



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**“ESTRATEGIAS DE CRONOTERAPIA CON  
ALIMENTO PARA ACELERAR LA  
RESINCRONIZACIÓN DE OSCILADORES  
PERIFÉRICOS DESPUÉS DE UN AVANCE DE  
FASE DE 6 HORAS”**

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

LAURA MATILDE UBALDO REYES

**TUTOR. DR. ALBERTO MANUEL ANGELES CASTELLANOS  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

COMITÉ TUTOR Dr. Rudolf Marinus Buijs IIB

Dr. Beatriz Fuentes Pardo  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. DI CIEMBRE 2017



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.

# INDICE

	PAG
<b>INDICE</b>	2
<b>RESUMEN</b>	4
<b>ABSTRACT</b>	5
<b>ABREVIATURAS</b>	6
<b>INTRODUCCIÓN</b>	10
Sistema Circadiano	11
Núcleo supraquiasmático	12
• División funcional de NSQ	14
Sincronización del sistema circadiano	18
Desincronización	19
Estudios experimentales de jet lag	21
Efectos del jet lag sobre el NSQ	22
Estrategias de resincronización	23
Sincronización por alimento	24
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	26
<b>HIPOTESIS</b>	26
<b>OBJETIVOS</b>	27
<b>MATERIAL Y METODOS</b>	27
<b>DISEÑO EXPERIMENTAL</b>	27

<b>RESULTADOS</b>	32
<b>DISCUSION</b>	46
<b>CONCLUSIONES</b>	49
<b>REFERENCIAS</b>	52

## RESUMEN

Viajar a través de varios husos horarios por cuestiones laborales o de esparcimiento requiere un ajuste rápido del sistema circadiano. Al someterse a cambios temporales bruscos, se refieren malestares que desaparecen después de varios días. El ajuste temporal diferencial de órganos y sistemas da como resultado lo que comúnmente se conoce como jet lag. Durante este estado transitorio de alteración circadiana, los individuos sienten incomodidad, pérdida de apetito, fatiga, sueño perturbado y desempeño deficiente de múltiples tareas. Hemos demostrado que después de un avance de fase de 6 horas del ciclo de luz-oscuridad (LD), el alimento programado en fase con el inicio de la nueva noche acelera la resincronización. En este estudio, exploramos los posibles mecanismos subyacentes a la rápida resincronización debido al horario de alimentación. Nos centramos en estructuras de primer y segundo orden que proporcionan información metabólica al núcleo supraquiasmático (NSQ). Comparamos 1) ratas control sin cambio de ciclo de LD; 2) ratas expuestas a 6 horas de avance de fase del ciclo LD con alimento ad libitum; y 3) ratas expuestas a un avance de fase de 6 horas con acceso a los alimentos en fase con la nueva noche. Encontramos un efecto sincronizador inmediato del alimento sobre la distensión del estómago y sobre la expresión de la proteína c-Fos en el núcleo del tracto solitario (NTS), núcleo arqueado del hipotálamo (ARC), núcleo hipotalámico dorsomedial (DMH) y núcleo paraventricular (PVN). Estas observaciones indican que en un modelo de jet lag, la alimentación programada modifica las estructuras de primer y segundo orden hacia NSQ. Al mantener los horarios de alimentación acoplados a la nueva noche, se puede lograr una rápida resincronización.

## ABSTRACT

Traveling across several time zones requires a fast adjustment of the circadian system and the differential adjustment speeds of organs and systems results in what is commonly referred as jet lag. During this transitory state of circadian disruption, individuals feel discomfort, appetite loss, fatigue, disturbed sleep and deficient performance of multiple tasks. We have demonstrated that after a 6-h phase advance of the light-dark cycle (LD) scheduled food in phase with the new night onset can speed up re-entrainment. In this study, we explored the possible mechanisms underlying the fast re-entrainment due to the feeding schedule. We focused on first and second order structures that provide metabolic information to the suprachiasmatic nucleus (SCN). We compared 1) control rats without change of LD cycle; 2) rats exposed to a 6 hours phase advance of the LD cycle with food *ad libitum*; and 3) rats exposed to the 6 hours phase advance combined with food access in phase with the new night. We found an immediate synchronizing effect of food on stomach distention and on c-Fos expression in the nucleus of the solitary tract, arcuate nucleus of the hypothalamus, dorsomedial hypothalamic nucleus and paraventricular nucleus. These observations indicate that in a model of jet lag, scheduled feeding can favor an immediate shift in first and second order relays to the SCN and that by keeping feeding schedules coupled to the new night, a fast re-entrainment may be achieved by shifting peripheral and extra-SCN oscillations.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMPC: adenosín-monofosfato cíclico  
ARC: núcleo arqueado  
AVP: avidina vasopresina  
CA2C: Calcio-calmodulina  
CI: corteza infralímbica  
CORE área ventral de NSQ  
CREB proteína elemento de respuesta a Camp  
DMH: núcleo dorsomedial del hipotálamo  
GABA: ácido gamma amino butírico  
GRP: péptido liberador de gastrina  
IGL ojuela intergeniculada  
IPGCs células ganglionares intrínsecamente fotorreceptoras  
LH: hipotálamo lateral  
MAPK proteína quinasa activada por mitógenos  
NLST: núcleo lecho de la estria terminalis  
NMDA: n-metil-d-aspartato  
NSQ: núcleo supraquiasmático  
PACAP péptido activador de la adenilciclase pituitaria  
PVN: núcleo paraventricular del hipotálamo  
SHELL área dorsal de NSQ  
SP sustancia P  
SPVZ: zona subparaventricular  
TMN: núcleo tuberomamilar  
TRH: tracto retinohipotalámico  
VMH: núcleo ventromedial del hipotálamo  
VIP: péptido vasoactivo intestinal

