



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

El Núcleo Supraquiasmático como Modulador de la
Sensibilidad y Respuesta del Núcleo Arqueado a la
Hipoglicemia

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

CINTIA YOLANDA JAVIER DURÓN



DIRECTOR DE TESIS: DR. RUDOLF MARINUS BUIJS
ASESORA INTERNA: M. en IBSH ANGÉLICA FLORES RAMÍREZ

MÉXICO, D.F.

MARZO, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
MARCO TEÓRICO	3
1. <u>HOMEOSTASIS</u>	
2. <u>RITMOS</u>	
2.1. <u>Clasificación de los Ritmos Biológicos</u>	
2.2. <u>Ritmo Circadiano</u>	
3. <u>NÚCLEO SUPRAQUIAMÁTICO: EL MARCAPASO DE LOS MAMÍFEROS</u>	
3.1. <u>Poblaciones neuronales del Núcleo Supraquiasmático</u>	
3.2. <u>Eferencias del Núcleo Supraquiasmático</u>	
3.3. <u>Producción rítmica de glucosa</u>	
4. <u>METABOLISMO Y SISTEMA NERVIOSO CENTRAL</u>	
5. <u>NÚCLEO ARQUEADO: CENSOR MÉTABOLICO DEL CEREBRO</u>	
5.1. <u>Población neuronal del Núcleo Arqueado</u>	
5.2. <u>Censo de glucosa</u>	
6. <u>EL NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO Y EL NÚCLEO ARQUEADO</u>	
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	27
OBJETIVOS	28
HIPÓTESIS	29
MATERIALES Y MÉTODOS	30
RESULTADOS	35
ANÁLISIS DE RESULTADOS	46
CONCLUSIONES	49
BIBLIOGRAFÍA	50

RESUMEN

El núcleo supraquiasmático (NSQ) es conocido como el reloj biológico, ya que modula los ritmos circadianos en los mamíferos, sin embargo, las vías que éste usa para modular los sistemas periféricos no están del todo descritas.

El presente trabajo aporta evidencia de la relación entre la actividad del NSQ y la del núcleo arqueado (ARC) que es el encargado de mantener la homeostasis y el balance energético. El ARC recibe e integra señales metabólicas directamente del torrente sanguíneo, debido a su localización en el cerebro. Se ha demostrado que existen conexiones anatómicas entre ambos núcleos, a través de estudios realizados con marcadores retrógrados (Yi *et al.*, 2006), el análisis de activación neuronal de ambos núcleos (Yi *et al.*, 2006; Guzmán *et al.*, 2005, Buijs, 2004); además de la conexión a través de neuropéptidos específicos (Maro-Chao, 2015); sin embargo, como se modulan el uno al otro no se encuentra bien descrito.

Para investigar la relación entre la actividad de estos núcleos se analizó la activación de neuronas en el ARC por medio del análisis de la expresión de c-Fos y genes involucrados en la respuesta metabólica orexigénica, como neuropéptido Y (NPY) y Proteína relacionada a agutí (AgRP), así como aquellos involucrados en la recepción de glucosa el transportador 2 (GLUT2) y precursores de inhibidores del sistema nervioso central, como GAD67. Esto se realizó en animales con lesión del NSQ a lo que se les indujo un estado hipoglucémico en ZT2. Se obtuvieron muestras de sangre en los minutos posteriores para la cuantificación de glucosa plasmática. Posteriormente, los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico para realizar una perfusión intracardiaca, se extrajo el cerebro, y se analizó la expresión de los mensajeros por medio de técnicas de inmunohistoquímica e hibridación *in situ*.

La lesión del NSQ aumenta la sensibilidad a insulina, por lo cual la producción de glucosa aumenta y disminuye en los primeros 30 minutos en animales con lesión del NSQ e hipoglicemia celular inducida. Además, el NSQ modula la actividad neuronal del ARC de manera inhibitoria, generando así un aumento en la actividad de los animales con lesión del NSQ.

Se sugiere que el NSQ modula la actividad del ARC, sin embargo se proponen vías alternas que también juegan un papel importante en la activación neuronal del ARC, además de la participación de núcleos involucrados en el control del sistema metabólico como el núcleo paraventricular (PVN), el dorsomedial (DMH) y el ventromedial (VHM).

INTRODUCCIÓN

Los seres vivos se encuentran expuestos a cambios cíclicos del medio ambiente (iluminación, temperatura, humedad, salinidad, pH, etc.), debido a esto, han desarrollado la capacidad de predecir y adaptarse a las variaciones del medio, a través de diversos mecanismos fisiológicos y conductuales que se modifican dependiendo de sus necesidades.

Walter Cannon acuñó el término homeostasis tras la publicación de *La sabiduría del Cuerpo* (1932) donde presento ejemplos de la tendencia de las funciones corporales a mantener un nivel constante. A través de la recaudación de la información generada por diversos estudios donde se mostraba la existencia de múltiples mecanismos de autorregulación en el organismo, por primera vez, en 1929 definió la *homeostasis* como “un conjunto de procesos fisiológicos coordinados que generan la estabilidad del organismo” con ello Cannon logra separa el concepto homeostasis del de equilibrio, aclarando que la homeostasis implica una condición dinámica que se mantiene constante por su propia variación.

MARCO TEÓRICO

1. HOMEOSTASIS

El término homeostasis se refiere a la interacción, entre el medio interno y el medio externo, generando un equilibrio como consecuencia de la acción de procesos fisiológicos y conductuales. Este equilibrio es logrado mediante la comunicación que se establece entre los sistemas del organismo a través de señales que son integradas en sistemas de receptores y a través de efectores que se retroalimentan entre sí, lo cual es conocido como sistema homeostático (Randall *et al.*, 2001).

Los sistemas homeostáticos se caracterizan por: 1) ser un sistema de retroalimentación negativa, es decir, que un cambio en la variable estable genera una respuesta que mueve la variable en sentido opuesto; 2) no presentan una variable fija, es decir, ésta oscila dependiendo del medio externo y 3) no son inmutables, es decir, poseen la capacidad de generar un cambio como respuesta a un estímulo persistente en el tiempo (Randall *et al.*, 2001).

Por otro lado, los sistemas homeostáticos pueden desencadenar diferentes respuestas ante los cambios en las variables:

- Homeostasis Reactiva: es una respuesta como consecuencia a la perturbación en las condiciones del medio interno; la respuesta es generada al momento del cambio en la variable, es decir, al momento de una perturbación en el sistema, nunca la precede. Cuando las concentraciones plasmáticas de glucosa aumentan o disminuyen del rango establecido, entran en marcha mecanismos de regulación para restaurar el sistema.

-
- Homeostasis Anticipada: se denomina así a la respuesta que se genera cuando se detecta un cambio que posiblemente modifique la variable e inmediatamente se desencadena la respuesta adaptativa.
 - **Homeostasis Predictiva:** ésta fue descrita por Moore en 1986, y es la respuesta homeostática que se presenta antes de que un estímulo externo altere la variable. Las concentraciones de hormonas plasmáticas como el cortisol se modifican horas antes de despertar, como resultado de la actividad del sistema digestivo que anticipa la ingestión de alimentos.

Esta última se basa en la naturaleza oscilatoria de las funciones fisiológicas que a su vez son sincronizadas por los ciclos de luz-oscuridad, que conlleva a que presenten un ritmo de 24 horas o cercano a éste (Cardinali, 1992).

2. RITMOS

Todos los procesos fisiológicos que lleva a cabo el organismo presentan variaciones a lo largo del tiempo, caracterizadas por la alternancia entre periodos de máxima o mínima actividad. Estos cambios en las variables se expresan en procesos internos, como la temperatura corporal, la síntesis y liberación de glucosa, la liberación de insulina, así como en la conducta de los animales como la actividad reproductiva, el ciclo sueño-vigilia y de alimentación (Gruart *et al.*, 2002).

Cuando los cambios de una variable presentan un periodo estable el cual es recurrente y predecible, ya sea un proceso fisiológico o conducta, se denomina como **ritmo biológico** (Gruart *et al.*, 2002; Delgado, 2010).

Existen tres características que describen a los ritmos biológicos (Figura 1):

- Periodo: Intervalo de tiempo entre dos acontecimientos idénticos que completan un ciclo repetitivo de una variable.
- Frecuencia: número de repeticiones por unidad de tiempo de un suceso periódico.
- Amplitud: la magnitud del cambio en la variable desde una línea base hasta el punto máximo de una variable.
- Fase: momento en el que ocurre un evento particular dentro de un ciclo.

Estas características pueden ser medidas y proporcionar datos numéricos sobre el ritmo y por tanto, generan la posibilidad de un análisis cuantitativo (Gruart *et al.*, 2002; Koukkari y Sothorn, 2006).

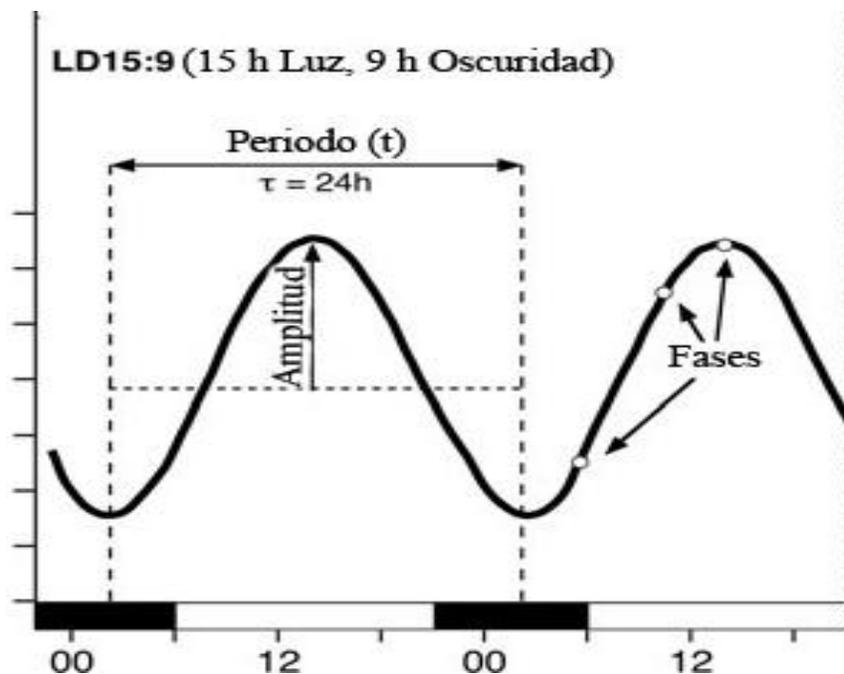


Figura 1. Características del Ritmo. Periodo en tiempo de 24 horas, Amplitud y las diferentes fases del ritmo. Tomado y modificado de Koukkari y Sothorn, 2006.

2.1. Clasificación de los ritmos biológicos

Los ritmos biológicos pueden clasificarse dependiendo de la duración de su periodo en (Koukkari y Sothorn, 2006; Delgado, 2010):

- Ultradiano: ritmos que presentan un periodo menor a 24 horas, como el disparo de las neuronas o la frecuencia respiratoria y cardiaca.
- Infradiano: ritmos que presentan un periodo mayor a 24 horas, como el ciclo menstrual y los ciclos migratorios.
- Circadiano: Periodo de aproximadamente 24 horas, como el sueño vigilia o las variaciones diarias de temperatura.

Los ritmos circadianos han sido los más estudiados debido a la importancia de su participación en procesos fisiológicos y conductuales.

2.2. Ritmos circadianos

Los ritmos circadianos se encuentran implicados en un gran número de procesos fisiológicos y conductuales. Estos poseen una duración aproximada de 24 horas y son sincronizados por señales ambientales, generando que la mayoría de los ritmos estén sincronizados con el ciclo de luz-oscuridad. Este último genera lo que se denomina cambio de fase provocando una adaptación general del organismo (Sehgal, 2004; Koukkari y Sothorn, 2006; Delgado, 2010).

Una característica de los ritmos circadianos es su carácter endógeno, es decir, su persistencia bajo condiciones constantes. En ausencia de luz se exhiben una oscilación en libre corrimiento y su duración varía dependiendo de la especie, en animales diurnos el

ritmo es más corto de 24 horas y en animales nocturnos es más largo (Sehgal, 2004; Delgado, 2010). Esta persistencia se debe al control genético sobre el ritmo circadiano, además de la existencia de múltiples osciladores a nivel celular.

La sincronización de las funciones de un organismo se encuentra determinada por un **marcapasos central** que transmite señales temporales al resto del cuerpo; este marcapasos puede ser un grupo de neuronas, un ganglio o áreas específicas en el cerebro, dependiendo de la especie (Koukkari y Sothorn, 2006). Por ello se habla de un control endógeno y de uno exógeno de los ritmos biológicos. Específicamente en los ritmos circadianos existen múltiples datos que corroboran que en los mamíferos este control es endógeno y es sincronizado por la luz a través de un **Reloj Biológico** (Sehgal, 2004).

3. NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO: EL MARCAPASOS DE LOS MAMÍFEROS

En los mamíferos los estudios para conocer este marcapasos fueron lentos, en 1960 Richter realizó una serie de lesiones en cerebros de ratas con los cuales hipotetizó que el generador del control temporal del organismo se encontraba en el hipotálamo. Posteriormente en 1972, se observó que los animales con lesión del Núcleo Supraquiasmático (NSQ) presentaban un ritmo alterado en la secreción de glucosa y serotonina, causando también la pérdida de la actividad locomotora y del ciclo sueño-vigilia; por lo cual se consideró al NSQ como el candidato ideal para ser el marcapasos central (Moore, 1972; Stephan y Zucker, 1972; Dann, 2010).

Posteriormente, Inouye y Kawamura (1979) mostraron que el NSQ tiene la capacidad de mantener oscilaciones rítmicas *in vitro*. Por otra parte, Menaker (1990) evidenció que el trasplante de NSQ de embriones de mutantes a huéspedes salvajes con lesión del NSQ restauraba la ritmicidad de funciones fisiológicas y conductuales, estableciendo el periodo del donador.

El Núcleo Supraquiasmático en los mamíferos es una estructura bilateral que se localiza en el diencefalo del cerebro en la base del hipotálamo (Figura 2), que es el regulador principal de las funciones corporales, endocrinas y metabólicas (Morán, 2006). El NSQ posee dos regiones, la ventrolateral y la dorsomedial con poblaciones neuronales distintas (Hannibal y Fahrenkrug, 2006).

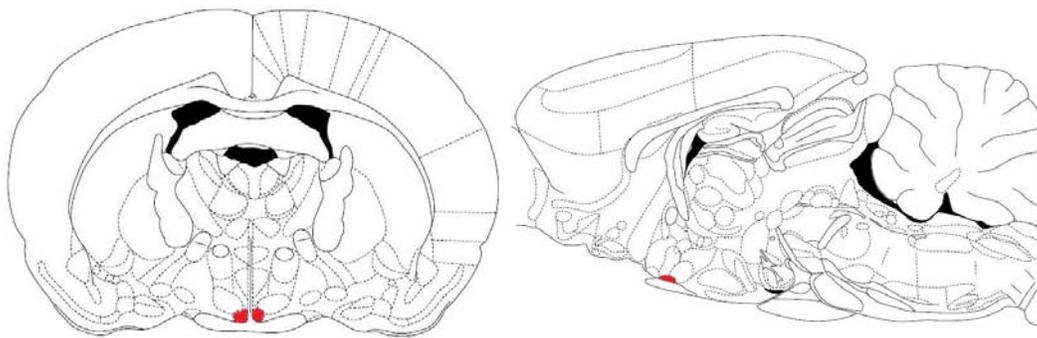


Figura 2. Localización del NSQ. A) Corte coronal y B) corte sagital de cerebro donde se aprecia el NSQ (rojo) en la base del hipotálamo por arriba del Quiasma Óptico. Tomada y modificada de Paxinos y Watson, 2006.

