blanco central de estos componentes el núcleo trigémino espinal, que transmite esta información hasta el núcleo ventroposteromedial del tálamo y desde allí hasta la corteza somatosensitiva (Carpenter, 1994; Paxinos,

1994). Por lo tanto, la expresión observada en el núcleo del trigémino espinal en las crías que succionaron 5 minutos y 90 minutos pudo ser por el olfato al momento de localizar el pezón de la madre, ya que muchos compuestos clasificados como sustancias irritantes también pueden ser reconocidos como olores o gustos, sin embargo, las concentraciones umbrales para la quimiosensibilidad trigeminal suelen ser mucho mayores que aquéllas para el olfato o el gusto.

Finalmente, otro aspecto interesante es la identificación del fenotipo neuronal del NTS que se activa por la distensión gástrica. Al respecto, existe un reporte en ratas adultas donde se muestra que neuronas catecolaminérgicas del NTS se activan en relación directa con la cantidad de llenado gástrico (Rinaman y col., 1998). El porcentaje de neuronas catecolaminérgicas que se activan por la ingesta de alimento o por la distensión gástrica en ratas adultas varía entre los autores y va desde el 40 hasta el 10% (Rinaman y col., 1998; Willing y Berthoud, 1997).

Las neuronas que se activan son las correspondientes al área A2 del grupo de células catecolaminérgicas, siendo mayor la activación cuando la dieta es líquida (Rinaman y col., 1998). Estos autores proponen que estas neuronas constituyen la principal vía ascendente a través de la cual la información sensorial vagal alcanza centros autonómicos, neuroendocrinos en el hipotálamo.

En cambio, nuestros resultados muestran que en ratas neonatas, las neuronas que se activan por la distensión gástrica no son de naturaleza catecolaminérgica. La evidencia obtenida por la doble inmunodetección de Fos y TH mostró una ubicación distinta de estos marcadores y también, solo el 1% de las neuronas catecolaminérgicas se activó por el estímulo en ambas edades. Este hallazgo sugiere que este fenotipo neuronal aún no ha madurado. En apoyo a ésto, existe un reporte acerca de la maduración de la inervación catecolaminérgica del hipotálamo durante el desarrollo de la rata y se ha encontrado que estas neuronas tienen cambios significativos durante las primeras tres semanas del desarrollo postnatal (Rinaman, 2001). Se sabe que estas neuronas proyectan desde los grupos celulares A1, C1, A2/C2, C3 y C6

en el tallo cerebral hacia el encéfalo, principalmente al PVN. En el citado reporte encuentran que las fibras con inmunoreactividad positiva a dopamina β-hidroxilasa, localizadas en el PVN, son escasas en crías y que la inervación del PVN se incrementa gradualmente en adultos. También muestran que neuronas positivas a phenylethanolamina-N-metyltransferasa (PNMT) en C1, C2 y C3 proyectan al PVN tanto en crías como en adultos y el número de estas es similar en ambos casos. Ellos reportan que al final de la segunda semana de vida, la densidad de fibras de norepinefrina y epinefrina en el PVN alcanzan solamente el 64% y 67% de los niveles en adultos (Rinaman, 2001). Por otro lado, existen reportes que muestran una correlación positiva entre el peso del estómago y el porcentaje de activación catecolaminérgica en el NTS en adultos (Rinaman y col., 1998); así como también hay relación entre distensión gástrica y activación de Fos en neuronas catecolaminérgicas en el NTS. En contraste con esto, existen estudios donde se reporta una activación menor de las neuronas catecolaminérgicas del NTS, al introducir un globo para provocar la distensión gástrica (Willing y Berthoud, 1997) obteniendo así la activación de un 10% de las neuronas. Por lo que podríamos decir que estas neuronas en las crías no son las que se activan en respuesta a la ingesta forzada de leche a pesar de que se sabe que la CCK, que es un inhibidor de la ingesta, activa a las células catecolaminérgicas en las áreas A1 y A2 (Ueta y col., 2000). Esto nos dice que cuando hay llenado gástrico se lleva a cabo la liberación de CCK que provocará la inhibición de la ingesta y con ello la activación de neuronas catecolaminérgicas, pero en nuestros resultados no hubo esta activación, es por ello que decimos que estas neuronas no son activadas por la ingesta forzada de leche, ya que vimos que existe llenado gástrico pero esta vía aún no es activada.