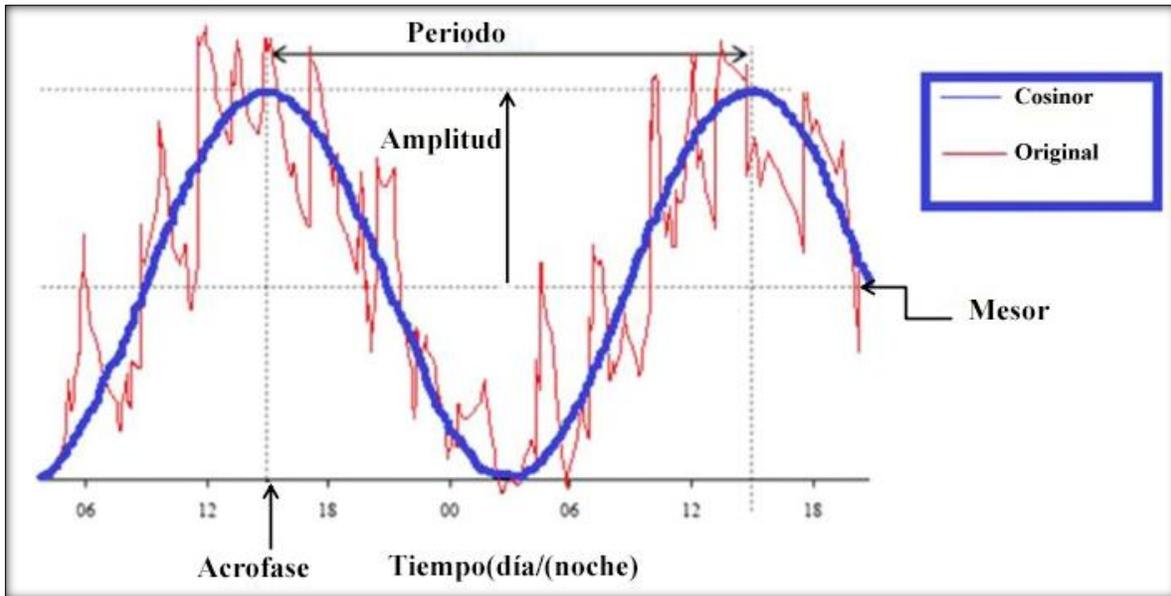
## INTRODUCCIÓN

Los seres vivos están expuestos a cambios constantes. Basta con observar cualquier evento a nuestro alrededor para darnos cuenta de que la naturaleza no es estática, al contrario, es fluctuante y sobre todo rítmica.

En el siglo XIX Claude Bernard definió el concepto de *medio interno*. Observó que existen diferencias entre el ambiente externo que nos rodea y el ambiente interno que se relaciona con las células del cuerpo. Walter Cannon definió a la constancia del *medio interno* como “homeostasis”, tal concepto se refiere a los mecanismos fisiológicos que intervienen en el mantenimiento de un equilibrio físico-químico entre el medio intra y extra celular (E. Challet 2012). Consideremos al ser humano y analicemos cualquiera de los parámetros que habitualmente nos sirven para verificar el estado de sus funciones vitales: concentraciones plasmáticas de hormonas, enzimas, electrolitos, presión arterial, temperatura corporal, etc. Si el análisis se llevara a cabo a distintas horas a lo largo del día y de la noche, veríamos que los valores de estos parámetros no son constantes, sino que varían dependiendo del momento del día en que son analizados. En 1981 J. Aschoff definió que un **ritmo biológico** es: *la recurrencia de cualquier evento en un sistema biológico con intervalos de tiempo más o menos regulares.*

Los seres vivos han logrado adaptar sus funciones fisiológicas y de conducta en relación a las variaciones diarias del medio ambiente, de tal manera que los ritmos del ambiente influyen sobre la actividad de los organismos, en función de la temperatura, de la cantidad de luz o de la disponibilidad de comida. Un evento que se repite de manera regular a lo largo del tiempo, con el mismo orden y mismo intervalo de tiempo es un **ritmo**. Conviene recordar que se denomina oscilación a una variación, perturbación o fluctuación en el tiempo de un medio o sistema. Por lo anterior podemos usar ambos términos ritmo y oscilación de manera indistinta en este texto.

Al estudiar los ritmos biológicos se consideran algunos parámetros que permiten su comprensión: periodo, mesor, frecuencia, amplitud, acrofase, fase (ver Figura 1).



*Figura 1. Características de un ritmo circadiano (modificado de Papaioannou y cols. 2014).*