A pesar de la capacidad de generar y mantener un ritmo independiente a señales externas, el NSQ es sincronizado por medio de la recepción de información fótica proveniente de la retina (Dann, 2010). Durante los años noventa se encontró que los axones de células ganglionares fotosensibles de la retina son proyectadas hacia el cerebro formando el tracto retino-hipotalámico (TRH) que llega a la porción ventrolateral del NSQ. Las terminales nerviosas de dichos axones liberan ácido glutámico, un aminoácido excitador que genera la actividad sincronizada de las diferentes poblaciones neuronales con el ciclo luz-oscuridad (Klein *et al.* 1991; Moore, 1993; Aguilar-Roblero, 2004; Delgado, 2010; Silver y Rainbow, 2013).

3.1. Poblaciones neuronales del Núcleo Supraquiasmático

El NSQ presenta una gran diversidad de poblaciones neuronales que presentan un ritmo característico y variado integrándose para coordinar el control del cuerpo (Antle y Silver, 2005). La región ventromedial del NSQ (core) está compuesta por neuronas que sintetizan Sustancia P (SP); en cultivos *in vitro* las células que sintetizan SP presentan cambios de fase durante la tarde y noche a consecuencia de los impulsos de luz, lo que se considera como una señal intranuclear en el NSQ (Antle y Silver, 2005). Por otra parte, el Péptido Intestinal Vasoactivo (VIP) está presente en toda el área activando genes reloj (*Per 1* y *2*); su aplicación en animales sincronizados genera un cambio específico de fase, similar al producido por la luz. En estudios recientes se ha propuesto como neurotransmisor de acoplamiento de la actividad en el NSQ (Piggins *et al.* 1995; Antle y Silver, 2005; Welsh *et al.*, 2013). El péptido liberador de gastrina (GRP) induce la activación de genes reloj y c-Fos tras la exposición a luz y al igual que VIP genera cambios de fase cuando es aplicado en cultivos *in vitro*, aunado a la pérdida de la actividad locomotora en animales sincronizados (Antle y Silver, 2005; Welsh *et al.* 2013).

El conjunto de neuronas del NSQ presentan una actividad neuronal similar que genera un ritmo cercano a las 24 horas, que es dependiente de las condiciones de luz-oscuridad (Van den Pol y Tsujimoto, 1985). En animales en condiciones constantes dichas neuronas pierden el ritmo de actividad (Inouye, 1996).

Por otra parte la región dorsomedial del NSQ contiene neuronas liberadoras de Somatostatina (SS) y de neuronas de Arginina Vasopresina (AVP), uno de los principales neurotransmisores del sistema nervioso central (SCN) (Klein *et al.*, 1991; Inouye, 1996). La actividad de AVP se mantiene presente en el NSQ por más de 24 horas con su pico máximo durante el día (Kalsbeek, 1995), mientras las neuronas SS presentan su máxima actividad durante la noche. En cuanto a su papel en el NSQ se sugieren que las neuronas

de SS se encargan de automodular la actividad de NSQ y las neuronas de AVP se encargan de la salida de información (Hamada *et al.*, 1993).

El NSQ también contiene neuronas GABAérgicas distribuidas a lo largo del núcleo, las cuales forman interconexiones entre las neuronas del NSQ. Actúan de manera inhibitoria y excitatoria bajo ciertas condiciones (Antle y Silver, 2005). Algunos estudios muestran un aumento de actividad neuronal en el NSQ durante el día (Inouye, 1996). Su aplicación de diaria genera cambios de fase. De tal manera GABA es considerado un modulador general del NSQ (Reppert *et al.* 1985; Lui y Reppert, 2005; Welsh *et al.*, 2010).

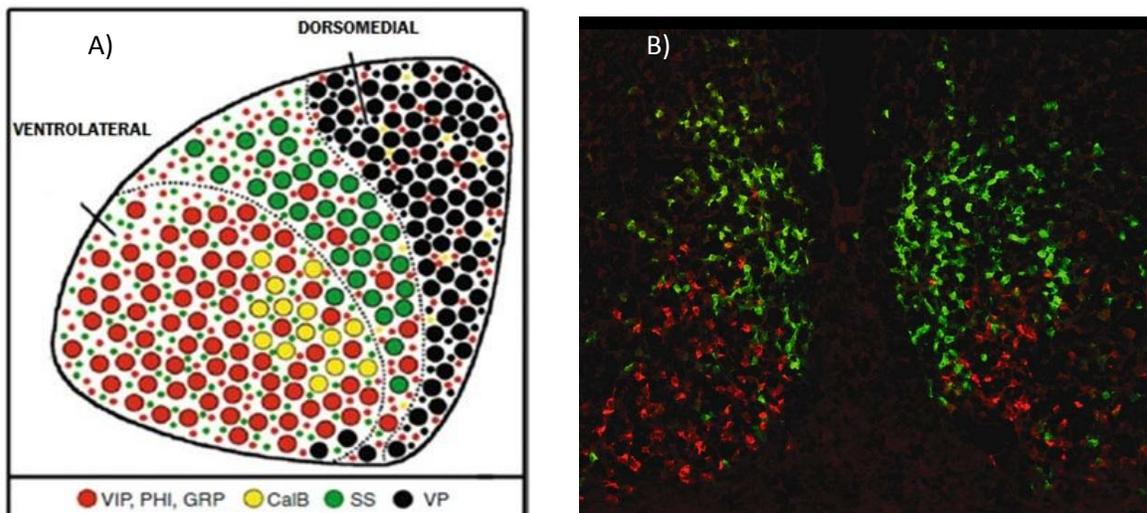


Figura 3. Poblaciones neuronales del NSQ. A) Región dorsomedial y ventrolateral. Puntos rojos VIP, PHI y GRP; Amarillo neuronas CalB, Verde SS y Negro VP. El soma de las neuronas representadas por círculos grandes y fibras con círculos pequeños. B) Inmunofluorescencia de VIP en rojo y AVP en verde. Tomado y modificado de Helfrich y Foster 2004.

En conjunto todos estos neurotransmisores modulan la actividad del Núcleo Supraquiasmático, que se activa durante el día y disminuye su actividad durante la noche, presentando un ritmo de 24 horas marcado por los cambios de fotoperiodo.

El NSQ tras recibir información a través del tracto retinohipotalámico (TRH) es sincronizado con el ciclo luz-oscuridad ambiental, a su vez el NSQ envía información hacia relojes periféricos para sincronizar la actividad del organismo con el ambiente.

3.2. Eferencias del Núcleo Supraquiasmático

El NSQ es el encargado de mantener el control del organismo, por lo que recibe y envía señales nerviosas y humorales a diversas áreas dentro y fuera del SNC, sin embargo las conexiones y su funcionamiento no ha sido del todo dilucidado. Ejemplo de esto es la respuesta del organismo al aislamiento del NSQ, manteniendo ritmos de actividad locomotora y alimentación, pero sin mantener el ritmo de actividad neuroendocrina (Lehman *et al.*, 1987; Meyer-Bernstein *et al.*, 1999).

La información sobre la distribución de las proyecciones del NSQ se obtuvo por medio del uso de trazadores, inmunohistoquímica y la lesión del propio núcleo. Esto permitió conocer hacia donde se proyectan las vías de salida del NSQ (Watts y Swanson, 1987; Watts *et al.*, 1987).

De las múltiples eferencias se pueden señalar tres grupos: hacia neuronas endocrinas, neuronas pre-autonómicas y neuronas intermediarias. El primer grupo son neuronas liberadoras de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) con las cuales existe una conexión directa. El segundo grupo está conformado por las neuronas pre-autonómicas, que son aquellas que se encuentran en la base de la conexión pre-ganglionar simpática y parasimpática del tallo cerebral y la médula espinal. Por último, las neuronas llamadas intermediarias que son las encargadas de integrar la información circadiana con otras salidas hipotalámicas antes de que lleguen a la vía endocrina (Figura 4) (Kalsbeek *et al.*, 2006).

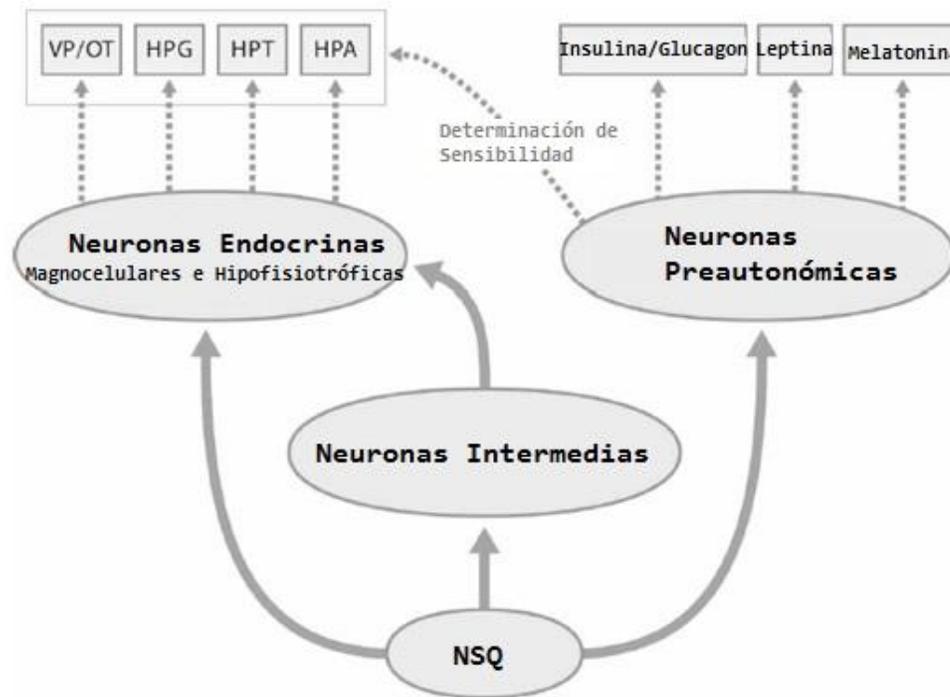


Figura 4. Eferencias del NSQ. Tres grupos principales de eferencias diferenciadas por el tipo de neuronas que participan. Neuronas endocrinas, Integradoras intermedias y Pre-autonómicas. VP (vasopresinas), OT (oxitocina), HPG (eje Hipotalámico-pituitario-gonadal), HPT (eje Hipotalámico-pituitario-tiroideo), HPA (eje Hipotalámico-pituitario-adrenal). Tomada y modifica de Kalsbeek, 2006.

Las eferencias del NSQ se encuentran distribuidas en una gran porción del hipotálamo, como en el área pre-óptica medial (MPA), el hipotálamo dorsomedial (DMH) y en las neuronas pre-autonómicas del núcleo paraventricular (PVN). En menor cantidad hacia áreas neuroendocrinas del PVN, el núcleo arqueado (ARC) y las neuronas pre-autonómicas del MPA (Watts y Swanson, 1987; Watts *et al.*, 1987). Posteriormente se encontraron proyecciones que terminan en el núcleo geniculado lateral (LGN), el paraventricular del tálamo (PVT) y neuronas GnRHérgicas (Figura 5) (Buijs y Kalsbeek, 2002).

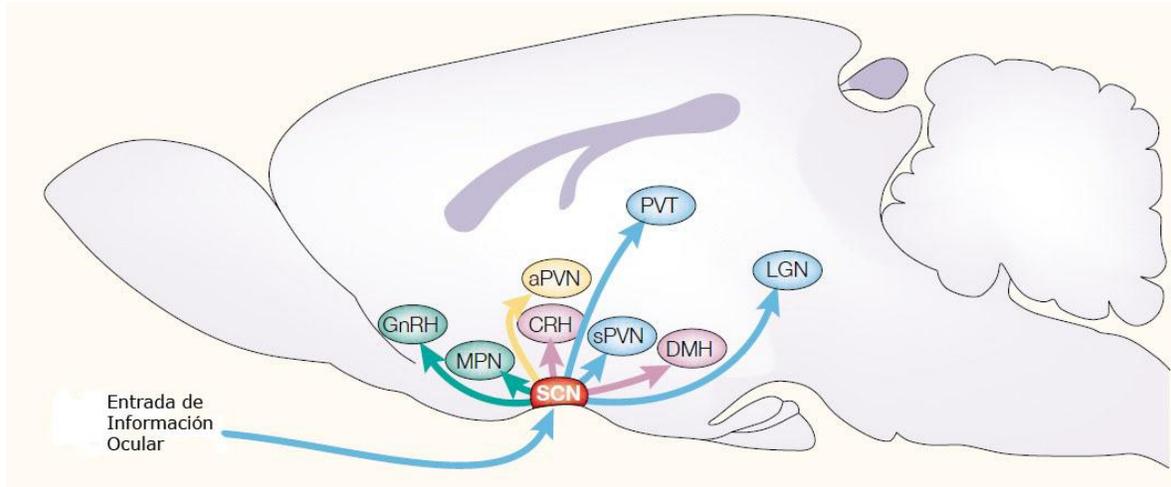


Figura 5. Señalización del Núcleo Supraquiasmático. Entrada de información fótica al NSQ y eferencias del NSQ hacia áreas hipotalámicas y cerebrales. Tomada y modificada de Buijs y Kalsbeek, 2002.

El conocimiento de las múltiples conexiones del NSQ ha permitido analizar su participación en los procesos neuroendocrinos y su ritmicidad, generando interés entre diversos grupos de investigación sobre el control homeostático y metabólico aunado a la ritmicidad, tomando como punto de partida al NSQ (Kalsbeek *et al.*, 2006).

Se ha mostrado que las señales metabólicas como la glucosa plasmática modifican las propiedades electrofisiológicas del NSQ así como la participación de ésta en núcleos específicos como el PVN, el núcleo del tracto solitario (NTS), el hipotálamo ventromedial y **el núcleo arqueado (ARC)** (Oomura *et al.*, 1969; Cone *et al.*, 2001; Leibowitz, 2004; Solomon, 2006).

3.3 Producción rítmica de glucosa.

La glucosa es una biomolécula metabólica fundamental para mantener el estado energético del organismo, ya que la mayoría de los tejidos y órganos la utilizan como fuente de energía. La demanda de glucosa en el organismo depende del uso por parte de los diversos procesos fisiológicos y conductuales. La principal fuente de glucosa es la

ingesta de alimento; una vez en el sistema puede ser utilizada o almacenada en forma de glucógeno, sin embargo la concentración de glucosa en el sistema es el resultado de la producción hepática (Hill y Wyse., 2006). La glicemia es el término para definir la concentración de glucosa en plasma, cuando las concentraciones de glucosa en plasma son bajos se habla de **hipoglicemia** y cuando son altos de hiperglicemia (Randall *et al.*, 2001).

La concentración de glucosa presenta un pico máximo al inicio de la fase de actividad, como respuesta para satisfacer la demanda de uso de glucosa por parte del organismo por el gasto energético, además de presentar variaciones a lo largo del día que dependen del consumo de glucosa por parte del organismo y la sensibilidad a la insulina (Randall *et al.*, 2001; Hill y Wyse 2006).