También cabe mencionar que la expresión de Fos y TH en las crías de 18 días utilizadas en nuestro trabajo, mostró un porcentaje más elevado, pero sin diferencias entre los grupos. Esto puede deberse a que a esta edad las crías son más inquietas por lo que su ritmo respiratorio está elevado y las neuronas catecolaminérgicas son activadas en respuesta a este estímulo.

Considerando estos datos podemos decir que las neuronas que podrían estarse activando serían neuronas positivas al péptido POMC y neuropéptido Y, los cuales son localizados en esta área del NTS estudiada en este trabajo de

tesis. Este resultado, junto con la localización de las neuronas positivas a POMC reportada por otros (Zheng y col., 2005), abre la posibilidad de que sea este sistema el que se encuentra encargado de regular la ingesta en etapas tempranas, ya que la ingesta, junto con el olfato es una de las funciones más desarrolladas en el animal recién nacido. Es posible especular que a medida que se van desarrollando otras poblaciones neuronales se va haciendo más compleja la organización de los circuitos encargados de la ingesta de alimento y líquidos.

Es importante mencionar que el hipotálamo juega un papel importante en la regulación de la ingesta, en el cual están involucrados varios núcleos, principalmente el PVN. Se ha propuesto que la ingesta induce la liberación de oxitocina (Guyton, 1997, Conn y Freeman, 2000). Esta hormona se le ha determinado que es importante para la saciedad, sin embargo, otros autores han reportado que no es liberada en estas condiciones. Un grupo que realizó la estimulación eléctrica del nervio vago a nivel gástrico observó que había un incremento en el plasma de los niveles de oxitocina y que era estimulada la liberación de noradrenalina en el PVN de la rata (Ueta y col., 2000).

Se han cuantificado los niveles de oxitocina en plasma de ratas de 10 días en respuesta a la distensión gástrica y se encontró que los niveles aumentan en respuesta a este estímulo (Nelson y col., 1998). También se han visto en otros estudios que en ratas de 2 días de edad las células oxitocinérgicas no son activadas por la colecistoquinina-8 (CCK-8) (Nelson y col., 1998).

Observaciones hechas en el hipotálamo de los animales empleados en los experimentos no mostraron diferencias en la expresión de Fos por la ingesta de leche. Por esta razón decidimos enfocarnos a la parte caudal del NTS y ver las diferencias que hay entre una edad y otra, y proponer que posiblemente en esta etapa la vía vagal aferente está aún en fase de desarrollo.

En las figuras 21 y 22 se muestra de una manera general los resultados obtenidos, donde los esquemas representan la región rostral y caudal del NTS respectivamente, observándose que a la región rostral llega información proveniente de las papilas gustativas y que a la región caudal llega información