**Periodo.** Es la duración de un ciclo completo, es decir, tiempo que tarda en repetirse una oscilación.

**Mesor.** Es el valor medio de la variable en estudio calculado a lo largo de un periodo completo.

**Amplitud.** Diferencia entre el mesor y el valor máximo o acrofase.

**Acrofase.** Valor máximo de una variable.

**Fase.** Cualquier momento dentro de la oscilación.

**Frecuencia.** Número de ciclos que ocurren por unidad de tiempo. (ver Tabla 1)

**Tabla 1.** Clasificación de los ritmos de acuerdo a frecuencia

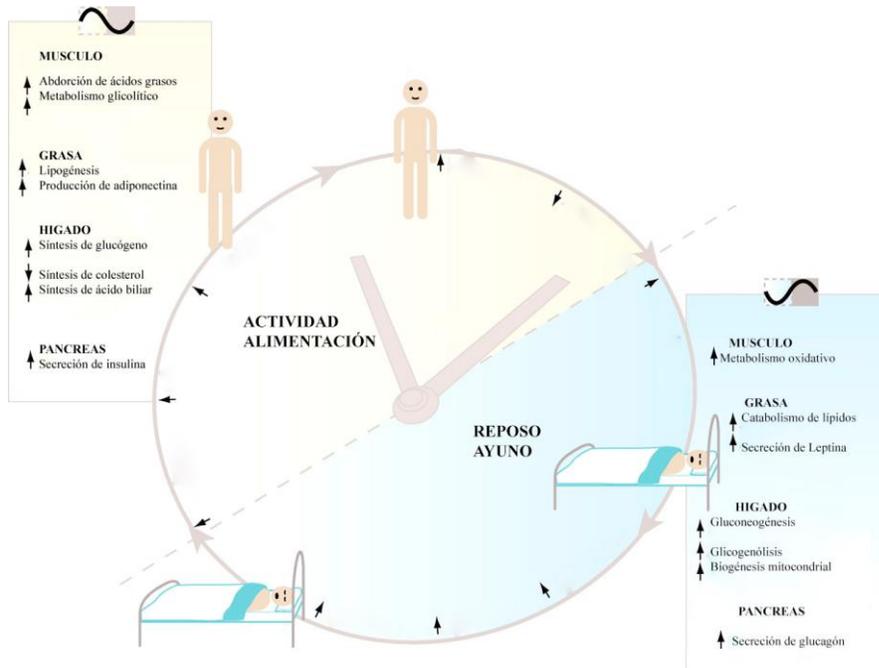
Ritmos	Frecuencia Alta <i>Menos de 24 horas</i>	Frecuencia Media <i>Cercanos a 24 horas</i>	Frecuencia Baja <i>Más de 24 horas</i>
	Frecuencia cardíaca	Ciclo sueño vigilia	Menstruación
	Frecuencia respiratoria	Actividad-reposo	Apareamiento
	Movimientos peristálticos		Migración
<b>Periodo</b>	Ultradianos	Circadianos	Infradianos

Los ritmos circadianos tienen un periodo cercano a 24 horas y son ciclos fisiológicos, conductuales, metabólicos que persisten aún en aislamiento de señales temporales externas, indicando que están dirigidos por osciladores biológicos con periodos intrínsecos (Maywood y cols. 2007) que en conjunto forman el sistema circadiano.

## SISTEMA CIRCADIANO

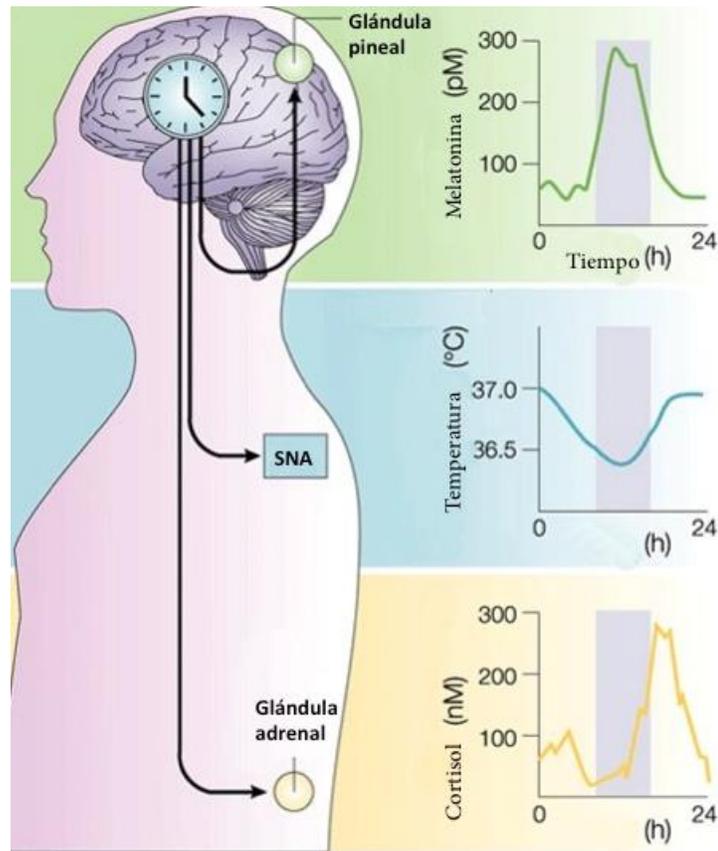
Para lograr estas adaptaciones temporales el organismo cuenta con un sistema circadiano que permite anticipar el cambio de una fase de actividad a una fase de reposo, manteniendo la homeostasis y el adecuado funcionamiento (ver Figura 2).

El sistema circadiano comprende conexiones aferentes que sincronizan el reloj o marcapaso con el ambiente y conexiones eferentes desde el reloj que transmiten la señal temporal a todos los órganos del cuerpo (osciladores). El núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo es el reloj u oscilador principal y ajusta su actividad rítmica es decir se sincroniza cambiando su fase y periodo en relación a las señales del ciclo luz y oscuridad. La principal señal temporal es la alternancia de luz-oscuridad la cual llega al NSQ a través del tracto retinohipotalámico (TRH) que es una proyección axónica desde las células ganglionares tipo W de la retina, a este ajuste se le conoce como **sincronización fótica** (Herzog y cols. 1998; Klein y cols. 1991).



**Figura 2.** La coordinación y correcto funcionamiento del organismo de acuerdo al ciclo luz oscuridad mantiene los procesos metabólicos en sincronía para la salud (modificado de Bass y Takahashi 2010).

La ritmicidad temporal dictada por el reloj se transmite al resto de los osciladores centrales y periféricos a través de efectores, principalmente a través del sistema nervioso autónomo (Buijs y cols. 2001) y por vía hormonal: a través de melatonina y corticosterona. El sistema circadiano prepara al organismo para las demandas que se requieren en los procesos fisiológicos, conductuales, metabólicos a lo largo del ciclo normal de 24 horas (ver Figura 3).