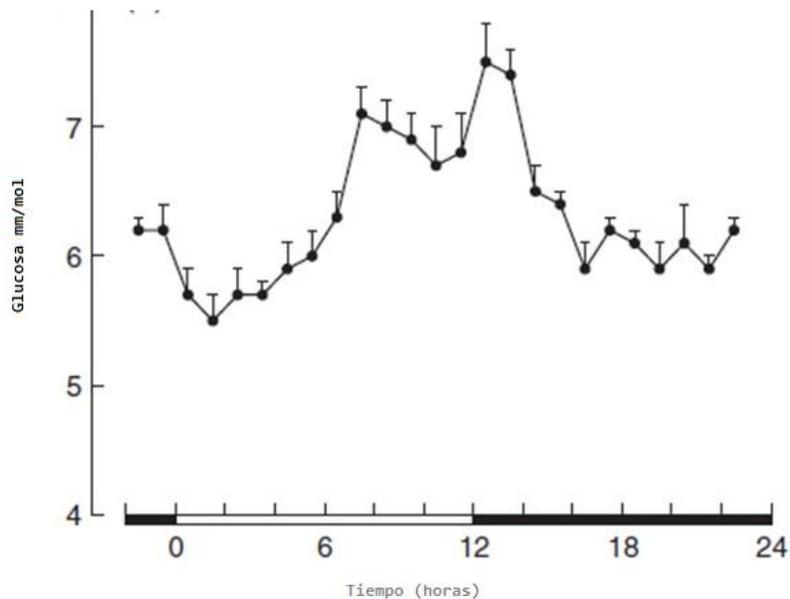


Figura 6. Concentraciones de glucosa plasmática en rata. Concentración de glucosa en plasma en un periodo de 24 horas con pico máximo al inicio de la fase de oscuridad (negro), con disminución en la fase de luz (blanco). Tomada y modificada de la Fleur 1999.

El NSQ modula las variaciones diarias de producción de la glucosa mediante el control de la secreción de hormonas glucogénicas y su acción a nivel hepático mediante la inervación simpática y parasimpática. Las variaciones plasmáticas de la concentración de insulina parecen estar relacionadas con el momento de la alimentación que es dirigido por el NSQ. Las ratas son más sensibles a la insulina en el inicio del periodo de actividad, coincidiendo con el pico máximo de glucosa (la Fleur, 2001).

Diferentes estudios se evidencian la participación del hipotálamo en la modulación de la producción de glucosa, posteriormente por medio del uso de 2 Deoxy-D-glucosa (un análogo de glucosa que impide la cascada de señalización a nivel celular generada por la glucosa, 2DG) se mostró que el NSQ es esencial en el metabolismo de ésta. Asimismo el uso de trazadores evidenció una conexión entre el reloj circadiano y el hígado, por medio del sistema nervioso autónomo sugiriendo que el NSQ modula los niveles de glicemia través del sistema autónomo con un ritmo de 24 horas (la Fleur *et al.*, 1999; Cailotto, 2005, Cuesta *et al.*, 2009).

La relación existente entre el sistema nervioso central y periférico en la modulación de la glucosa se ha reforzado gracias a diversos estudios. Se mostró que la lesión del NSQ genera la alteración en los niveles de la glicemia del animal; de igual manera la infusión de glucosa disminuye los niveles de insulina y glucosa en animales con lesión del NSQ. Es importante destacar que en animales con lesión del NSQ y a los que se les inyectó insulina respondieron de manera similar a los grupos controles, concluyendo que existe una separación en las vías de respuesta a los cambios de la glucosa dependiendo de la hora del día (la Fleur *et al.*, 2001).

Por otro lado, el hígado posee inervación de tipo simpática y parasimpática, con origen en el hipotálamo donde se genera el control de la producción de glucosa en el hígado (Hill y Wyse 2006). Para determinar la participación de la inervación hepática en la modulación de la glicemia, se realizaron estudios en los cuales animales con denervación del hígado

presentan alteraciones en el ritmo diario de glucosa plasmática, lo que confirma una participación de la inervación simpática y parasimpática en dicho proceso (Kalsbeek *et al.*, 2006; Kalsbeek *et al.*, 2008; Shiuchi *et al.*, 2009).

4. METABOLISMO Y SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Los diversos estímulos que recibe el cerebro son fundamentales para el conocimiento del estado metabólico periférico. Las hormonas, péptidos y otras moléculas son las encargadas de llevar el mensaje al SNC, ya sea mediante impulsos nerviosos generados en la periferia o a través del flujo sanguíneo directamente en el cerebro; de esta manera el cerebro controla las funciones y mantiene la homeostasis (Figura 7) (Pamíe, 1998).

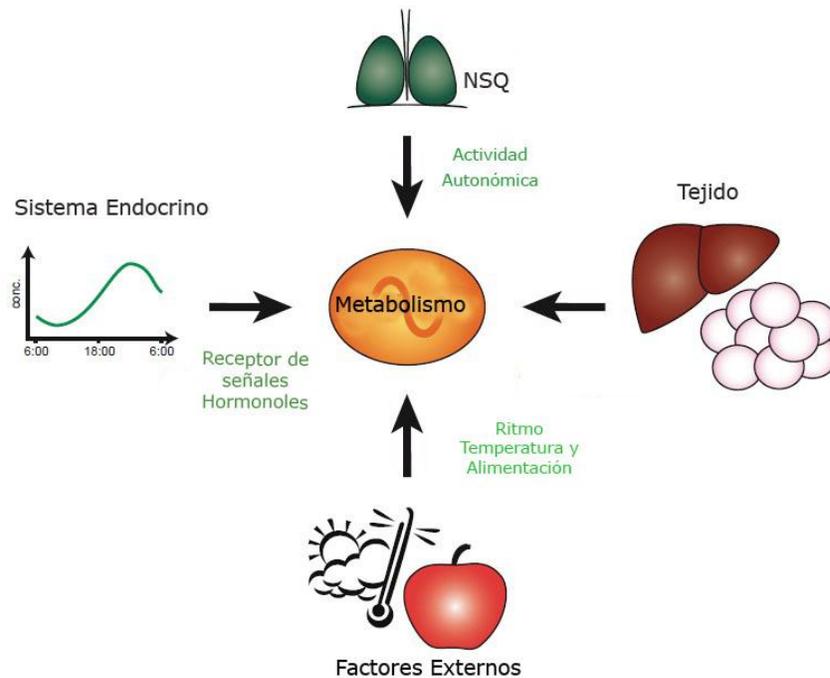


Figura 7. Control del metabolismo. Las señales endocrinas, neuronales y externas se integran para mantener el metabolismo del organismo.

El cerebro recibe dos señales principales, las humorales y las neuronales a través del NTS y los órganos circunventriculares (CVO's), respectivamente. El NTS es una entrada de información por diversas vías del sistema periférico como aferencias del vago, del sistema respiratorio, cardiovascular y del tracto gastrointestinal (Crossman, 2007). En el NTS se encuentra el área postrema (AP) uno de los CVO's, así la información neural proveniente de los órganos internos y las diversas moléculas en la sangre son canalizadas a través del NTS hacia diferentes núcleos en el cerebro (Johnson y Gross, 1993; Crossman, 2007).

Los CVO's son un conjunto de células neuronales que se localizan en los bordes de los espacios ventriculares presentándose en los ventrículos laterales 3° y 4°; se caracterizan por encontrarse en contacto con dos medios, el líquido cerebroespinal y la circulación sanguínea, actuando como traductores de señales entre estos, que unido a las conexiones estratégicas con diversos núcleos establecen conexiones neuronales fundamentales, lo que permite que estén implicados en el proceso homeostático y metabólico (Johnson y Gross, 1993).

Los CVO's están catalogados como sensoriales, ya que responden a factores circulantes en la sangre, enviando información axonal hacia diversos núcleos. Dentro de los CVO's el órgano vascular de la lámina terminal (OVLT) y la eminencia media (ME) están situados a la altura del ARC (Figura 8) (Fry *et al.*, 2007).

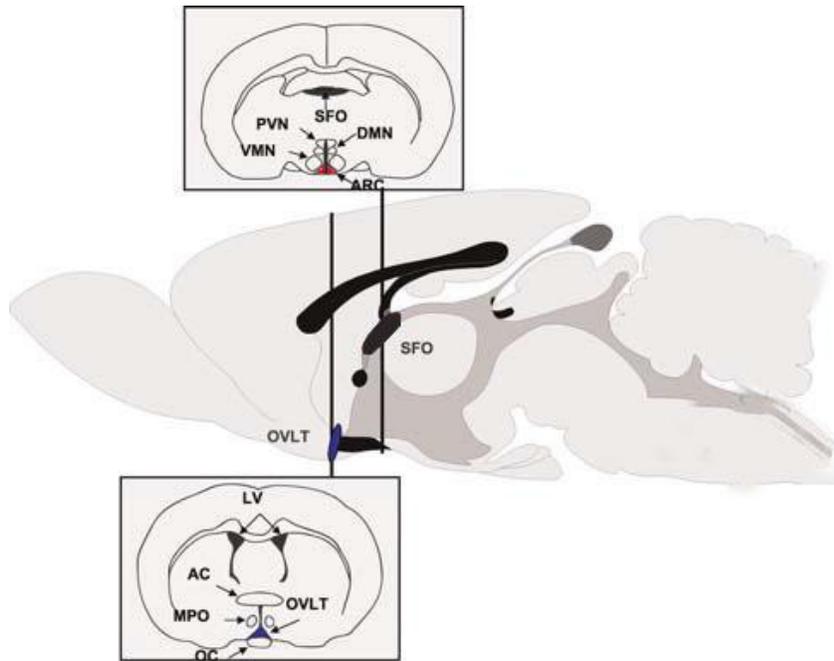


Figura 8. Órganos Circunventriculares. El OVLT (azul) y la ME (no señalada) se encuentran en el área contigua al ARC (rojo), en la base del hipotálamo. Tomada y modificada de Fry, 2007.

Además de los CVO's diversas estructuras del hipotálamo y el tallo cerebral como el NTS, el nervio motor vago, el PVN y el ARC están involucrados en la detección de señales metabólicas. La recepción de estas señales provee información para el control autonómico y neuroendocrino generando un control periférico. La regulación de la homeostasis por parte del SNC involucra la detección de señales de *feedback*, su integración y la salida de señales hacia los efectores (Fry, *et al.*, 2007).

El ARC proyecta fibras nerviosas a diversos núcleos que participan en el control metabólico (Figura 9), sea por ingesta de alimento, generación de reservas energéticas, secreción de hormonas en órganos periféricos, etc., al igual que el PVN, DMH y LH. El PVN es un centro regulador de la homeostasis energética, se ha observado que la lesión de dicho núcleo provoca hiperfagia y la activación de neuronas que expresan Proteína relacionada a Agouti (AgRP) en el ARC. De igual manera el DMH es un centro del control

de la ingesta de alimento y actúa conjuntamente con el PVN para la iniciación y mantenimiento de la misma (Sternson, 2012).

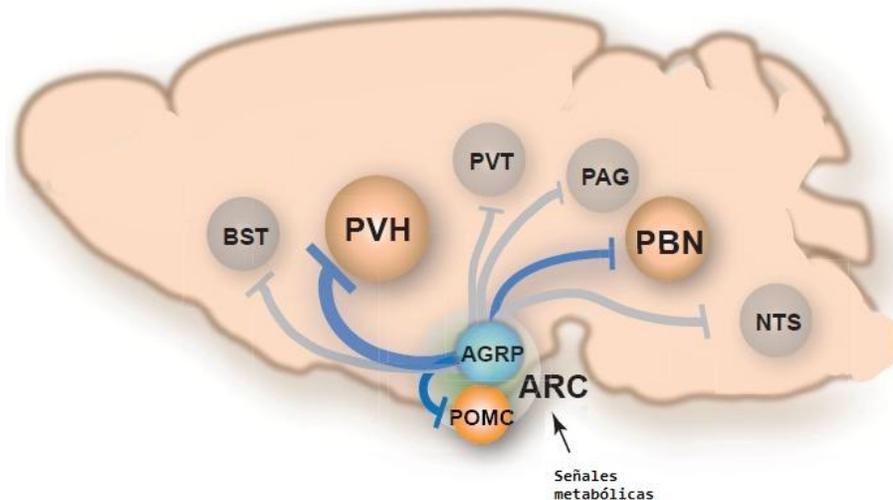


Figura 9. Eferencias del Núcleo Arqueado. Proyecciones del ARC a áreas hipotálamicas y cerebrales implicadas en el control metabólico y homeostasis energética, como ingesta de alimento, control de glucosa y hormonas. Tomada y modificada de Sternson 2012.

5. NÚCLEO ARQUEADO: CENSOR METABÓLICO DEL CEREBRO

Al ser catalogado como el principal receptor de metabolitos en el SNC, el ARC desempeña un papel esencial en la regulación del organismo, manteniendo el estado metabólico y la homeostasis energética (Solomon, 2004).

El ARC se encuentra en la base del hipotálamo a ambos lados del tercer ventrículo (Figura 10) donde la barrera hematoencefálica es más laxa permitiendo la difusión de diversas moléculas, entre ellas la glucosa. Se ha referido que el ARC se activa por la ingesta de alimento o en estados negativos de energía, tales como la **hipoglicemia** (Leibowitz, 2004).

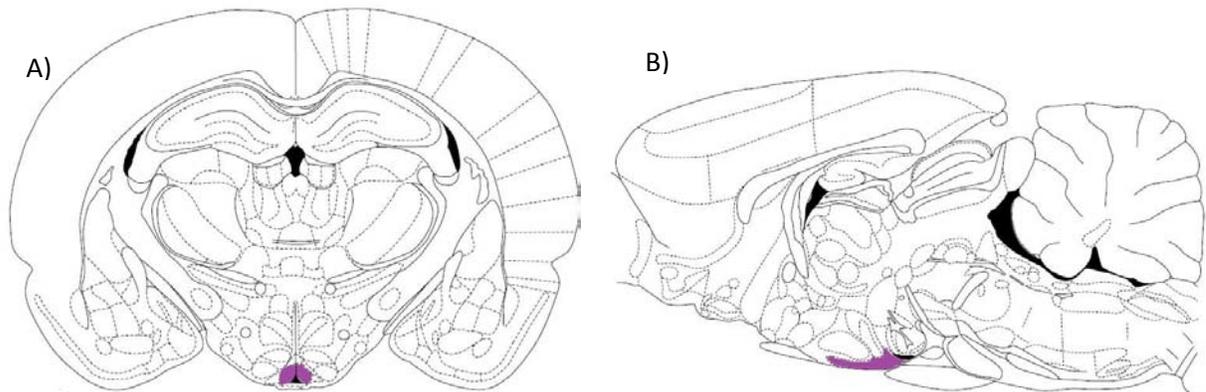


Figura 10. Núcleo Arqueado. A) Corte coronal y B) sagital de cerebro, el ARC (morado) se encuentra en la base del hipotálamo al costado del tercer ventrículo. Tomada y modificada de Paxinos y Watson 2006.