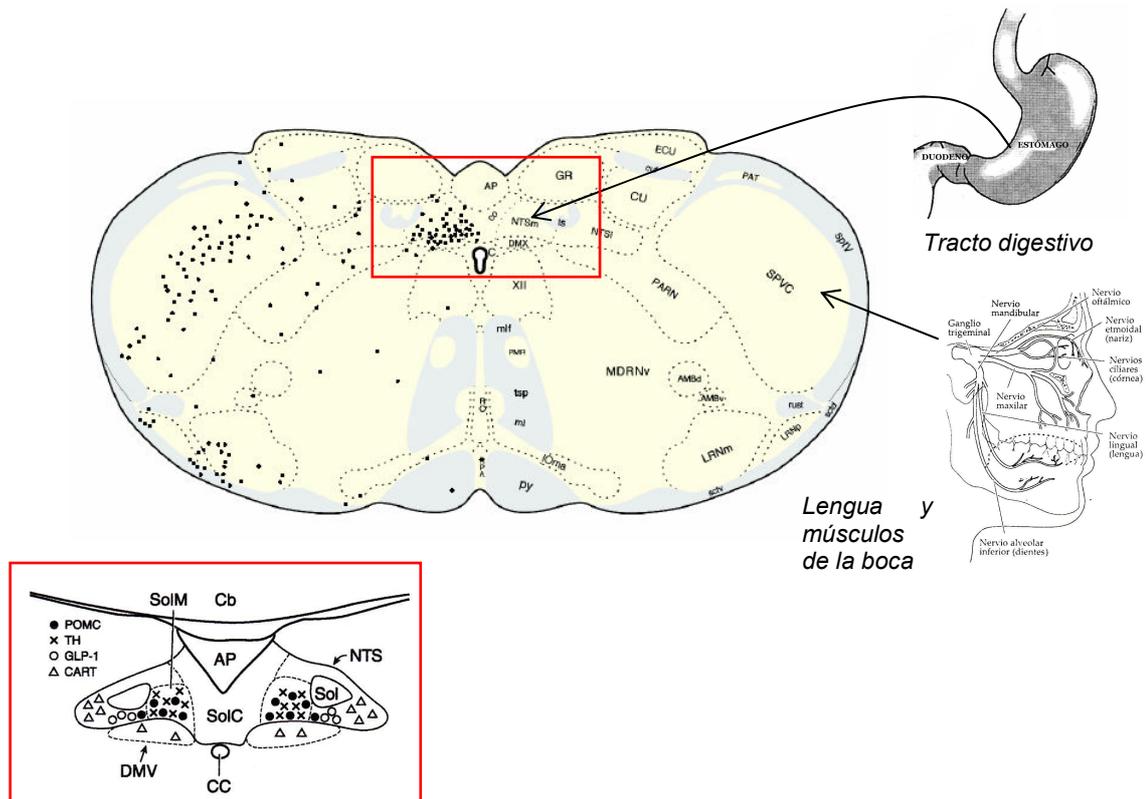


Figura 22. Integración de los resultados obtenidos en la región caudal del NTS. En el lado izquierdo del esquema se observa la expresión de fos en el NTS como en el núcleo del trigémino espinal (SPVC) del grupo separado 6h y reunido con la madre para una succión de 90 minutos. En el lado derecho del esquema se muestra que la expresión de fos en el NTS es debida a que este núcleo recibe información proveniente del tracto digestivo y que por lo tanto es por la distensión gástrica provocada por la ingesta forzada de leche, y la expresión de fos en el SPVC es debida a que este núcleo recibe información proveniente de la inervación de los músculos de la boca, así como también de la lengua.

La parte inferior izquierda muestra la parte marcada por el cuadro rojo, donde se observa el fenotipo neuronal que existe en el NTS, como son las neuronas catecolaminérgicas, POMC, GLP-1 y CART, lo que nos indica que posiblemente las neuronas que responden a la distensión gástrica provocada por la ingesta de leche sean las positivas a POMC.

IX. CONCLUSIONES

1. La expresión de Fos en el NTS de crías de 9 y 18 días es similar a la reportada en el adulto y a estudios previos de otro laboratorio.
2. Esta expresión de Fos es afectada por la cantidad de comida ingerida, y por la edad de las crías.
3. La activación del área del núcleo del trigémino, en animales que succionaron solo 5 minutos puede estar relacionada con la inervación de los músculos de la boca, específicamente de la mandíbula y de la lengua.
4. El 1% de neuronas catecolaminérgicas expresaron Fos en respuesta a la distensión gástrica, se ha encontrado que neuronas catecolaminérgicas del NTS son activadas por la distensión gástrica sólo cuando se aplican distensiones repetidas y de gran magnitud.
5. Sin embargo, se ha observado en ratas adultas alimentadas con comida sólida y en cantidad diferente, así como alimentadas con dieta líquida en distintas concentraciones muestran una activación de la expresión de Fos en neuronas catecolaminérgicas en el NTS hasta en un 40%.
6. Concluimos que esta población neuronal podría estar madurando entre las edades empleadas.
7. Aunque el hipotálamo es importante en la regulación de la ingesta, en los experimentos realizados no hubo expresión de Fos en el NPV y ARH en respuesta a la distensión gástrica.
8. La definición de un diseño experimental así como la determinación de que el fenotipo de las neuronas activadas por la ingesta no es de naturaleza catecolaminérgica en las ratas neonatas, resulta muy relevante ya que amplía el conocimiento fundamental de la fisiología digestiva.

X. REFERENCIAS.-

Appenzeller O y Oribe E. (1997). The Autonomic Nervous System. Elsv Sci B.V. Amsterdam 303-330.

Appleyard S. A, Bailey T.W, Doyle M.W, Jin Ho-Y, Smart J.L, Low M.J. y Andresen M.C. (2005). Proopiomelanocortin neurons in nucleus tractus solitarius are activated by visceral afferents: Regulation by cholecystokinin and opioids. *J of Neurosci* **25** (14), 3578-3585.

Arletti R., Benelli A. y Bertolini A. (1990). Oxytocin inhibits food and fluid intake in rats. *Physiol and Behav* **48**, 825-830.

Bernardis L. y Bellinger L.L. (1987). The dorsomedial hypothalamic nucleus revisited: 1986 update. *Brain Research Rev* **12**, 321-381.