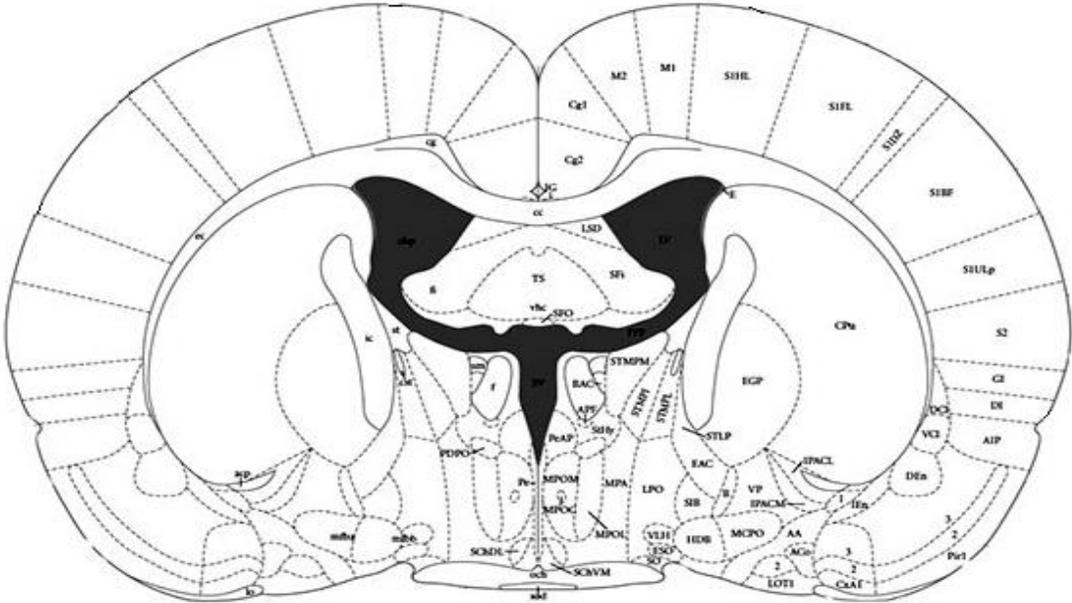


**Figura 3.** Organización del sistema circadiano en el cual el marcapaso del NSQ se comunica a través de vías neurales y endocrina para sincronizar los ritmos en la fisiología. (modificado de Hastings y cols. 2003)

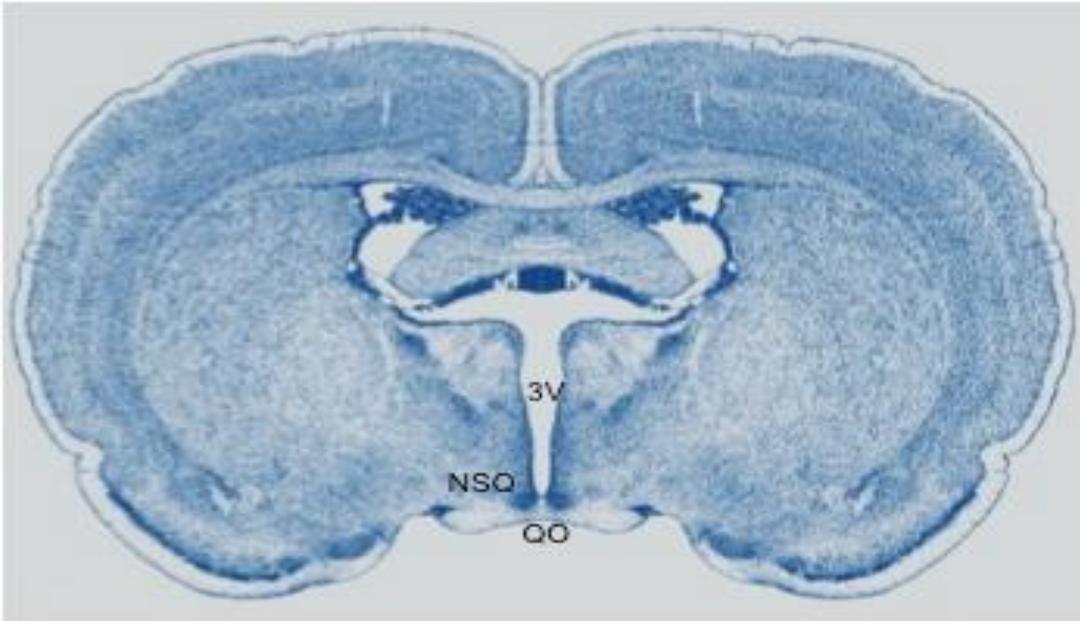
## NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO

EL núcleo supraquiasmático (NSQ), es un núcleo par del hipotálamo que se encuentra en la parte anterior y ventral del hipotálamo inmediatamente arriba del quiasma óptico y lateral al tercer ventrículo (ver Figura 4). Diversos estudios en mamíferos han demostrado que este núcleo es el principal reloj endógeno generador de los ritmos circadianos (Moore y Eichler 1972).