5.1. Población Neuronal del Núcleo Arqueado

La población neural del ARC se distingue por la respuesta que desencadenan ante el estado energético del organismo y son fundamentales para la homeostasis energética Figura 11 (Leibwitz, 2004; Esquivel, 2005; Zhang, 2006):

- **Las neuronas orexigénicas**, expresan Neuropéptido Y (NPY) y Proteína relacionada a Agouti (AgRP) que se activan ante estados energéticos negativos o niveles bajos de glucosa, respondiendo con un aumento en la ingesta de alimento. Sergeev (2000) observó una mayor expresión de dichos genes en el ARC y un aumento en la ingesta de alimento tras la infusión de 2DG, por lo cual concluyó que la participación activa de dichas neuronas es fundamental para el correcto censo de los niveles energéticos.
- **Las neuronas anorexigénicas**, expresan Pro-opiomelanocortina (POMC) y Transcripto Relacionado a Anfetaminas y Cocaína (CART), son activadas por estados metabólicos altos o el aumento de glucosa en plasma, encargados de desencadenar una respuesta de saciedad y frenar la ingesta de alimento.

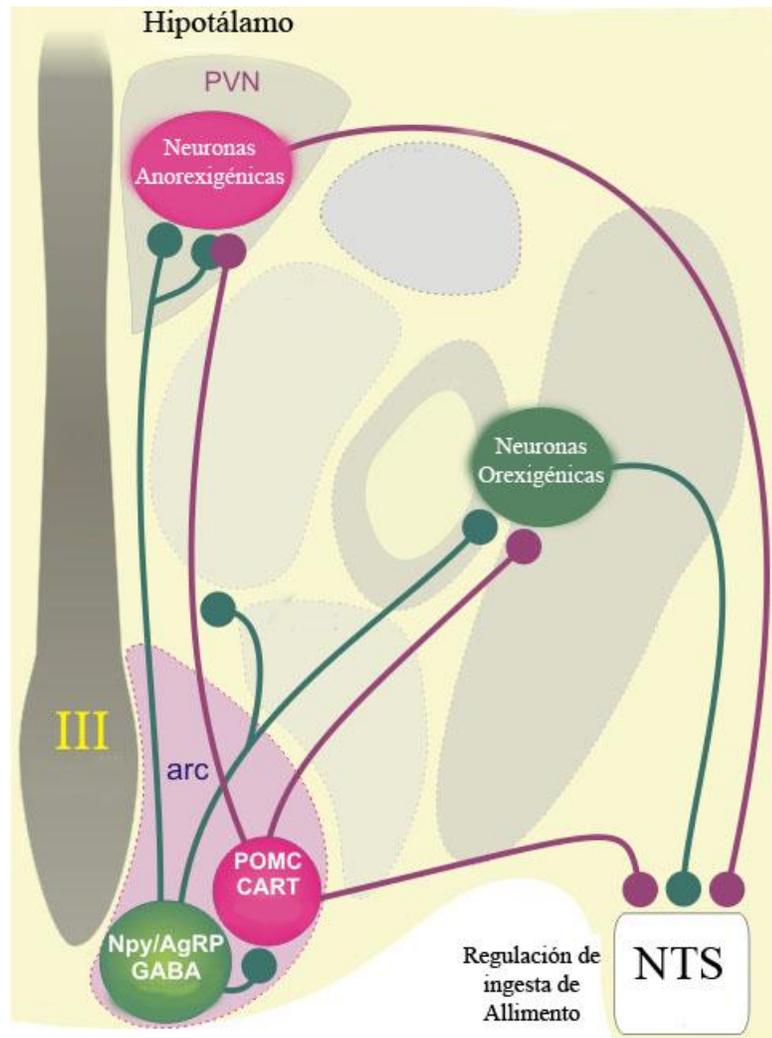


Figura 11. Las proyecciones de las neuronas NPY/AgRP y POMC/CART hacia neuronas anorexigénicas y orexigénicas del PVN y NTS regulan la ingesta de alimento.

Además en el ARC existen grupos neuronales caracterizados por el tipo de respuesta que presentan ante la concentración de glucosa; cuando la concentración de glucosa es mayor a 5 mM neuronas estimuladas por alta glucosa se activan y las inhibidas por altos niveles de glucosa se inhiben. Por otro lado, cuando la concentración de glucosa es menos a 5mM las neuronas estimuladas por glucosa se activan y las inhibidas por glucosa se inhiben (Figura 12) (Ashford *et al.*, 1990; Dunn-Meynell *et al.*, 1998).

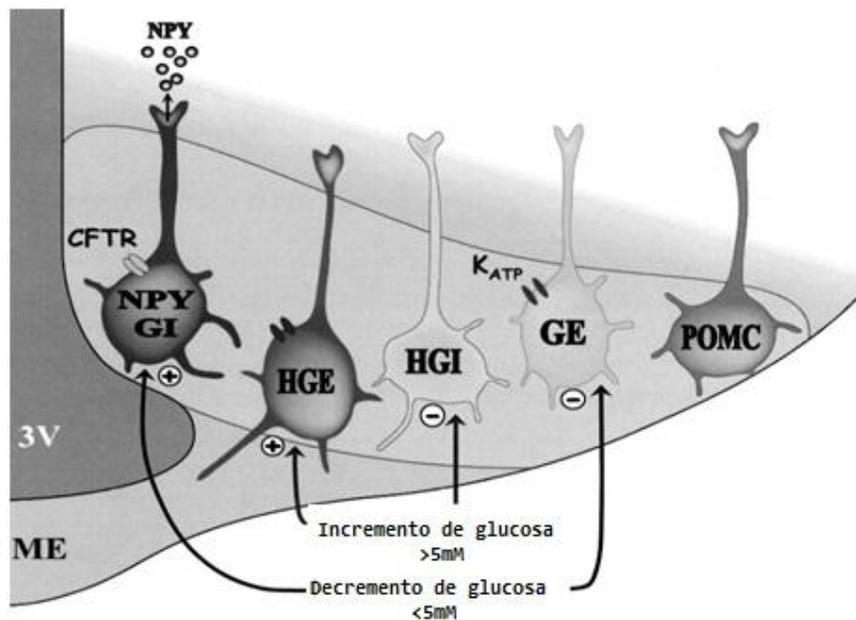


Figura 12. Neuronas sensibles a glucosa. Neuronas activadas e inhibidas por los cambios en la concentración de glucosa plasmática. GI (Inhibidas por glucosa) HGE (estimuladas por alta glucosa), HGI (inhibidas por alta glucosa), GE (estimuladas por glucosa). 3V (tercer ventrículo), ME (eminencia media). Tomada y modificada de Dunn-Meyell, 2004.

5.2. Censo de glucosa

La glucosa al ser la fuente directa de energía requiere de múltiples sensores, los cuales están clasificados de acuerdo al tipo de respuesta que generan, metabólica (hepatocitos), secreción (células beta) o de actividad eléctrica (neuronas). En el cerebro la población de neuronas glucosensibles está localizada en las áreas involucradas en el control de ingestión de alimento y la regulación del sistema autónomo, de los cuales el PVN, el VMH y el ARC son los más estudiados, ya que la expresión de transportadores de glucosa (GLUTs), Glucocinasa y canales de KATP se encuentra ampliamente distribuida. El transportador de glucosa GLUT2 se distribuye en los astrocitos y en algunas neuronas del hipotálamo. La presencia de GLUT2 en estas neuronas genera un cambio en la actividad eléctrica en respuesta a los cambios de concentración de glucosa (Pénicaud *et al.*, 2006).

La participación de GLUT2 en el ARC se demostró por medio de la inyección de un antagonista a dicho transportador, el cual generó un decremento en la ingesta de alimento que se vio reflejado en el peso corporal de los animales (Wang *et al*, 2004). Posteriormente en ratones *knockout* para GLUT2 se mostró que este transportador es indispensable para el funcionamiento adecuado de otros sensores de glucosa en la vena porta (Murphy y Bloom, 2006; Routh, 2010).

Por otra lado, animales con una mutación del gen GLUT-2, muestran disminución en la expresión genética de AgRP y de NPY en respuesta a la hipoglicemia generada por el ayuno, al igual que en POMC y CART por la hiperglicemia tras la alimentación posterior al ayuno, por lo que sugiere que GLUT-2 es necesario para la activación de neuronas tanto orexigénicas como anorexigénicas y así llevar a cabo la respuesta metabólica correspondiente (Bady *et al.*, 2006; Stolarczyk *et al.*, 2010).

Como bien se mencionó antes, la modulación y el censo de glucosa dependen de la activación o inhibición de las neuronas en el ARC. La leptina liberada tras la ingesta de alimento es un activador de neuronas POMC e inhibidor de neurona NPY. Por otra parte la grelina liberada tras largos periodos de ayuno, inhibe las neuronas de POMC y activa las neuronas de NPY (Cowley *et al.*, 2001, 2003; van den Top *et al.*, 2004). Además inyecciones intracerebroventriculares (ICV) de grelina estimulan la alimentación en ratas e incrementan la ganancia de peso; además, tras la infusión de grelina se encontró c-fos en neuronas NPY y AgRP en el ARC. La grelina aumenta la expresión del gen NPY y boquea la reducción de ingesta de alimento inducida por la leptina, generando una interacción competitiva entre la grelina y la leptina en la regulación de la alimentación. De igual manera el ARNm para NPY aumenta después de la infusión de grelina. El incremento de la actividad de neuronas NPY y la reducción de neuronas POMC generan un incremento en la alimentación y la deposición de grasa, mientras que la reducción de neuronas NPY y el aumento de neuronas POMC disminuyen la alimentación y la masa corporal. Por otro

lado, se demostró que la estimulación del 3V genera hipoglicemia incrementando la actividad eléctrica del PVN, estimulando GABA y Glutamato así como elevando las concentraciones de glucosa en plasma (Carey *et al.*, 2013).

Las variaciones diarias de glucosa están controladas predominantemente por las proyecciones del NSQ y el ARC a los órganos periféricos a través del sistema nervioso autónomo. Se propuso que el equilibrio entre el sistema simpático (modula producción de glucosa) y parasimpático (desecho de glucosa) prepara al organismo para el uso de energía al inicio de la actividad (Figura 14). Sin embargo, no todas las áreas receptoras de señales del ARC han sido ampliamente estudiadas, si bien los procesos que desencadenan pueden ser relacionados con un núcleo específico, la vía de señalización central aún es incierta.

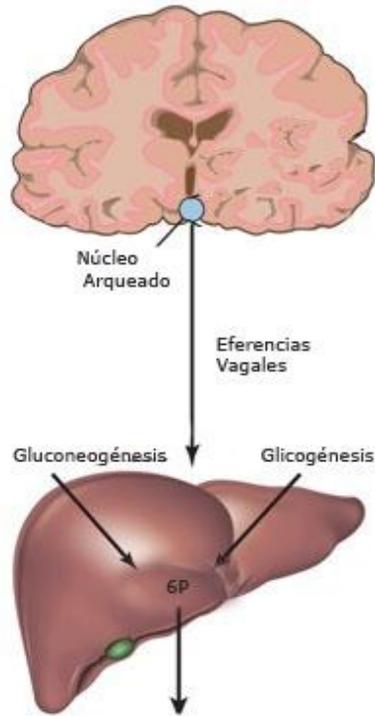


Figura 14. Eje de control sobre la producción de la glucosa. La señalización del ARC por medio de la inervación vagal hacia el hígado modula la producción y uso de glucosa mediante la activación de procesos catabólicos y anabólicos.

6. EL NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO Y EL NÚCLEO ARQUEADO

Debido a que las hormonas y metabolitos captados por el ARC presentan un ritmo que está relacionado con los ciclos luz-oscuridad, es de interés conocer la comunicación del NSQ y el ARC. Uno de los estudios fundamentales para confirmar la comunicación recíproca entre ambos núcleos fue realizado por Yi (2006), en el cual la inyección de la toxina del cólera (CTB, un trazador retrogrado) en el ARC ventromedial marcó neuronas en el NSQ ventrolateral y dorsomedial; de igual manera la infusión de GRHP-6, un estimulador semejante a la grelina activa el ARC en ZT1 y disminuyen la actividad neuronal del NSQ.

Guzmán-Ruiz y colaboradores (2014), demostraron que la activación de neuronas del ARC (α -MSH) depende de la integridad del NSQ puesto que la lesión total o parcial del núcleo genera un decremento en la actividad neuronal del ARC durante la fase de actividad de las

ratas. Por otro lado, dichas neuronas presentan un patrón de actividad de 24 horas con su máxima actividad en por la noche, lapso en el cual se da la ingesta de alimento. En el mismo estudio se demostró la conexión entre el NSQ y ARC por medio de CTB, donde se observaron fibras provenientes del NSQ de manera ipsilateral en el ARC.

La comunicación entre el NSQ y el ARC son fundamentales ya que la alteración de los ritmos de glucosa e insulina genera una disrupción en el circuito del control metabólico. Esta alteración puede crear desordenes fisiológicos que generan obesidad y diabetes (Kalsbeek, 2010).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La lesión del NSQ genera la alteración y la pérdida de diversos ritmos fisiológicos, entre ellos el de la glucosa, la cual presenta un ritmo de 24 horas, con una máxima concentración al inicio de la fase de actividad que desciende en la fase de descanso.

La conexión recíproca del NSQ con el ARC, quien es el encargado de censar y generar la adecuada modulación del metabolismo de la glucosa, es de suma importancia para la respuesta a los cambios metabólicos. Sin embargo, la forma en que se modulan el uno al otro aun es incierta.

Para conocer más acerca de esta modulación se propuso analizar la respuesta en las concentraciones de glucosa plasmática en animales lesionados del NSQ tras un estado hipoglucémico, así como, el comportamiento de la actividad neuronal y la expresión de mensajeros en el ARC bajo las mismas condiciones.

OBJETIVO GENERAL

Analizar la participación del NSQ como modulador de la actividad y respuesta del ARC ante los cambios energéticos del organismo.

OBJETIVOS

Analizar la participación del NSQ sobre la modulación de la secreción de glucosa en animales con hipoglicemia.

Analizar la participación del NSQ en la modulación de la actividad neuronal del ARC y la síntesis de mensajeros orexigénicos y transportadores de glucosa.

HIPÓTESIS

Dado que el NSQ influye en la actividad del ARC, su lesión generará el aumento de la concentración plasmática de glucosa tras un episodio de hipoglicemia inducido. De igual manera, la lesión del NSQ aumentará la actividad neuronal y la producción de mensajeros orexigénicos y del transportador de glucosa, en el ARC en respuesta a la hipoglicemia inducida.

MATERIALES Y MÉTODOS

ANIMALES

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso corporal de 230 a 250 g. Los animales se mantuvieron en condiciones controladas de luz-oscuridad 12:12, con luces encendidas de 07:00 am- 19:00 pm. Con libre acceso a agua y a alimento.

CIRUGÍAS

Se dividieron los animales en dos grupos: el grupo Sham (con cirugía pero sin pasar corriente a través del electrodo) y las ratas con lesión bilateral del NSQ. Todas las cirugías fueron realizadas bajo anestesia por Ketamina (90mg/Kg) /Xilazina (10mg/Kg). Para las lesiones del NSQ se utilizó cirugía estereotáxica y una corriente de 3mA durante 50 segundos (Coordenadas L: 9; AP: 3; V: 80-81 y ángulo de 4°, con bregma como punto 0) obtenidas a partir del atlas "The brain rat in stereotaxic coordinates" (Paxinos y Watson, 2006).

Después de las cirugías los animales tuvieron una semana de recuperación y fueron sometidos a una nueva cirugía para la colocación de una cánula de silicón en la vena yugular (0.94mm diámetro), una semana antes de la infusión de 2 deoxy-D-glucosa (2DG). Se dejaron en recuperación bajo condiciones *ad libitum* de agua y alimento.

Se dio seguimiento de los animales mediante un sistema automatizado de actividad (placas de movimiento) a fin de detectar la pérdida de ritmo locomotor como consecuencia de la lesión completa del NSQ.