Bernardis L. y Bellinger L.L. (1996). The lateral hypothalamic area revisited: Ingestive behavior. *Neurosci Biobehav Rev* **20**, 189-287.

Berthoud HR. y Seeley RJ. (2000). Neural and metabolic control of macronutrient intake. Boca Raton, CRC Press LLC. 361-383.

Berthoud HR. (2004). Mind versus metabolism in the control of food intake and energy balance. *Physiol and Behav* **81**, 781-793.

Caldji C, Tannenbaum B, Sharma S, Francis D, Plotsky PM, y Meaney MJ. (1998). Maternal care during infancy regulates the development of neural systems dieting the expression of fearfulness in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 5335–5340.

Campfield LA. (1997). Metabolic and hormonal controls of food intake. *Appetite*; **29**, 135-152.

Cann M.J y Rogers R.C. (1992) Impact of antral mechanoreceptor activation on the vago-vagal reflex in the rat: functional zonation of responses. *J. Physiol* **453**, 401-411.

Carpenter MB. (1994). Fundamentos de Neuroanatomía. 4ta. ed. Buenos Aires, Argentina: Panamericana S.A. 120-148 y 176-180.

Chan RKW, Brown ER, Ericsson A, Kovács KL y Sawchenko PE. (1993). A comparison of two immediate-early genes, c-fos and NGF1-B, as markers for functional activation in stress-related neuroendocrine circuitry. *J of Neurosci* **13**, 5126-5138.

Conn Michael P. y Freeman E. Marc. (2000). Neuroendocrinology in physiology and medicine. Totowa, New Jersey, Humana Press Inc. Cap. 19. 335-352.

Cullinan WE., Herman JP., Battaglia DF., Akil H. y Watson SJ. (1995). Pattern and time course of immediate-early gene expression in rat brain following acute stress. *Neurosci* **64**, 477-505.

Cunningham ER. y Jr. Sawchenko PE. (1991). Reflex control of magnocellular vasopressin and oxytocin secretion. *Trends in Neurosci* **14**, 406-411.

DiNardo LA. y Travers JB. (1997). Distribution of Fos-like immunoreactivity in the medullary reticular formation of rat after gustatory elicited ingestion and rejection behaviors. *J of Neurosci* **17**, 3826-3839.

Elmqvist J.K., Elias C.F. y Saper C.B. (1999). From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron* **22**, 221-232.

Escobar C., Angeles-Castellanos M., Mendoza J. y Díaz M. Food entrainment modifies the c-Fos expression pattern in brain stem nuclei of rats (2005). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* México **288**, R678–R684.

Fleming O.S., O'Day D.H. y Kraemer G.W. (1999). Neurobiology of mother infant interactions: experience and central nervous system plasticity across development and generations. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **23**, 673- 685.

Fraser KA y Davison JS. (1993). Meal-induced c-fos expression in brainstem is not dependent on cholecystokinin release. *Am. J. Physiol* **265**, 235-239.

Fraser KA., Raizada E. y Davison JS. (1995). Oral-pharyngeal-esophageal and gastric cues contribute to meal-induced c-fos expression. *Am. J. Physiol* **268**, 223-230.

Ganong F MD. (1998). Fisiología Médica. 16a ed. México, D.F, El manual moderno S.A de C.V. 25-27, 210-225.

Guyton A. y Hall J.E. Ph.D. (1997). Tratado de Fisiología Médica. Nueva York, Interamericana Mc Graw-Hill. 814-816, 835-840 y 871-876.

Hall WG. (1990). The ontogeny of ingestive behavior: Changing control of components in the feeding sequence. Plenum, New York. En: Handbook of Behavioral Neurobiology, Vol. **10**, 151-182.

Hironaka S., Shirakawa T., Shima T., Kinoshita K y Oguchi H. (2000). Feeding-induced c-fos expression in the nucleus of the solitary tract and dorsal medullary reticular formation in neonatal rats. *Neurosci Letters* **293**, 175-178.

Hughes P., Lawlor P. y Dragunow M. (1992). Basal expression of Fos, Fos-related Jun and Krox 24 proteins in rat hippocampus. *Molecular Brain research* **13**, 355-357.

Kalinichev M., Easterling KW. y Holtzman SG (2001). Early neonatal experience of Long-Evans rats results in long-lasting changes in morphine tolerance and dependence. *Psychopharmacology (Berl)* **157**, 305–312.

Karimnamazi H., Travers SP. y Travers JB. (2002). Oral and gastric input to the parabrachial nucleus of the rat. *Brain Res* **957**, 193-206.