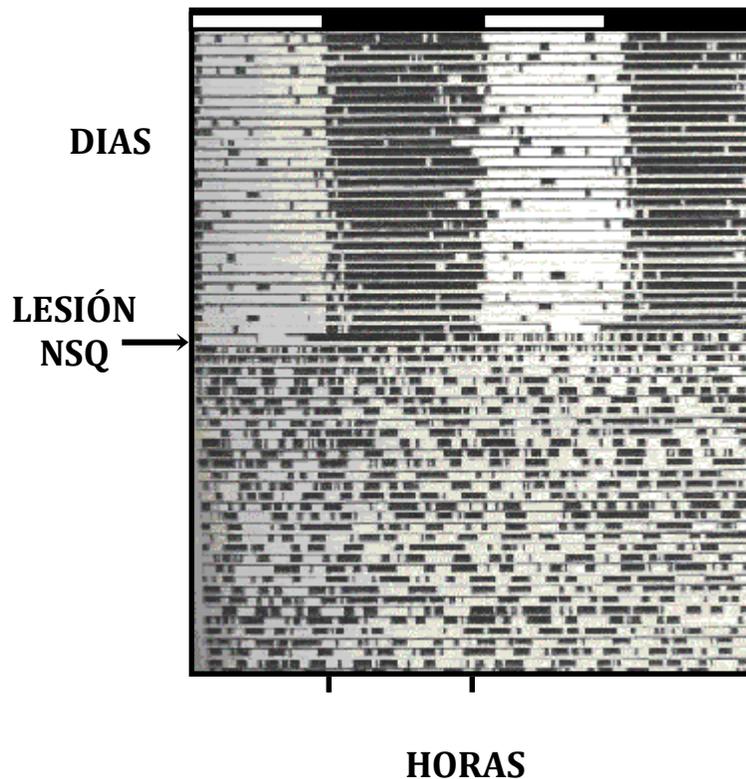
Se logró determinar la función del NSQ como un reloj biológico, cuando Moore y Eichler (1972) encontraron que la destrucción de esta estructura eliminaba el ritmo de corticosterona. Simultáneamente Stephan y Zucker (1972) descubrieron que lesiones del NSQ eliminaban la ritmicidad circadiana de actividad locomotora y de ingestión de agua. (ver Figura 5)



Bregma -0.72 mm



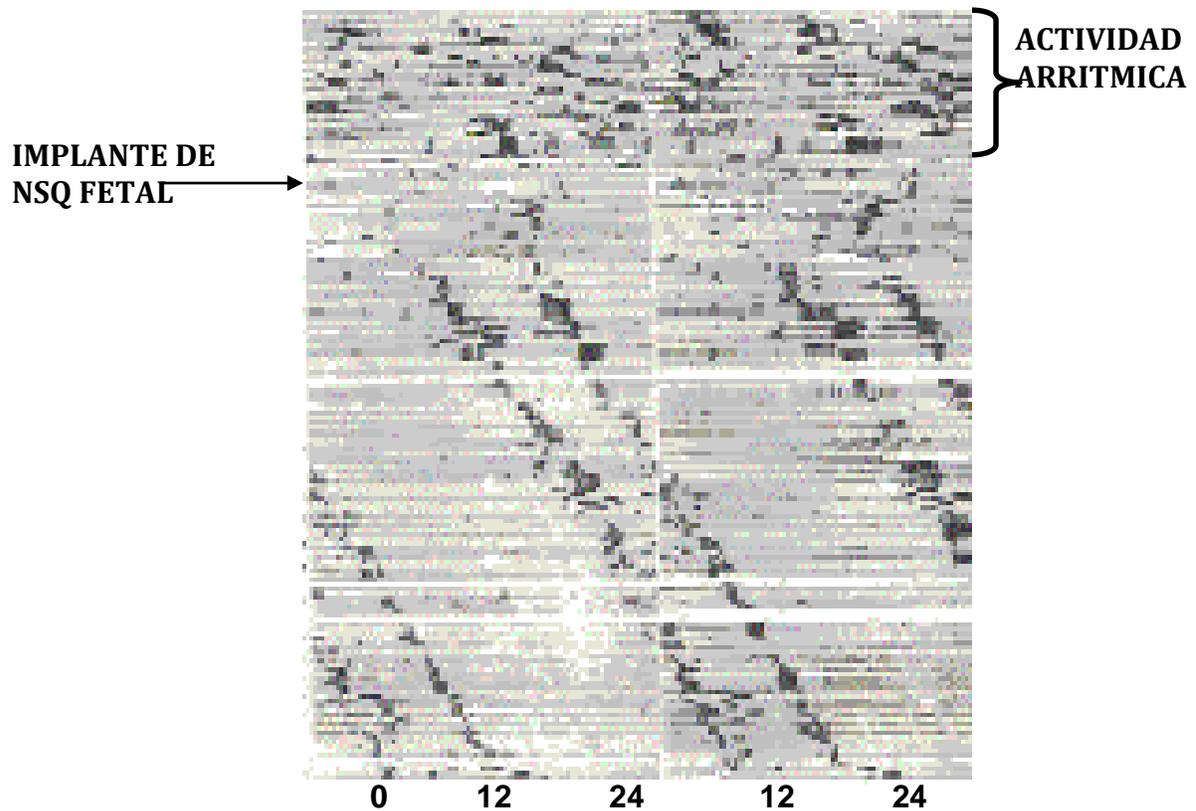
**Figura 4.** Localización del núcleo supraquiasmático (NSQ) en la rata. Arriba se muestra un esquema de un corte coronal del hipotálamo que muestra las relaciones anatómicas del NSQ. Abajo un corte histológico teñido con la técnica de Nissl, 3V: tercer ventrículo, QO: quiasma óptico (modificado de Paxinos y Watson 1999).



**Figura 5.** Actograma de doble representación de actividad locomotora de un hámster. En la mitad superior del actograma se aprecia la organización temporal de la conducta con un periodo de 24 horas. La flecha indica el momento de la lesión del NSQ. Después de la flecha la organización circadiana que se observaba previa a la lesión se vuelve totalmente arrítmica, el animal distribuye su conducta de manera azarosa sin ninguna organización temporal aun en presencia del ciclo luz-oscuridad. (Tomada de Moore, 1998).

Otra manipulación experimental que ha demostrado la capacidad del NSQ como reloj biológico circadiano, es que en animales con lesión del NSQ muestran una actividad locomotora arrítmica y cuando se realiza un trasplante de tejido fetal

hipotalámico que contenga neuronas del NSQ, se observa una recuperación de su ritmo en la conducta locomotora (ver *Figura 6*).