Los tratamientos fueron realizados en el punto temporal Zt2 (09:00 h).

Los animales con lesión bilateral confirmada y los animales Sham se dividieron en dos grupos, a un primer grupo se le administró solución salina (3mL) y al segundo 2DG en una dosis de 250mg/Kg (3mL). La administración del tratamiento fue vía intravenosa a través de la cánula colocada en la vena yugular.

Se tomaron muestras de sangre al minuto 0 del experimento y a los 10, 20, 40 y 80 minutos posteriores a la infusión de 2DG o vehículo, con la finalidad de medir glucosa por medio de tiras reactivas y un glucómetro (ACCU-CHEK).

INMUNOHISTOQUÍMICA PARA VIP

Los animales fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital Sódico (0.2mL) y fueron perfundidos con solución salina al 0.9% y fijados con paraformaldehído al 4%. Los cerebros extraídos se mantuvieron en paraformaldehído por 24 horas y después 48 horas en sacarosa 30% para la criopresevación.

Los cerebros fueron congelados y se realizaron cortes coronales seriados de 40µm de grosor, conservando las secciones del Núcleo Supraquiasmático para confirmar la lesión del mismo mediante inmunohistoquímica para VIP.

Los cortes fueron incubados en buffer de bloqueo (PBS, albúmina 0.01%) una noche a 4°C. Posteriormente se incubaron con anticuerpo primario anti VIP preparado en conejo (Millipore) en dilución 1:2000 por una hora a temperatura ambiente (TA) y una noche a 4°C. Después se lavaron tres veces con buffer de fosfatos y cloruro de sodio pH 7.6 (PBS). Enseguida se incubaron con el anticuerpo secundario biotiniado anti conejo (Jackson Inmunoresearch) en una dilución 1:200 por una hora a TA y se realizaron lavados con PBS. Finalmente se incubaron en complejo ABC en una dilución 1:500 por una hora a TA, al terminar la incubación se lavaron tres veces más con PBS. Se realizó el revelado con DAB (3-3 diaminobenzidina), 5mg en 50 mL de TBS (Tris base y cloruro de sodio pH 7.6) con 0.5mL de una solución con iones, Níquel al 10% y 0.6µL de Peróxido de hidrógeno de 30V. Cuando se observó el viraje de color se detuvo la reacción lavando con PBS. Fueron montados y observados al microscopio.

SONDAS

Para la hibridación *in situ* se utilizaron las siguientes secuencias que fueron sintetizados por Sigma-Aldrich usando:

<u>Gen</u>	<u>Secuencia en sentido</u>	<u>Secuencia en Antisentido</u>	<u>Tamaño del producto</u>	<u>Referencia</u>
<u>NPY</u>	<u>TATCCCTGCTCGTGTGTTG</u>	<u>AGGCAGACTGGTTTCACAGG</u>	326 pb	NM_012614.1
<u>AGRP</u>	<u>TCCCAGAGTTCTCAGGTCTAAGTC</u>	<u>ACAGCGACGCGGAGAACGAGA</u>	134 pb	NM_033650.1
<u>GAD67</u>	<u>TACGGGGTTCGCACAGGTC</u>	CCCCAAGCAGCATCCACAT	599 pb	NM_017007.1
<u>GLUT- 2</u>	<u>GCGCTCCCTCTTAAGTGGAA</u>	<u>CGAGGTGGGTAACAGAGACG</u>	425pb	NM_012879

HIBRIDACIÓN *IN SITU* E INMUNOHISTOQUÍMICA

Para analizar la expresión genética y la activación neuronal en el ARC se realizaron técnicas de inmunohistoquímica e hibridación *in situ*, para lo cual los cortes seriados del Núcleo Arqueado fueron conservados en una solución de etilenglicol, glicerol y PBS estéril a -20°C. Durante el proceso se utilizaron reactivos y material estéril libre de RNAsas y agua mili Q tratada con DEPC (Dietilpolicarbonato) igualmente esterilizada libre de RNAsas.

Inmunohistoquímica

Los cortes seleccionados se lavaron con PBS libre de RNAsas y se bloquearon con buffer de bloqueo estéril (PBS libre de RNAsas y Albúmina) por dos horas TA y una noche a 4°C. Posterior a eso se incubaron con anticuerpo primario anti c-Fos (preparado en conejo) a una dilución 1:4000 por una hora TA y después 72 horas a 4°C. Posteriormente se lavaron tres veces con PBS y se colocaron en el anticuerpo secundario biotinilado anti conejo (Jackson immunoresearch) por una horas TA, terminado el tiempo de incubación se lavaron tres veces con PBS y se incubaron en complejo ABC por una hora más a TA. El revelado se realizó con 5 mg de DAB en 40mL de PBS y 6µl de Peróxido de Hidrógeno. La reacción se detuvo con PBS. (Se utilizó un inhibidor de RNAsas (RNAsa out INVITROGEN) 0.25µl/mL en el buffer de bloqueo para evitar la contaminación).

Terminada la inmunohistoquímica se comenzó la hibridación *in situ* lavando los cortes con PBS 1X para una posterior fijación con paraformaldehído 4% durante 5 minutos seguido de un lavado con PBS. Se incubaron a TA durante 5 minutos con Proteinasa K (5µg/mL) en PBS con 0.1% de Tritón X-100. Nuevamente se fijaron en paraformaldehído 4% durante 10 minutos. Se realizaron tres lavados de 5 minutos con PBS y uno más con Agua mili Q tratada con Dietil-pirocarbonato (DEPC) por 3 minutos. Después se colocaron en una solución de Trietanolamina y Anhídrido acético en Agua mili Q DEPC durante 10 minutos seguido de dos lavados más con PBS y uno con Buffer citrato sódico salino (SSC) 2X.

Pre-hibridación

Los cortes se incubaron en solución de hibridación durante dos horas a TA.

Hibridación

Se utilizaron 400ng de cada una de las sondas NPY, AgRP, GAD67 y GLUT-2 / mL de solución de hibridación. La mezcla se incubó en baño maría a 85° C durante 5 minutos con la finalidad de desnaturalizar el RNA. La mezcla se colocó 10 minutos en hielo y se usaron 350µl de mezcla por pozo. La placa se introdujo en una cámara húmeda y se incubó a 60° C toda la noche en un horno de hibridación.

Al día siguiente se realizaron una serie de lavados empezando con SSC 5X a TA para retirar el exceso de sonda, posteriormente un lavado con solución de SSC 5X con 50% de formamida a 60° C durante 30 minutos, seguido de un lavado con SSC 2X con 50% de formamida a 60° C por 30 minutos y un último lavado a 60° C con SSC 0.2X con 25% de formamida por 15 minutos, después un lavado con SSC 0.2X por 5 minutos a TA y finalmente un lavado con buffer 1 (Tris + NaCl pH7.6) por 5 minutos a TA.

Detección Inmunológica

Los cortes se colocaron en una solución de buffer de bloqueo al 1% en buffer 1 de ácido maleico con 0.01% Tween 20 durante 30 minutos a TA. En seguida se incubaron en anticuerpo Anti-digoxigenina marcado con fosfatasa alcalina (preparado en borrego) en buffer de bloqueo en una dilución 1:2000 por dos horas.

Se realizaron 3 lavados con buffer de ácido maleico por 10 minutos y uno más con buffer 2 (Tris-base +Cloruro de Sodio + Cloruro de Magnesio pH 9.7) por 5 minutos.

Desarrollo de color

Los cortes se colocaron en 500µl de una solución reveladora (BM purple AP sustrate Roche) con levamisol (200mg/mL). Se preparó una cámara húmeda y se mantuvo a 33°C durante 24-48 horas. La reacción se detuvo con buffer TE (Tris base+ EDTA) por 5 minutos seguidos de 5 minutos en agua destilada.

Los cortes fueron montados y se cubrieron con buffer de montaje para *in situ* y posteriormente se observaron al microscopio y se tomaron fotografías en aumento 10x (Figura A) para su posterior análisis con el programa Image J.

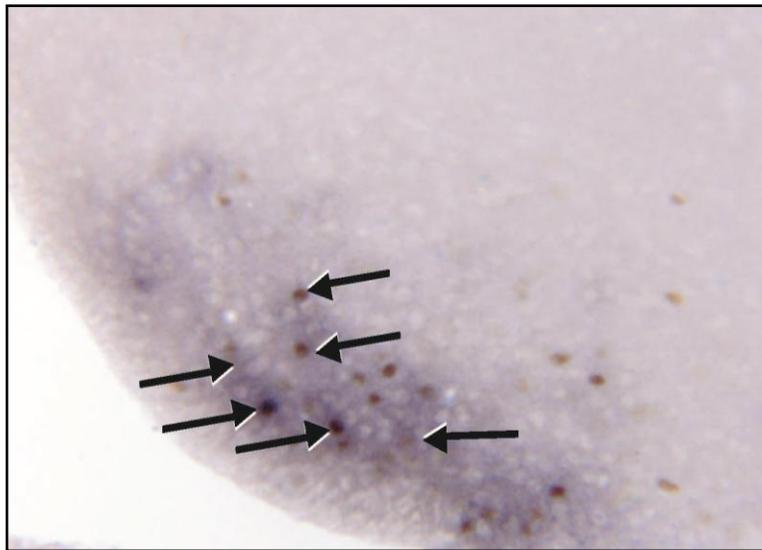


Figura A. Corte de ARC tras Inmunohistoquímica e Hibridación *in situ*. Señalado con las flechas, colocalización de la expresión C-Fos y el gen.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de glucosa se realizó una ANOVA de dos vías, con una significancia $p < 0.05$. Para el análisis de la expresión de mensajeros y activación de c-Fos se utilizó una prueba U Mann-Whitney, la significancia fue establecida en $p < 0.05$. Los grados de libertad fueron establecidos por el número de cortes por grupo.

RESULTADOS

1. Pérdida de la actividad locomotora en animales lesionados

Para verificar las lesiones del núcleo supraquiasmático se realizó inmunohistoquímica para VIP en animales con lesión bilateral del NSQ (Figura 15 B) y en animales Sham (Figura 15 A). Se monitoreo la actividad de los animales para obtener el registro de su actividad locomotora (actogramas). En los animales con lesión bilateral del NSQ se observó ausencia de VIP aunada a la pérdida del ritmo de la actividad locomotora.

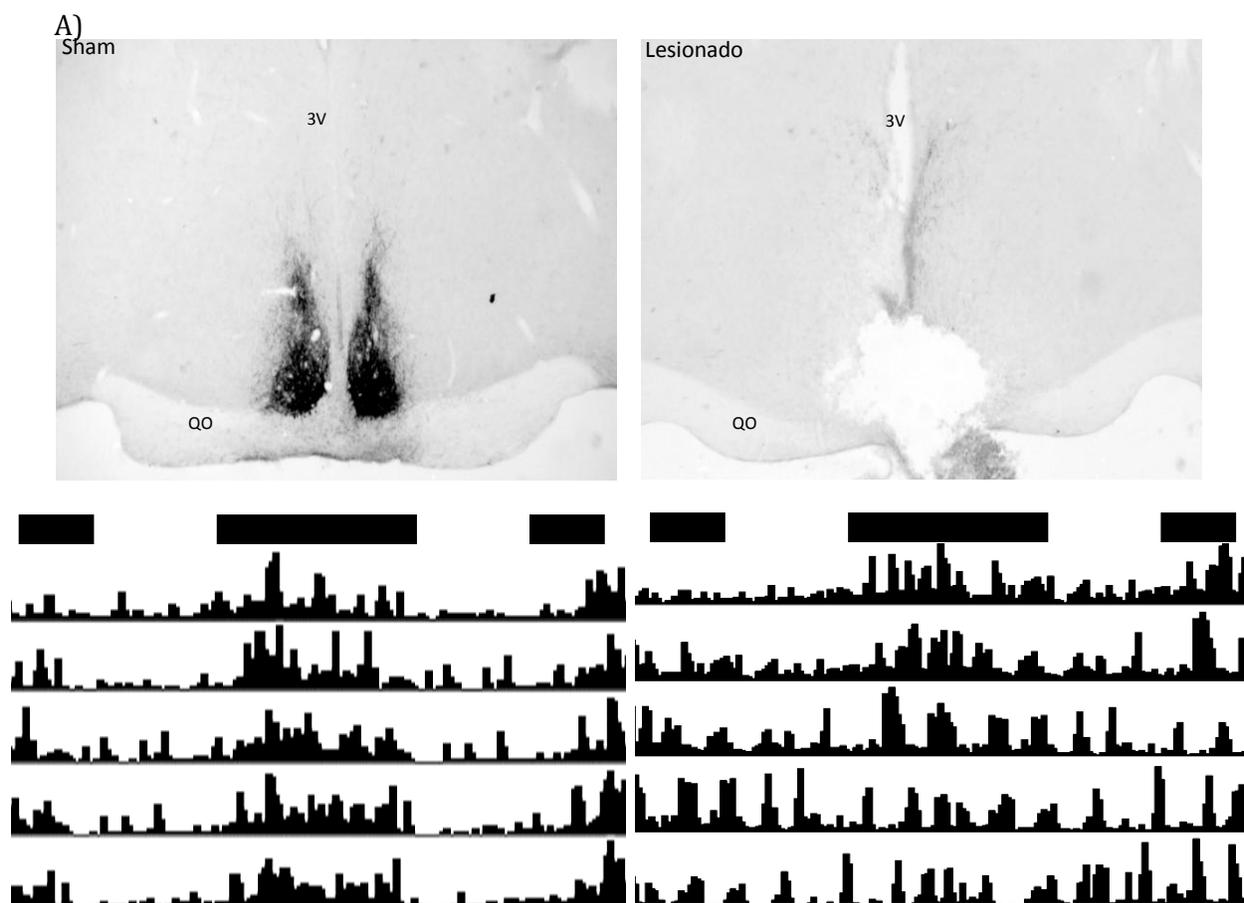


Figura 15. Actividad locomotora de animales Sham o con lesión bilateral de NSQ. A) Tinción de VIP en el Núcleo supraquiasmático de animales Sham o Lesionado bilateral. B) Actograma de actividad en animales Sham y lesionados (barras negra representan el periodo de oscuridad; 3v: Tercer Ventrículo; QO: Quiasma óptico).

2. Aumento de glucosa plasmática en animales lesionados

Para determinar el efecto de la lesión del NSQ en el control de la respuesta a la hipoglicemia se analizó la concentración de glucosa plasmática en animales Sham o con lesión bilateral tras un reto con 2DG.

En los animales, tanto Sham como con lesión del NSQ, se observó un aumento significativo en la concentración de glucosa plasmática después de la infusión de 2DG con un pico a los 10 minutos. Sin embargo, la concentración del grupo Sham presenta un descenso hasta el minuto 40, mientras que en el grupo de lesión del NSQ a los 20 minutos ya ha descendido (Figura 16).