Knobil E y Neill J.D. (1994). The physiology of reproduction. En J.B Wakerley, G. Clarke and J.S. Summerlee (Eds.), *Milk ejection and its control*. New York: Raven Press. 1131-1177.

Kovács KJ. y Sawchenko PE. (1996). Sequence of stress induced alteration in indices of synaptic and transcriptional activation in parvocellular neurosecretory neurons. *J of Neurosci* **16**, 262-273.

Kovács KJ. (1998). C-fos as a transcription factor: a stressful review from a functional map. *Neurochem Inter* **33**, 287-297.

Kuhn CM. y Schanberg SM. (1998) Responses to maternal separation: mechanisms and mediators. *Int J Dev Neurosci* **16**, 261–270.

Ladd CO., Huot RL., Thivikraman KV., Nemeroff CB., Meaney MJ. y Plotsky P. (2000). Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience. En: *The Biological Basis for Mind Body Interactions*, edited by Mayer EA and Saper CB. Amsterdam: Elsevier, p. 81–103.

Lawrence C.B., Turnbull A.V. y Rothwell N.J. (1999). Hypothalamic control of feeding. *Current Opinion in Neurobiology* **9**, 778-783.

Lee M.C., Schiffman S.S. y Pappas T.N. (1994). Role of neuropéptidos in the regulation of feeding behavior: a review of cholecystokinin, bombesin, neuropéptido Y and galanin. *Neurosci Biobehav Rev* 18, 313-323.

Li H. Y., Ericsson A. y Sawchenko PE. (1996). Distinct mechanisms underlie activation of hypothalamic neurosecretory neurons and their medullary catecholaminergic afferents in categorically different stress paradigms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 2359-2364.

Manual de prácticas de fisiología animal. (1980) Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de medicina veterinaria y zootecnia, p. 10.

Mihai C. y Robert C. Ritter. (2000) Satiating in response to macronutrient signals from the intestine: mechanisms and implications for macronutrient selection. CRC Press LLC. 263-274.

Nelson EE., Alberts JRA., Tian Y. y Verbalis JG. (1998) Oxytocin is elevated in plasma of 10-day-old rats following gastric distension. *Devel Brain Res* **111**, 301-303.

Olson BR., Drutatosky MD., Chow MS., Hruby VJ., Stricker EM. y Verbalis JG. (1991). Oxytocin and an oxytocin agonist administered centrally decrease food intake in rats, *Peptides* **12**, 113-118.

Paxinos G. (1994) The Rat Nervous System. 2nd ed. Academic Press. Cap. 29 Gustatory system pp 751-771.

Peters L.C., Sist T.C. y Kristal M.B. (1991). Maintenance and decline of the suppression of infanticide in mother rats. *Physiol Behav.* **50** (2), 451-456.

Phillips RJ y Powley TL. (1996). Gastric volume rather than nutrient content inhibits food intake, *Am. J. Physiol* **40**, R766.

Rinaman L., Hoffman GE., Dohanics J., Le WW., Stricker EM. y Versalis JG. (1995). Cholecystokinin activates catecholaminergic neurons in the caudal medulla that innervate the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J Neurosci*; 360:246-256.

Rinaman L., Baker EA., Hoffman GE., Stricker EM. y Versalis JG. (1998). Medullary c-Fos activation in rats after ingestion of a satiating meal. *Am J Physiol* **275**, 262-268.

Rinaman L. (2001). Postnatal development of catecholamine inputs to the paraventricular nucleus of the hypothalamus in rats. *J of Comp. Neurosci* **438**, 411-422.

Robertson D. y col. (2004). Primer on the Autonomic Nervous System. Elsevier Academic Press. San Diego, USA. 459.

Rosenblatt JS. y Siegel HI. (1998). Factors governing the onset and maintenance of maternal behavior among non-primate mammals: The role of hormonal and non-hormonal factors. En: DJ. Gubernick y PH. Klopfer (eds), Parental Care in Mammals. Plenum Press, New York. 13-76.

Russek M. (1981). Current status of the hepatostatic theory of food intake control. *Appetite* **2**,137-143.

Sawchenko PE., Chan RK y Peto CA. (1995). A1 catecholamine cell group: fine structure and synaptic input from the nucleus of the solitary tract. *J Comp. Neurol* **351**, 62-80.