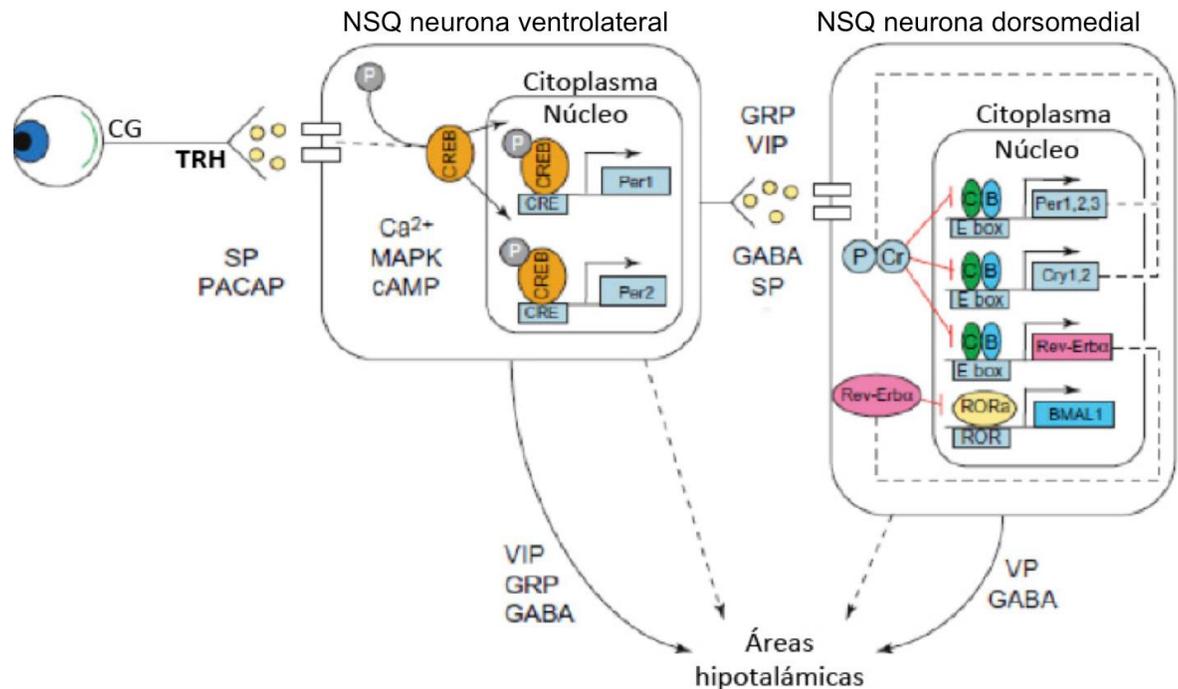
**Figura 6.** Actograma en doble representación en el que se puede observar la conducta locomotora de un hámster con lesión del NSQ. Posteriormente se implantó tejido fetal del hipotálamo anterior. Se puede ver la recuperación de la actividad locomotora en forma rítmica con un periodo estable. (Tomada de Aguilar-Roblero y cols. 1994)

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

El NSQ genera un ritmo sincronizado al ambiente externo, las neuronas de este núcleo exhiben un patrón rítmico de descargas de potenciales de acción (Inouye y Kawamura 1979) y consumo de glucosa (Schwartz y cols. 1980), los cuales están asociados a la fase de luz.

### **DIVISION FUNCIONAL DEL NUCLEO SUPRAQUIASMATICO**

Dentro de los NSQ podemos considerar dos zonas. El área ventrolateral de las aferencias retinianas, a la que llegan los axones de las vías que portan la información luminosa (vías retinohipotalámica y genículohipotalámica). Las neuronas de este área contienen péptido intestinal vasoactivo (VIP) como principal neurotransmisor, aunque hay algunas neuronas que contienen gastrina (ver Figura 7). La segunda área, dorsomedial, se caracteriza por no recibir aferencias desde la retina, y está integrada por una gran población de neuronas productoras de vasopresina (AVP), así como algunas pequeñas poblaciones de neuronas productoras de somatostatina, encefalinas, péptido atrial natriurético y angiotensina. Las neuronas de ambas zonas, además de producir péptidos, contienen también GABA.



**Figura 7.** Representación esquemática del mecanismo de integración de la señal luminosa desde Tracto retinohipotalámico hacia neuronas de la zona core en NSQ y desde esta zona a neuronas de la región shell (modificada de Antle y Silver 2005).

La luz se transduce en una señal neural por las células ganglionares intrínsecamente fotorreceptoras (IPGCs) en la retina y se transporta al NSQ a lo largo del tracto retinohipotalámico (TRH), resultando en la liberación del neurotransmisor glutamato y neuromoduladores como la sustancia P (SP) y el péptido activador de la adenilciclase pituitaria (PACAP) en las células retinorreceptoras de NSQ. Los receptores de glutamato NMDA, causan un flujo de calcio-calmodulina ( $Ca^{2+}C$ ), el cual activa quinasas tales como la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), además fosforilación de la proteína elemento de respuesta a cAMP (CREB). Activado CREB se une al elemento  $Ca^{2+}C/AMPC$  (CRE) en la región promotora de genes como *per1*, *per2*, *c-fos* iniciando su transcripción (Antle y Silver 2005).