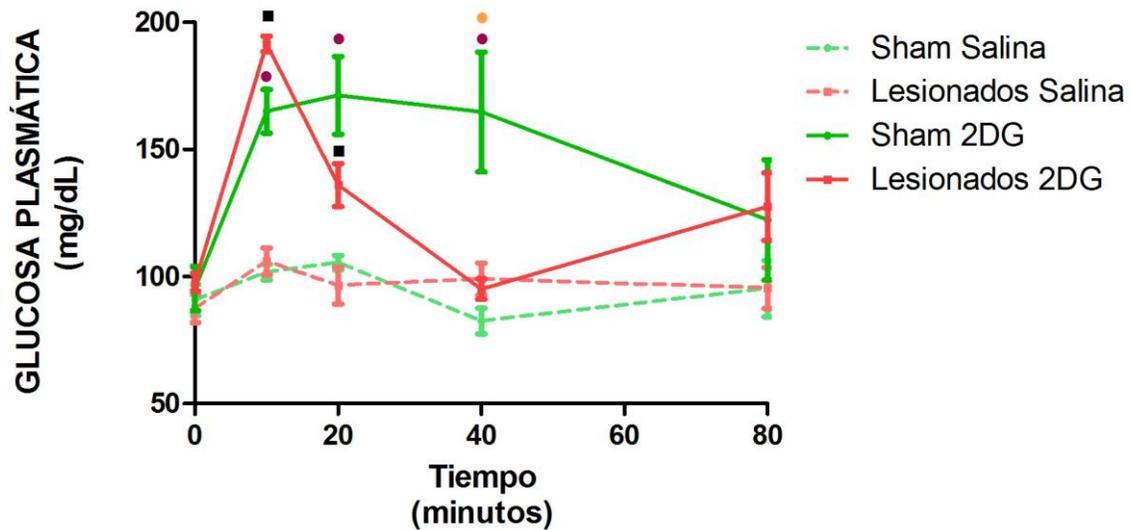


Fig 16. Concentración de glucosa plasmática en animales Sham o con lesión del NSQ tras reto hipoglicémico con 2DG. Concentración de glucosa (mg/dL) por tiempo (min) en animales Sham (verde) y lesionados bilateralmente (rojo) tras la infusión de salina o 2DG. ■ Lesionados 2DG vs. Lesionados salina y Sham salina. ● Animales sham 2DG vs. Sham salina y lesionado salina. ● Sham 2DG vs. Lesionado 2DG. ANOVA DOS VÍAS. $p < 0.05$.

3. Aumento en la actividad neuronal en el ARC en animales con lesión bilateral del NSQ

Para conocer la participación del NSQ en la activación neuronal del ARC ante la hipoglicemia inducida por la infusión de 2DG, se realizó inmunohistoquímica para la proteína c-Fos, la cual se expresa cuando las neuronas se despolarizan, indicando actividad neuronal.

En la Figura 17 se muestra la media de neuronas positivas a c-Fos en el ARC tras la inyección de 2DG en animales Sham o animales lesionados bilateralmente. Se observó un aumento significativo en la actividad neuronal en los animales con lesión bilateral del NSQ en comparación con los animales Sham.

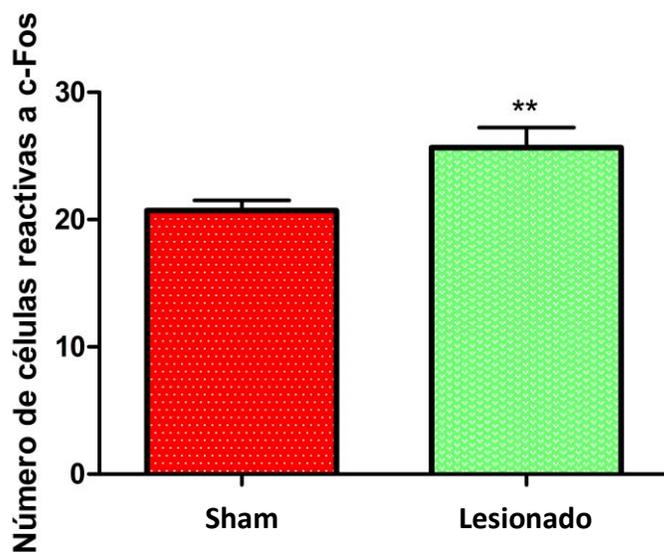


Fig 17. Activación neuronal del ARC en animales con hipoglicemia. Neuronas positivas a c-Fos en animales tras la inyección de 2DG. Promedio de neuronas activadas en el núcleo arqueado en ZT2 con un aumento significativo **($p=0.0067$) en animales con lesión bilateral. Análisis con prueba U Mann Whitney; estableciendo el valor de significancia en $p<0.05$.

4. Expresión de mensajeros en el ARC

Dado que la activación neuronal aumentó en los animales con lesión bilateral del NSQ, la siguiente pregunta a resolver fue ¿Cómo es afectada la expresión de mRNA de los genes implicados en el control metabólico de la glucosa? Para ello se analizó la expresión de cuatro mensajeros: NPY, AgRP, GAD67 y GLUT-2.

El primer análisis se realizó sobre el mensajero NPY, en la Figura 18 se muestra un corte transversal del ARC tras la técnica de hibridación *in situ* e inmunohistoquímica para c-Fos, donde se aprecia la distribución de NPY en el ARC. Por otro lado se muestran las gráficas de colocalización (Figura.19 A) entre neuronas reactivas a c-Fos y que expresan NPY, en la que se observa una disminución en los animales lesionados del NSQ vs. Sham; la densidad de expresión de mRNA (Figura19 B) sin diferencias significativas, y por último la gráfica del porcentaje de área ocupado por la expresión del mRNA de igual manera sin diferencias significativas entre ambos grupos.

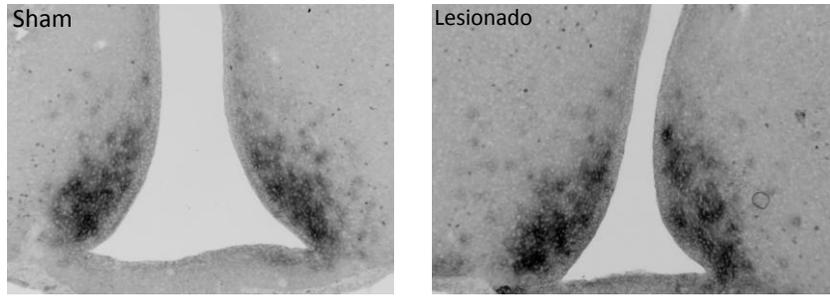


Figura 18. Corte transversal del ARC tras hibridación *in situ* para el mensajero NPY e inmunohistoquímica para c-Fos. Sección del ARC de animales Sham y con lesión del NSQ.

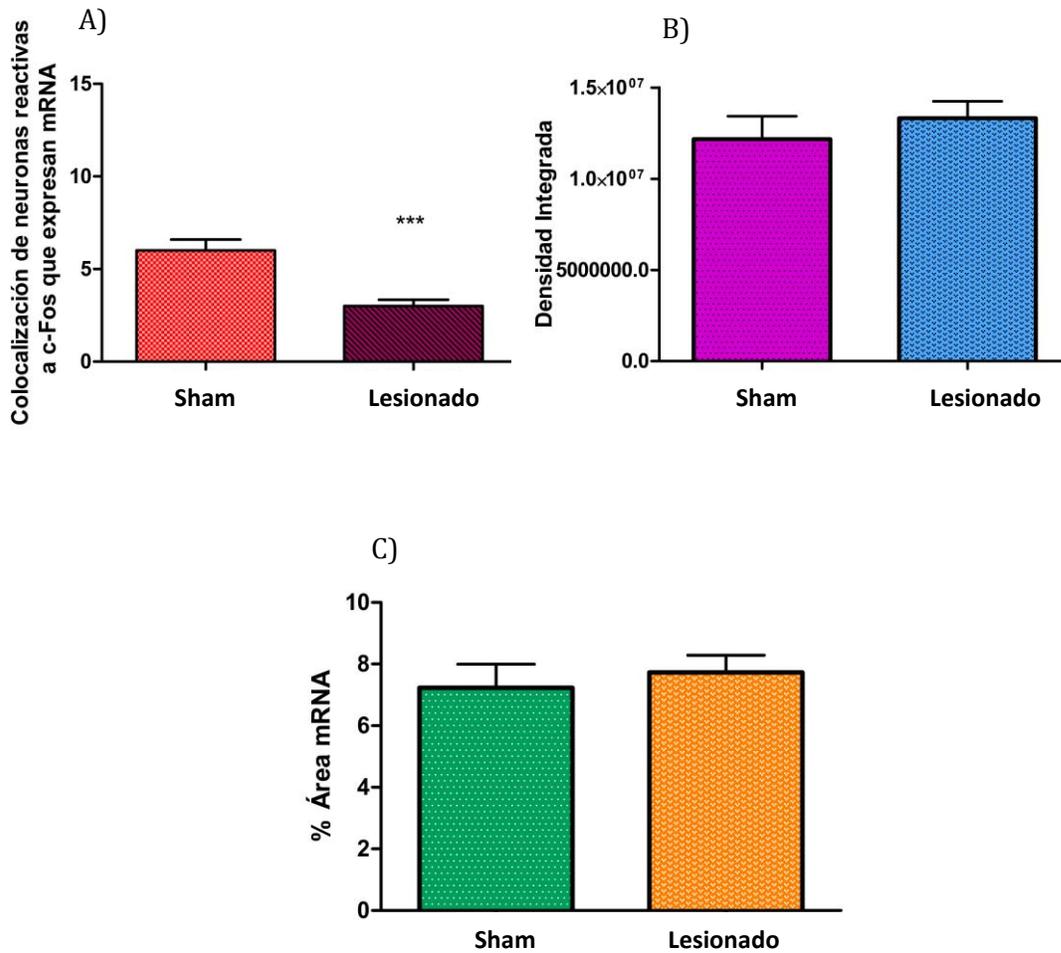


Fig. 19. Expresión del mensajero NPY en el ARC en animales lesionados del NSQ bajo condiciones de hipoglicemia. **A)** Co-localización entre neuronas positivas a c-Fos y que expresan NPY en el ARC ***($p=0.0003$). **B)** Densidad integrada de la expresión del mensajero en animales Sham o con lesión. **C)** Porcentaje de área ocupada por la expresión de NPY. Se presentan la medias de los datos para cada parámetro. Análisis con prueba U Mann Whitney; estableciendo el valor de significancia en $p<0.05$.

De igual manera se analizó la expresión de AgRP en el ARC (Figuras 20-21) la cual presenta disminución significativa en el número de colocalizaciones entre neuronas c-Fos y las que expresan el mensajero a AgRP entre el grupo control y lesionado. (Figura 20 A) .Del mismo modo la densidad (Fig-20 B) y el área (Figura 20 C) de expresión del mensajero presentan disminución significativa en el grupo de animales lesionados respecto a la observada en los animales Sham.

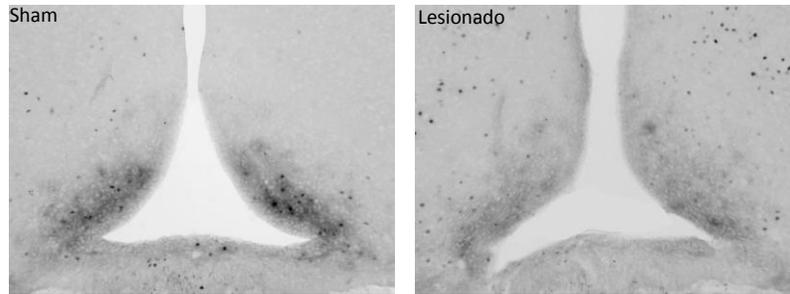


Figura 20. Corte transversal del ARC tras hibridación *in situ* para AgRP e inmunohistoquímica para c-Fos. Sección de ARC en animales Sham y con lesión del NSQ.

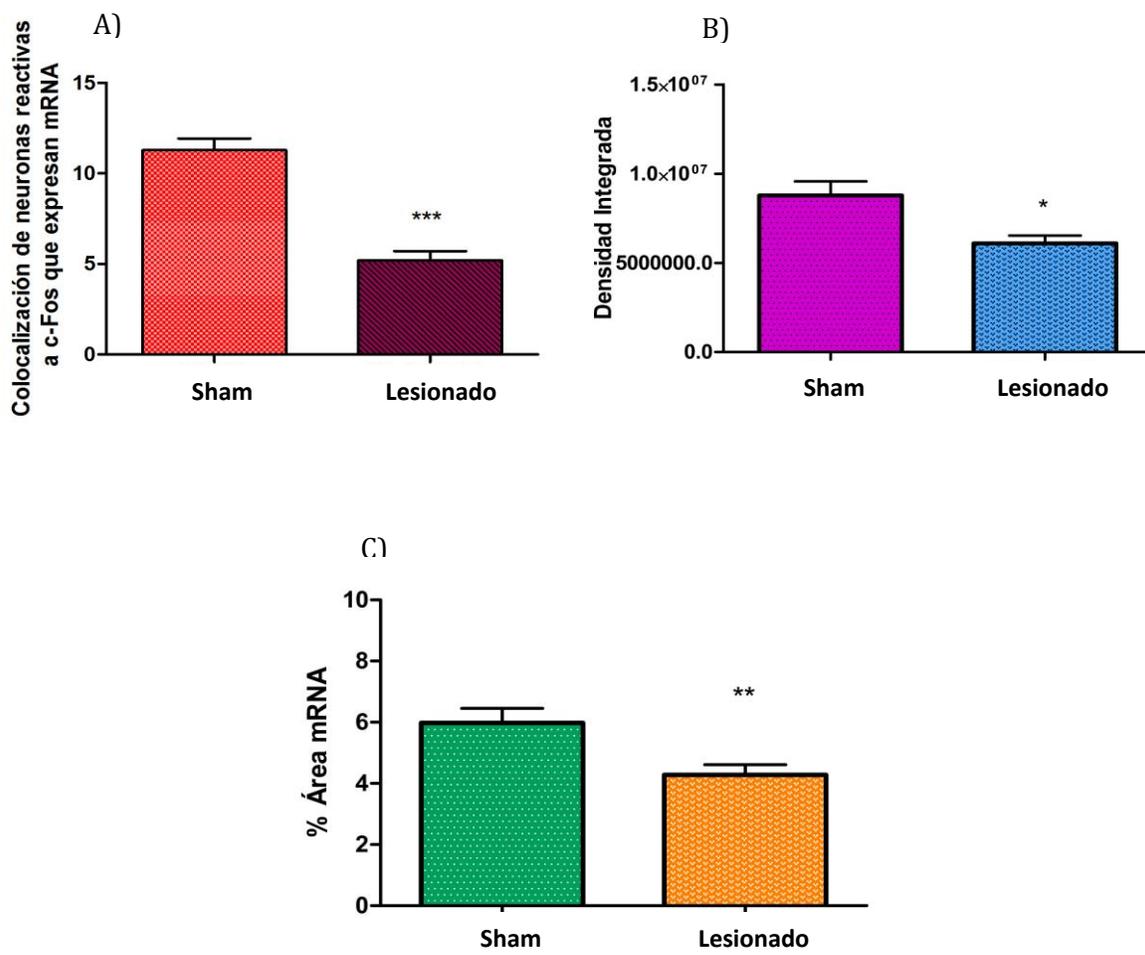


Fig. 21. Expresión de AgRP en el ARC en animales lesionados del NSQ bajo condiciones de hipoglicemia. **A)** Colocalización entre neuronas positivas a c-Fos y expresión de AgRP en el arqueado ***($p=0.0001$). **B)** Densidad integrada de la expresión de AgRP en animales Sham y lesionado con una disminución significativa en el último grupo *($p=0.0187$). **C)** Porcentaje de área ocupada por la expresión del mensajero **($p=0.0060$). Análisis con prueba U Mann Whitney; estableciendo el valor de significancia en $p<0.05$.

Posteriormente se analizó la expresión de GAD67 (Figura 22) precursor que sintetiza GABA en diversas áreas cerebrales, entre ellas el ARC. Se observó (Figura 23 A) una disminución en el número de colocalizaciones y un aumento significativo en la expresión de GAD67 (Figura 23 B), sin diferencias significativas en el área de expresión del mensajero.