Sawchenko PE., Brown ER., Chan RK., Ericsson A., Li HY., Roland BL y Kovacs KJ. (1996). The paraventricular nucleus of the hypothalamus and the functional neuroanatomy of visceromotor responses to stress. *Prog Brain Res* **107**, 201-222.

Swanson L.R. (1992). Brain maps: structure of the rat brain, New York: Elsevier.

Swanson L.W. y Sawchenko PE. (1983). Hypothalamic integration: Organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annu. Rev. Neurosci* **6**, 269.

Vella A y Rizza RA. (2004). Extraparacrine effects of GIP and GLP-1. *Horm Metab Res*; **36**(11-12), 830-836.

Willing AE. y Berthoud HR. (1997). Gastric distension-induced c-fos expression in catecholaminergic neurons of rat dorsal vagal complex. *J Physiol* **272**, 59-67.

Woods SC y Stricker EM. (1999). Central control of food intake. En: *Fundamental Neurosci*; edited by Zigmond MJ, Bloom FE, Landis SC, Roberts JL, and Squire LR. San Diego, CA: Academic. In press. Cap 18. 250-271.

Ueta Yoichi, Kannan Hiroshi, Higuchi Takashi, Negoro Hideo, Yamaguchi Kenichi y Yamashita Hiroshi. (2000). Activation of gastric afferents increases noradrenaline release in the paraventricular nucleus and plasma oxytocin level. *Am J Physiol* **78**, 69-76.

Zheng H, Patterson LM, Phifer CB y Berthoud HR. (2005). Brainstem melanocortinergic modulation of meal size and identification of hypothalamic POMC projections. *Am J Physiol. USA* **289** (1), 247-258.

Zigmond J, Bloom E, Landis C, Roberts L y Squire R. (1999). *Fundamental Neuroscience*. San Diego, Academic Press. Pp. 309.

Zubritsky E. (1997). The Limits of Love. What is the biology of motherly love? and why does it sometimes break down? *Endeavors Magazine* **13**(2), 156-159.

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

	Pag.
Figura 1. Regulación de la ingesta por factores internos y externos	5
Figura 2. Distribución de la vía gustativa y sus sitios de determinación en el NTS	7
Figura 3. Señales que juegan un papel importante en la regulación de la ingesta	14
Figura 4. Flujo general de la Información para la regulación neural de la ingesta	18
Figura 5. Vía neural visceral involucrada en la regulación de la ingesta y la integración en el cerebro	20
Figura 6. División del núcleo del tracto solitario	21
Figura 7. Circuito involucrado en el control de la ingesta	23
Figura 8. Esquema de los grupos experimentales formados a los diferentes tiempos	41
Figura 9. Esquema de un corte de la región rostral del tallo cerebral y la localización del NTS	48
Figura 10. Expresión de fos en la región rostral (gustatoria) del NTS inducida por la distensión gástrica en crías de 9 días	49
Figura 11. Corte del tallo cerebral en la región caudal que presenta la localización del NTS	50
Figura 12. Expresión de fos en la parte caudal del NTS inducida por la distensión gástrica en crías de 9 días	51
Figura 13. Expresión de fos en la parte caudal del NTS en tallo cerebral de crías de 18 días	52
Figura 14. Número de células inmunorreactivas a Fos en la región caudal del NTS, en respuesta a la ingesta de leche en crías de 9 días	53

Figura 15. Número de células inmunorreactivas a Fos en la región caudal del NTS, en respuesta a la ingesta de leche en crías de 18 días	54
Figura 16. Peso corporal promedio de las crías de 9 y 18 días de edad	55
Figura 17. Peso promedio del estómago de las crías de 9 y 18 días de edad	56
Figura 18. Doble inmunohistoquímica para Fos y TH (Tirosina Hidroxilasa)	58
Figura 19. Porcentajes de neuronas inmunorreactivas a Fos y TH en la región caudal del NTS de crías de 9 días	59
Figura 20. Porcentajes de neuronas inmunorreactivas a Fos y TH en la región caudal del NTS de crías de 18 días	60
Figura 21. Integración de los resultados obtenidos en la región rostral del NTS	70
Figura 22. Integración de los resultados obtenidos en la región caudal del NTS	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efectos sobre la ingesta por distintos nutrimentos	11
Tabla 2. Regulación de la ingesta mediante los péptidos gastrointestinales	16
Tabla 3. Regiones del hipotálamo implicadas en la regulación de la ingesta de alimento	28
Tabla 4. Control de la ingesta mediante diferentes NT	34
Tabla 5. Expresión de fos en áreas hipotalámicas inducida por la ingesta de leche	61