Las neuronas de la región ventrolateral activan a la región dorsomedial usando una variedad de neurotransmisores, incluyendo polipéptido intestinal vasoactivo (VIP), péptido liberador de gastrina (GRP) y SP. Además, casi todas las células NSQ son GABAérgicas. Las células de la región Shell expresan

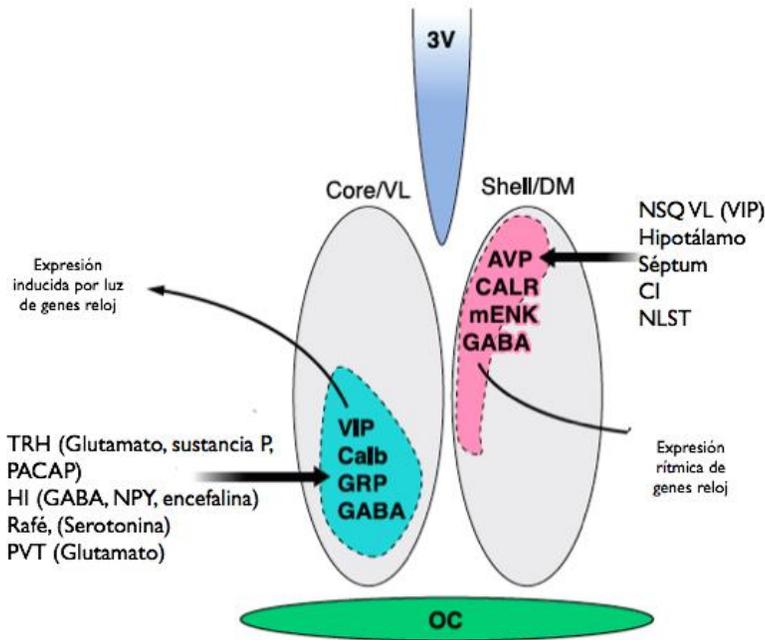
ritmicidad en sus relojes moleculares impulsado por una autorregulación de transcripción-traducción. Las proteínas CLOCK y BMAL dimerizan y se unen a cajas E (E-Box) en la región promotora de genes *period* (*per*), genes criptocromo (*cry*) y *Rev-Erba*, activando su transcripción. Las proteínas PER y CRY se acumulan en el citoplasma, dimerizan y se traslocan al núcleo que inhiben la actividad de CLOCK-BMAL, así inhiben su propia transcripción. Al mismo tiempo, la transcripción de BMAL es regulada por ROR elemento que es inhibido por Rev-Erba (Okamura y cols. 2002). Este mecanismo molecular se expresa con un periodo cercano a 24 horas. Las neuronas de la región Shell se comunican hacia otros núcleos utilizando vasopresina y GABA como neurotransmisores.

Los genes expresados por las células de la región ventrolateral se conocen como de respuesta inmediata de *c-fos* (Romijn y cols. 1996), *per1*, *per2*, ya que estos genes se expresan en respuesta a la estimulación fótica (Yan y Okamura 2002). Cuando los animales se encuentran en oscuridad constante se ha demostrado que estos genes no presentan ritmo en la región ventrolateral, solo al aplicar luz durante la noche subjetiva la región ventrolateral responde incrementando los niveles de *c-fos* y *per*. En la región ventrolateral si bien estas células no presentan ritmos autónomos ni de actividad eléctrica ni en la expresión de genes reloj, presentan un ritmo diario de sensibilidad a la luz y son fundamentales para el mantenimiento de los ritmos del organismo. Por otro lado, las células de la región dorsomedial poseen el reloj molecular siendo intrínsecamente rítmicas, y responderían de manera indirecta a la luz por la acción de los neurotransmisores liberados desde la región core (Golombek y Rosenstein 2010).

### **AFERENCIAS AL NUCLEO SUPRAQUIASMÁTICO**

Además del TRH que trasmite la información luminosa, existen otras vías con información no-fótica que proyectan al NSQ ventrolateral. Proviene del núcleo dorsomedial (DMH) y la hojuela intergeniculada (IGL); (Acosta-Galván y cols. 2011; Merkestein y cols. 2014; Saderi y cols. 2013), núcleo del rafé, principalmente del núcleo mediano mesencefálico (serotoninérgica); del núcleo paraventricular del tálamo (PVT, porciones rostral y dorsal; glutamatérgica).

También el NSQ recibe proyecciones glutamatérgica provenientes del núcleo del lecho de la estria terminalis (NLST). Áreas hipotalámicas también envían proyecciones hacia el NSQ, de los núcleos preópticos medial y mediano, del núcleo periventricular, del núcleo ventromedial (VMH), del DMH, del núcleo arqueado (ARC), del núcleo tuberomamilar (TMN), de la zona subparaventricular (SPVZ), del hipotálamo lateral (LH), y de las áreas hipotalámicas posteriores. Las proyecciones de estas áreas se localizan en la zona dorsomedial del NSQ. En esta misma región también se localizan proyecciones provenientes de la corteza infralímbica (CI), el núcleo septal lateral y el subículo ventral (Moga y Moore, 1997; Moga y Moore, 1996) (Figura 8).



**Figura 8.** Esquema de NSQ donde se muestran las entradas y salidas de información a las respectivas regiones. VIP: Péptido Vasoactivo Intestinal; Calb: Calbindina; GRP: Péptido Liberador de Gastrina; GABA: Ácido Gamma Amino Butírico; AVP: Avidina Vasopresina; CALR: Calretinina; mENK: Encefalina; 3V: Tercer ventrículo; VL: Ventrolateral; DM: Dorsomedial; TRH: Tracto Retinohipotalámico; HI: Hojuela Intergeniculada; PVT: Núcleo Paraventricular del Tálamo; CI: Corteza Infralímbica; NLST: Núcleo Lecho de la Stria Terminalis; OC: Quiasma Óptico. Modificado de Golombek y Rosenstein, 2010.

El NSQ envía proyecciones hacia los núcleos hipotalámicos ZPVZ, núcleo paraventricular (PVN) parvocelular, VMH, DMH, área hipotalámica lateral, área

retroquiasmática, y área preóptica. Fuera del hipotálamo, el NSQ envía proyecciones hacia el NLST, séptum lateral y PVT (Leak y Moore, 2001).