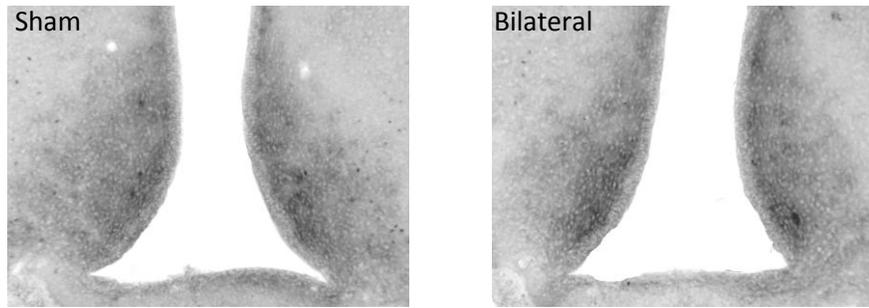


Figura 22. Corte transversal del ARC tras hibridación *in situ* para GAD67 e inmunohistoquímica para c-Fos. Sección de ARC en animales Sham y con lesión del NSQ.

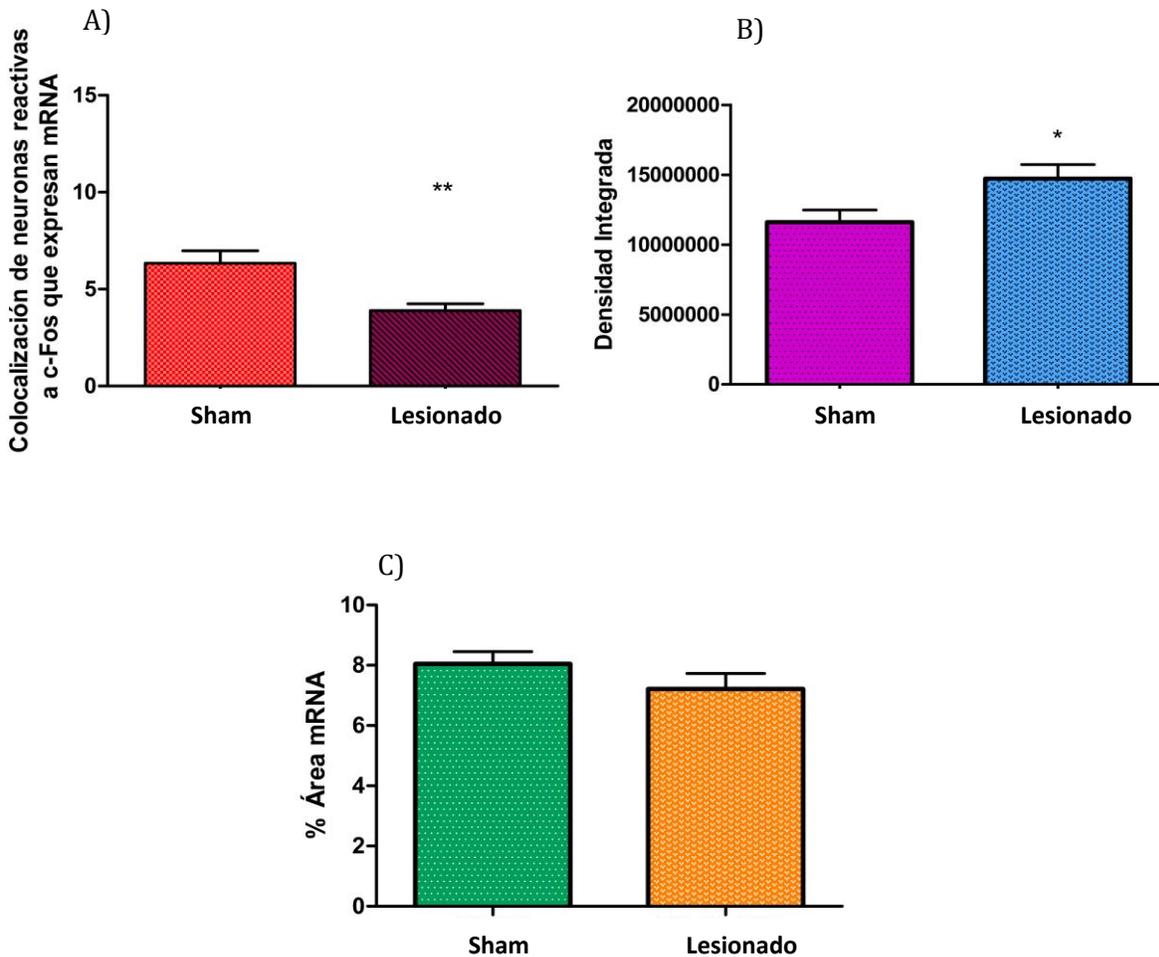


Figura 23. Expresión del mensajero GAD67 en el ARC en animales con lesión del NSQ en estado hipoglicémico. **A)** Colocalización de neuronas positivas a c-Fos y la expresión de GAD67 en el arqueado. **B)** Densidad integrada de la expresión de GAD67 en animales Sham y lesionados, aumento significativo en el grupo lesionado *($p=0.0116$). **C)** Porcentaje de área ocupada por la expresión de GAD67 en el ARC. Se presentan las medias de los datos de cada parámetro. Análisis con prueba U Mann Whitney; estableciendo el valor de significancia en $P<0.05$.

Debido a la importancia de los transportadores para el censo cerebral de glucosa se analizó la expresión del transportador GLUT-2 (Figura 24-25) donde se observó una disminución significativa en el número de colocalizaciones con c-Fos (Figura 25 A) y un aumento significativo en el grupo con lesión (Figura 25 B), sin cambios significativos en el porcentaje de área de expresión (Figura 25 C).

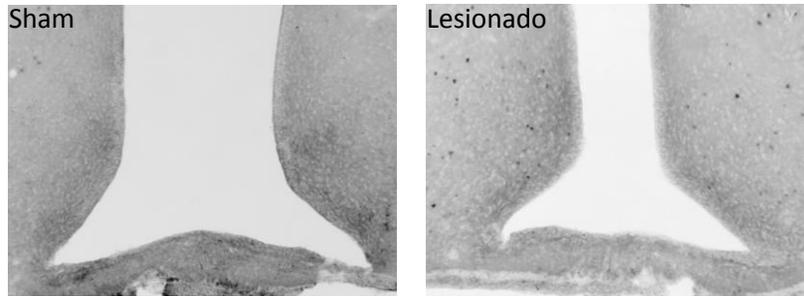


Figura 24. Corte transversal del ARC tras hibridación *in situ* para GLUT2 e inmunohistoquímica para c-Fos. Sección del ARC en animales Sham y con lesión del NSQ.

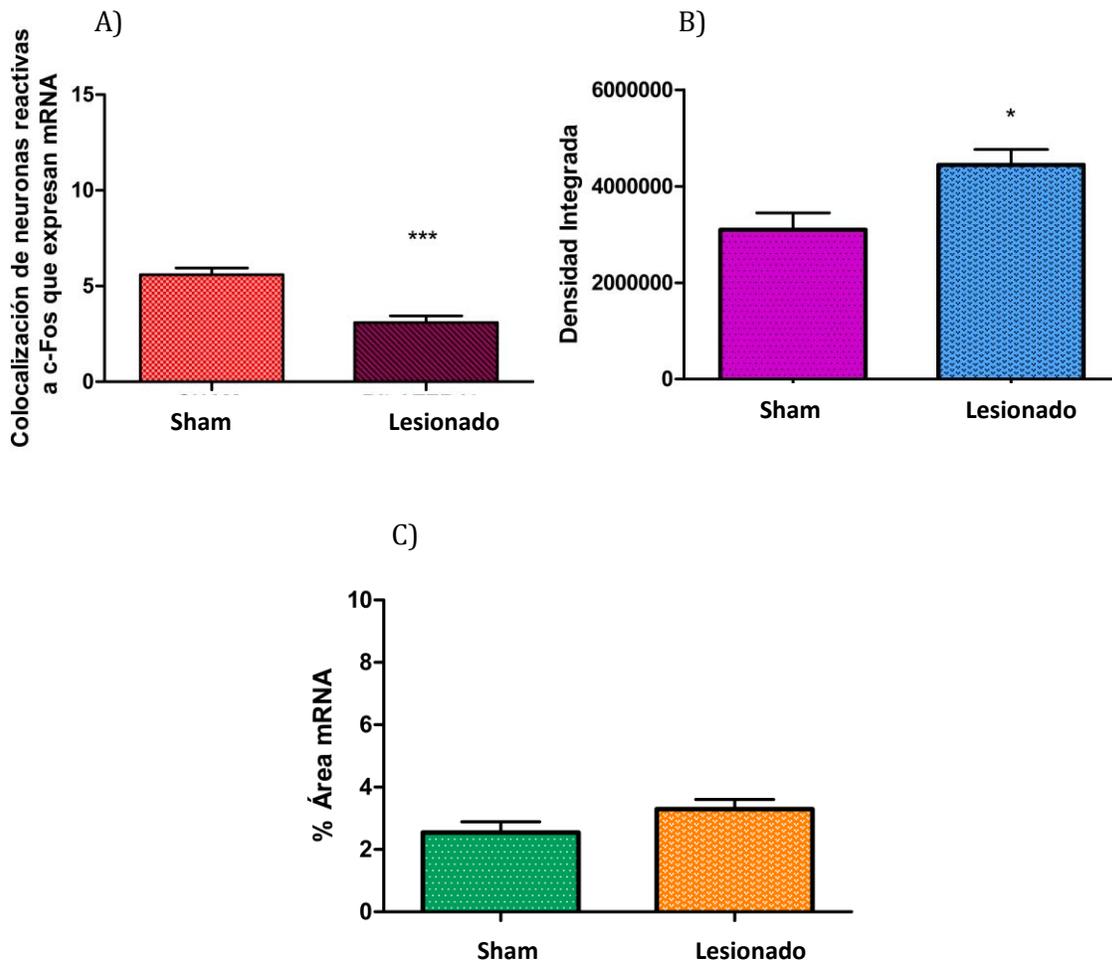


Figura 25. Expresión del gen GLUT-2 en el ARC en animales con lesión del NSQ en estado hipoglicémico. **A)** Colocalización de neuronas positivas a c-Fos y expresión de GLUT-2 en el arqueado (***) ($p=0.003$). **B)** Densidad integrada de la expresión de GLUT-2 en animales Sham y lesionados. Aumento significativo en grupo lesionado * ($p=0.011$). **C)** Porcentaje de área ocupada por la expresión de GLUT-2 en el arqueado. Se presentan las medias de los datos de cada parámetro analizado. Análisis con prueba U Mann Whitney; estableciendo el valor de significancia en $P<0.05$.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los presentes resultados muestran que la lesión del NSQ induce la pérdida del ritmo de actividad locomotora, lo que concuerda con estudios anteriores (Moore, 1972; Stephan y Zucker, 1972; Menaker, 1990; Dann, 2010).

Los animales Sham presentan tolerancia a la glucosa, es decir, la glucosa plasmática no es metabolizada por los tejidos. Se ha demostrado que las ratas presentan una mayor tolerancia a la glucosa al inicio de la fase de actividad (Kalsbeek, 2004, 2006), además de una menor sensibilidad a la insulina al inicio de la fase de descanso (la Fleur, 2001; Kalsbeek, 2004); lo que genera un menor uso de glucosa por parte del organismo. Los animales con lesión del NSQ de nuestro estudio presentan una alteración en la respuesta a la hipoglicemia. Muestran un aumento brusco en la concentración de glucosa seguido de un descenso rápido dentro de los primeros 30 minutos. Esta respuesta en los niveles de glucosa coincide con lo encontrado en estudios de la Fleur (1999,2001); donde muestra un incremento en la concentración de glucosa e hiperfagia como respuesta a la lesión del NSQ o a la hipoglicemia. Por otro lado, la diferencia entre la disminución de las concentraciones de glucosa plasmática entre el grupo Sham y lesionado del NSQ indica un aumento, en los animales con lesión de NSQ, en el uso de la glucosa por parte de los tejidos como el músculo esquelético. Estudios previos muestran que el NSQ es el encargado de disminuir el uso de glucosa dependiente de insulina por parte de los tejidos en la fase de descanso, por lo cual, la ausencia del NSQ aumenta la sensibilidad a insulina promoviendo el uso de la glucosa (la Fleur, 2001; Kalsbeek, 2006).

Además de la glucosa plasmática se analizó la actividad neuronal en el ARC, y se encontró un aumento en el grupo de animales lesionados en comparación con el grupo Sham; lo que coincide con estudios previos. Lo que indica que la actividad del NSQ modula de manera inhibitoria la actividad neuronal del ARC durante la fase de descanso de los animales (Guzmán-Ruíz, 2015; Moro-Chao, 2015).

Del mismo modo se analizó la síntesis de los mensajeros que responden al estado de hipoglicemia: NPY y AgRP, así como su colocalización con el marcador de actividad neuronal c-Fos. En el caso del mensajero NPY, se encontró que su síntesis es similar en el grupo Sham y de lesión del NSQ, con una tendencia a incrementar en los animales lesionados, sin ser estadísticamente significativa. Por otro lado, el número de células que presentan el mensajero y que a su vez están activas fue menor en los animales con lesión del NSQ. Este resultado indica que el mensajero se sintetiza en respuesta a la hipoglicemia, sin embargo, las neuronas que lo expresan no se encuentran activas. Ya que el NSQ modula de manera inhibitoria la actividad neuronal en el ARC (Yi, 2006; Moro-

Chao, 2015), se esperaría un aumento en la actividad neuronal de NPY, sin embargo, se encontró lo opuesto, por lo que se propone la modulación inhibitoria por parte de las neuronas α -MSH. Se ha observado que dichas neuronas son activadas por metabolitos como la insulina y la glucosa (Morton, 2006; la Fleur y Kalsbeek, 2014) y que inhiben a las neuronas NPY (Cowley *et al.*, 2001; Guzmán, 2015; Moro-Chao, 2015).

Se ha descrito que las neuronas del ARC envían proyecciones hacia el PVN, mismas que liberan NPY en respuesta a la disminución en la concentración de glucosa plasmática (Cone 2005; Morton, 2005, Zhang, 2006). El PVN a su vez envía información hacia núcleos en los que se originan fibras de tipo simpático y parasimpático que inervan órganos como el hígado, páncreas y estómago, que modulan la liberación de glucosa e ingesta de alimento (la Fleur *et al.*, 1999; Cailotto, 2005, Kalsbeek, 2006; Cuesta *et al.*, 2009). Por lo tanto, la falta de actividad en las neuronas NPY podría resultar en la ausencia de liberación del neuropéptido hacia el PVN y por tanto una inhibición de la respuesta orexigénica. Se sugiere, en estudios posteriores, realizar el análisis de la actividad neuronal en el PVN, así como de la ingesta de alimento en animales bajo las mismas condiciones.

Al analizar el mensajero AgRP se encontró una disminución en su expresión y en el número de células activas que lo expresan. Las neuronas AgRP también son inhibidas por la activación de las neuronas α -MSH y POMC/CART (Horvath, 2004), por lo que podrían ser inhibidas al igual que las neuronas que expresan el NPY.

Como se menciona anteriormente la activación de las neuronas α -MSH (Guzmán-Ruíz, 2015) y POMC/CART (Horvath, 2004) inhiben la actividad de neuronas orexigénicas, por lo que, en este estudio, el aumento en la actividad neuronal total observada en el ARC de los animales con lesión del NSQ, puede estar dado por la activación de dichas neuronas.

Además de los péptidos que responden a la hipoglicemia, los transportadores de glucosa son fundamentales para la integración de las señales metabólicas y la respuesta a las mismas (Bady *et al.*, 2006; Murphy y Bloom, 2006; Stolarczyk *et al.*, 2010). En el presente trabajo se encontró que la lesión del NSQ aumenta la síntesis de GLUT-2 en el ARC. Este aumento puede deberse a la necesidad de la célula de aumentar el transporte de glucosa ante la disminución del azúcar en el plasma, lo que ha sido reportado previamente (Hill, 2006). Por otro lado, las neuronas activadas que sintetizan GLUT2 disminuyen en los animales con lesión de NSQ, sugiriendo una disminución en la salida de información de dichas neuronas, alterando la respuesta del ARC a los cambios de glucosa plasmática.

El papel del GABA en la modulación de los sistemas metabólicos es inhibitorio (Carey *et al.*, 2013). En este estudio se encontró un aumento en la expresión de su precursor (GAD67) en el ARC tras el evento de hipoglicemia. Esto puede ser interpretado como una

síntesis aumentada del mensajero en respuesta a la falta de glucosa, lo que corresponde con el reporte previo de Carey y colaboradores (2013). Por otro lado, existe una disminución en el número de neuronas activadas que sintetizan el mensajero para GAD67. Lo que puede deberse a la ausencia de las proyecciones del NSQ que hacen contacto con las neuronas GABAérgicas del ARC; que en el animal intacto son estimulantes y utilizan como neurotransmisor al GRP (Gúzman, 2015) y al VIP (Horvath *et al.*, 1984).

En conjunto, los resultados presentados en este estudio muestran que el NSQ modula la actividad neuronal en el ARC y la respuesta a los cambios metabólicos, así como la síntesis del RNAm de genes orexigénicos. A pesar de que el número de neuronas inmunoreactivas a c-Fos aumenta en animales con lesión del NSQ tras la infusión de 2DG, el análisis de la coexpresión con los mensajeros evaluados no lo refleja, por lo que se propone un circuito que incluye la activación de neuronas POMC/CART y α -MSH que, al igual que NPY/AgRP, modulan la respuesta a los cambios en los niveles de metabolitos como la glucosa y hormonas como la insulina y la leptina. Así como la posible señalización hacia los núcleos PVN, DMH y el NTS; todos ellos centros de control de la ingesta de alimento y encargados de su inicio y prolongación (Sternson, 2012).

CONCLUSIONES

El NSQ modula de manera inhibitoria el uso de glucosa dependiente de insulina en los órganos y tejidos durante la fase de descanso.

El NSQ modula de manera inhibitoria la actividad neuronal del ARC.

El NSQ modula de manera excitatoria la actividad de las neuronas en el ARC que sintetizan los mensajeros que codifican para NPY, AgRP, GAD67 y GLUT-2.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar-Roblero R, Guadarrama P, Mercado C, Chávez J. 2004. El núcleo supraquiasmático y la glándula pineal en la regulación de los ritmos circadianos en roedores. Departamento de Neurociencias. Instituto de Fisiología Celular. Universidad Nacional Autónoma de México. México p. 321-330.
- Antle M, Silver R. 2005. Orchestrating time: arrangements of the brain circadian clock. *Elsevier*. 28-3: 145-151.
- Ashford M, Borden P, Treherne J. 1990. Glucose-induced excitation of hypothalamic neurons is mediated by ATP-sensitive K⁺ channels. *PfugersArchiv*. 415: 479-483.
- Bady I, Marty N, Michael D, Emery M, Gyer J, Tarussio D, Thorens B. 2006. Evidence from *glut2*-null mice that glucose is a critical physiological regulator of feeding. *Diabetes*. 55: 988-995.
- Bell G, Kayano T, Buse J, Burnat C, Lin D, Seino S. 1990. Molecular Biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care*. 13:198-208.
- Buijs R, Kalsbeek A, Van Der W, Van H. 1993. Suprachiasmatic nucleus lesion increase corticosterone secretion. *American Journal of Physiology*. 264: 1186-1192.
- Buijs R, Kalsbeek A. 2002. Output pathways of the mammalian suprachiasmatic nucleus: coding circadian time by transmitter selection and specific targeting. *Cell Tissue Research*. 309:109-118.
- Buijs R. 1996. The anatomical basis for the expression of circadian rhythms: the efferent projections of the suprachiasmatic nucleus. *Progress in Brain Research*. 111: 229-240.
- Cailotto C. 2005. The suprachiasmatic nucleus organizes daily physiology an analysis of the role of the autonomic nervous system and peripheral clock genes. Faculte it der Geneeskunde. Amsterdam. p 152.
- Cardinali D. 1992. *Neurofisiología*. Ediciones Díaz de Santos. Madrid. p 339.
- Carey M, Kehlenbrink S, Hawkins M. 2013. Evidence for central Regulation of Glucose Metabolism. *The journal of biological chemistry*. 288: 49: 34981-34988.
- Cone R, Cowley M, Butler A. 2001. The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*. 25:63-69.
- Cowley A, Smith R, Diano S, Tschöp, Pronchuk N, Grove K, et al. 2003. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* .37: 649-661.

-
- Delgado J. 2010. *Ritmos Biológicos*. Facultad de Biología, Universidad Sevilla. España. p. 320.
 - Dunn-Meynell A, Rawson E, Levin E. 1998. Distribution and phenotype of neurons containing the ATP-sensitive K⁺⁺ channel in rat brain. *Brain Research*. 814: 41-54.
 - Fry M, Hoyda T, Ferguson A. 2007. Making Sense of It: Roles of the Sensory Circumventricular Organs in Feeding and Regulation of Energy Homeostasis. *Exp Biol Med*. 232:14–26.
 - Gruart A, Delgado J.M., Escobar C., Aguilar-Roblero R. 2002. Los relojes que gobiernan la vida. La ciencia para todos. Vol. 188. Fondo de Cultura Económica. México, D.F.
 - Guzmán-Ruiz M, Saderi N, Cazarez-Márquez F, Guerrero-Vargas N, Basualdo MC, Acosta-Galván G, Buijs R. 2015. The suprachiasmatic nucleus changes the daily activity of the arcuate nucleus α -MSH neurons in male rats. *Endocrinology*. 155:525-535.
 - Hamada T, Shibata S, Tsuneyoshi A, Tominaga K, Watanabe S. 1993. Effect of somatostatin on the circadian rhythms of firing and 2-deoxyglucose uptake in the rat suprachiasmatic slices. *American Journal of Physiology*. 265: 1199-1204.
 - Hill R, Wyse G. 2006. *Fisiología Animal*. Ed. Médica Panamericana. Argentina. p. 1038.
 - Horvath, L. 2004. Rapid Rewiring of Arcuate Nucleus Feeding Circuits by Leptin. *Science* 304:110-117
 - Inouye S, Kawamura H. 1979. Characteristics of a Circadian Pacemaker in the Suprachiasmatic Nucleus. *Journal of Comparative Physiology*. 146:153-160.
 - Inouye S. 1996. Circadian rhythms of neuropeptides in the suprachiasmatic nucleus. Chapter 6. *Progress in Brain Research*. 111: 75-96.
 - Johnson K, Gross P. 1993. Sensory circumventricular organs and brain homeostatic pathways. *FASEB Journal*. 7: 678-68.
 - Kalsbeek A, Foppen E, Schlij I, Van Heijningen C, Van der Vliet J, Fliers E, Buijs R. 2008. Circadian control of the daily plasma glucose rhythm: An interplay of GABA and Glutamate. *PLoS ONE*. 3: e3194.
 - Kalsbeek A, Ruiters M, La Fleur S, Cailotto C, Kreier F. 2006. The hypothalamic clock and its control of glucose homeostasis. *Progress in Brain Research*. 153: 283–307.
 - Kalsbeek A, Buijs RM, Engelman M, Wotjak CT. 1995. In vivo measurement of a diurnal variation in vasopressin release in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Research*. 682:78-82.
 - Klein D, Moore R, Reppert S. 1991. *Suprachiasmatic Nucleus. The mind's clock*. Oxford University Press. EUA. p. 467.

-
- Koukkari W, Sothorn R. 2006. *Introducing biological rhythm. SpringerScience. USA.* P. 674.
 - Koukkari W, Sothorn R. 2006. *Introducing Biological rhythms A primer on the temporal organization of life, With implications for health, society, reproduction And the natural environment.* Springer Science_Business Media, Inc. pp 674.
 - la Fleur S, Kalsbeek A, Wortel J, Buijs R. 1999. A Suprachiasmatic nucleus generated rhythm in basal glucose concentrations. *Journal of Neuroendocrinology.* 11: 643–652.
 - la Fleur S, Kalsbeek A, Wortel J, Fekkes M, Buijs R. 2001. A Daily Rhythm in Glucose Tolerance: A Role for the Suprachiasmatic Nucleus. *Diabete.* 50: 1237-1243.
 - la Fleur S. 2003. Daily rhythms in glucose metabolism: Suprachiasmatic nucleus output to peripheral tissue. *Journal of Neuroendocrinology.* 15:315–322.
 - Lehman N, Silver R, Gladstone R, Kahn M, Gibson M, Bittman E. 1987. Circadian rhythmicity restored by neural transplant. Immunocytochemical characterization of the graft and its integration with the host brain. *J. Neurosci.* 7:1626–38.
 - Leibowitz S, Wortley K. 2004. Hypothalamic control of energy balance: different peptides, different functions. *Peptides.* 25: 473-504.
 - Menaker M. 1990. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* 247:975-978.
 - Meyer-Bernstein L, Morin P. 1999. Electrical stimulation of the median or dorsal raphe nuclei reduces light-induced FOS protein in the suprachiasmatic nucleus and causes circadian activity rhythm phase shifts. *Neuroscience* 92:267–79.
 - Moore R, Eichler B. 1972. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res.* 42:201–6
 - Moore R, Speh J. 1993. GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. *Neuroscience.* 150:112-116.
 - Moore R. 1996. Entrainment pathways and the functional organization of the circadian system. Chapter 8. *Progress in Brain Research.* 11:103-111.
 - Morton G. 2005. Leptin action in the forebrain regulates the hindbrain response to satiety signals. *The journal of Clinical Investigations.* Vol.115.
 - Morton G. 2006. Central Nervous System control food intake and body weight. *Nature.* Nature.
 - Murphy K, Bloom S. 2006. Gut hormones and the regulation of energy homeostasis. *Nature.* 444:854-859
 - Navarro M, Rodríguez-Fonseca F, Alvarez E, Chowen J, Zueco J, Gómez R, Blázquez E. 1996. Colocalization of glucagon-like peptide-1(GLP-1) receptors,

-
- glucosetransporter GLUT-2, and glucokinase mRNAs in rat hypothalamic cells. *Journal of Neurochemistry*. 67: 1982-1991.
- Oomura Y, Ono T, Ooyama H, Wayner M. 1969. Glucose and osmosensitive neurones of the rat hypothalamus. *Nature*. 222: 282-284.
 - Oomura Y, Yoshimatsu H. 1984. Neural network of glucose monitoring system. *Journal of the AutonomicNervousSystem*. 10: 359-372.
 - Pamies M. 1998. *Psicobiología*. Ediciones Barcelona. España. p. 251.
 - Paxinos G, Watson C. 2006. *The brain rat: in stereotaxic coordinates*. 6ta Ed. Elsevier. China. p 462.
 - Pénicaud, *et al*, 2006 Brain glucose sensing: a subtle mechanism Luc Pe´nicaud, Corinne Leloup, Xavier Fioramonti, Anne Lorsignol and Alexandre Benani
 - Randall D, Burggren W y French K . 2001. *Animal Physiology, mechanisms and adaptations*. W.H. Freeman and Company, 5º Edición, Cap 1:8-10.
 - Reppert M, Weaver D. 2002. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*. 418:935-941.
 - Rodríguez-Fonseca F, Navarro M, Álvarez E, Roncero I, Chowen J, Blázquez E. 2000. Peripheral versus central effects of glucagon-like peptide-1 receptors agonists on satiety and body weight loss in Zucker obese rats. *Metabolism*. 49: 709-717.
 - Routh, V. 2010. Glucose Sensing Neurons in the Ventromedial Hypothalamus. *Sensors*. 10, 9002-9025.
 - Sehgal A. 2004. *Molecular biology of circadian rhythms*. John Wiley & Sons, Inc. USA.
 - Sergeev V, Broberger C, Gorbatyuk O, Hökfelt T. 2000. Effect of 2-mercaptoacetate and 2-deoxy-D-glucose administration on the expression of NPY, AGRP, POMC, MCH and hypocretin/orexin in the rat hypothalamus. *NeuroreportJournal*. 17:117-121.
 - Shiuchi T. 2009. Hypothalamic orexin stimulates feeding associated glucose utilization in skeletal muscle via sympathetic nervous system. *Cell Metabolims*. 10: 466-480.
 - Silver R, Rainbow M. 2013. The Suprachiasmatic Nucleus and the Circadian Timekeeping System of the Body. ...
 - Solomon A, De Fanti B, Martínez J. 2004. Control del apetito y peso corporal: la ghrelina y la señalización orexigénica. *Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria*. España. 55:13-27.
 - Solomon A, Martínez J. 2006. Participación del sistema nervioso y del tracto gastrointestinal en la homeostasis energética. *Revista Médica de la Universidad de Navarra*. España. 50: 27-37.

-
- Stephan F, Zucker I. 1972. Circadian Rhythms in Drinking Behavior and Locomotor Activity of Rats Are Eliminated by Hypothalamic Lesions. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69: 6, 1583-1586
 - Stolarczyk E, Guissard C, Michau A, Even P, Grosfeld A, Serradas A, Leturque A, Maude Le Gall M. 2010. Detection of extracellular glucose by GLUT2 contributes to hypothalamic control of food intake. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*. 298: E1078–E1087.
 - van den Pol A, Tsujimoto, K. 1985. Neurotransmitters of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus: immunocytochemical analysis of 25 neuronal antigens. *Neuroscience*. 15: 1049-1086.
 - van den Top M, Lee K, Whyment A, Blanks A, Spanswick D. 2004. Orexigen-sensitive NPY/AgRP pacemaker neurons in the hypothalamic arcuate nucleus. *Nature neuroscience*. 7:5 493-494.
 - Wang R, Liu, X, Hentges S, Dunn-Meynel A, Levin B, Wang W, Routh V. 2004. The regulation of glucose-excited neurons in the hypothalamic arcuate nucleus by glucose and feeding-relevant peptides. *Diabetes*. 53, 1959–1965.
 - Watts A, Swanson L, Sanchez-Watts G. 1987. Efferent Projections of the Suprachiasmatic Nucleus: Studies Using Anterograde Transport of *Phaseolus vulgaris* in the Rat. *The journal of comparative neurology*. 258: 204-229.
 - Watts A, Swanson L. 1987. Efferent Projections of the Suprachiasmatic Nucleus: Studies Using Retrograde Transport of Fluorescent Dyes and Simultaneous Peptide Immunohistochemistry in the Rat. *The journal of comparative neurology*. 254: 230-232.
 - Welsh D, Takahashi J, Kay S. 2010. Suprachiasmatic Nucleus: Cell Autonomy and Network Properties. *Annu Rev Physiol*. 72: 551–577. .