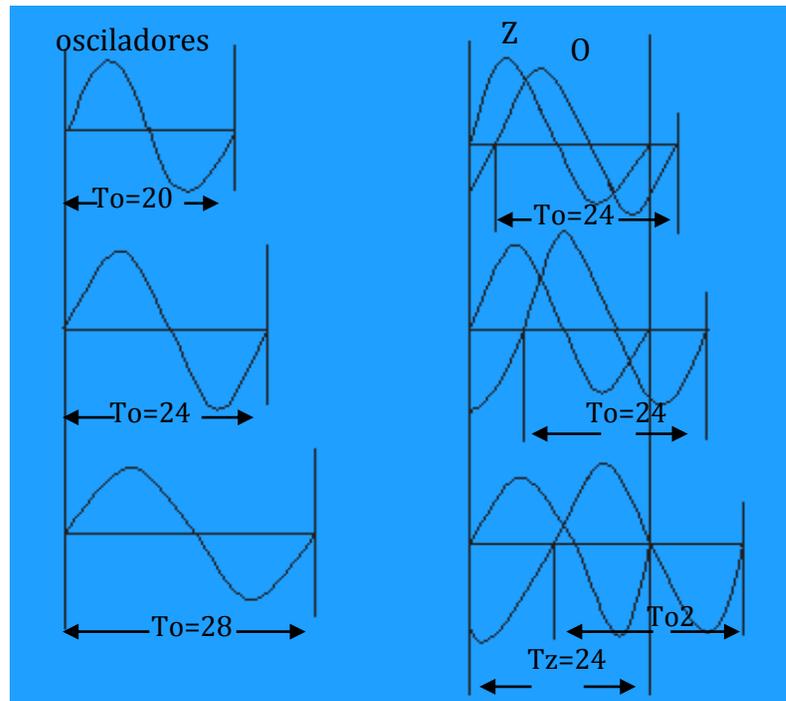
## **SINCRONIZACIÓN DEL SISTEMA CIRCADIANO**

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

El mecanismo de sincronización fue propuesto por Pittendrigh en 1959. Pittendrigh señalaba que la sincronización es la coordinación entre dos osciladores que presentan oscilaciones similares en donde se implica un control del periodo y de la fase por el sincronizador sobre el oscilador. Cuando se presenta la sincronización la ritmicidad endógena ajusta su periodo y fase a la del sincronizador (*Figura 9*).

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

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



**Figura 9 .** En la figura de la izquierda se muestran 3 oscilaciones con un periodo distinto ( $T_o$ ), las cuales posteriormente se exponen a un sincronizador con un periodo de 24 horas ( $T_z$ ). Al sincronizarse comienzan a oscilar con un periodo de 24 horas y cada uno con una relación de fase distinta hacia el sincronizador figura de la derecha (Tomada de Pittendrigh, 1981).

El NSQ es capaz de responder a otras señales temporales (sincronización no fótica) como la temperatura, interacción social, ingestión de alimento, ejercicio, melatonina. Varios estudios han demostrado que el NSQ también puede responder a condiciones metabólicas (Saderi et al., 2013) y en condiciones hipocalóricas, los programas de alimentación pueden incluso sincronizar al NSQ, rebasando las señales proporcionadas por el ciclo LD (Mendoza et al., 2012).

Se ha demostrado que el NSQ regula el metabolismo y la homeostasis energética en el hígado y otros tejidos periféricos a través de mediar la expresión y/o actividad de ciertas enzimas metabólicas y sistemas de transporte que participan en el metabolismo del colesterol, regulación de aminoácidos, ciclo del ácido cítrico, glucógeno y glucosa (Díaz-Muñoz y cols 2010).

Los órganos periféricos oscilan en sincronía con el NSQ en el ciclo luz oscuridad, pero preferentemente ajustan sus oscilaciones diarias con horarios de alimentación, en roedores el cambio en la disponibilidad de alimento durante el día invierte las oscilaciones metabólicas (Salgado-Delgado y cols. 2010) y de genes reloj (Damiola y cols. 2000; Stokkan y cols. 2001).

## **SINCRONIZACION POR ALIMENTO**

El alimento es una señal de sincronización muy potente para los tejidos y órganos periféricos, varias evidencias demuestran que la expresión rítmica de genes reloj en el hígado y otros osciladores periféricos son sincronizados por el horario de acceso al alimento (Cassone y Stephan, 2002; Hirota y Fukada, 2004; Stephan 2002; Stokkan y cols. 2001). Muchos ritmos fisiológicos que son normalmente dictados por el NSQ, tales como la actividad enzimática del hígado: P450, Cyp7A1; temperatura corporal, actividad locomotora etc. pueden ser cambiados de fase y sincronizados al alimento (Boulamery-Velly y cols. 2005; Hara y cols. 2001; Hirao y cols. 2006; Mukherji y cols. 2015).

Así mismo las respuestas evocadas por los osciladores periféricos son capaces de influir sobre el funcionamiento del NSQ a través de la interacción de núcleos involucrados en el balance energético.

Por otro lado, hormonas implicadas en el metabolismo tales como insulina (La Fleur y cols. 1999), glucagón (Ruiter y cols. 2003), adiponectina (Ando y cols. 2005), corticosterona (De Boer y cols. 1987), leptina y grelina (Bodosi y cols. 2004) presentan oscilaciones circadianas. In vitro, la administración de leptina cambia la fase del NSQ (Prosser y Bergeron 2003). La grelina es capaz de influir en la actividad del NSQ a través de su interacción con el Núcleo arqueado (Yanielli y cols. 2007; Yi y cols. 2006). En el ARC, se han reportado aumento de los niveles de la expresión de c-Fos en ratas durante el ayuno (Scott y cols. 2007), y en el DMH aumenta c-Fos en ratas durante la anticipación después de 22 h de ayuno (Ángeles-Castellanos y cols. 2004; Gooley y cols. 2006). Además del cambio en la actividad de los ritmos en el hipotálamo, el alimento también modifica los ritmos en las áreas corticolímbicas (Ángeles-Castellanos y cols. 2007) y en áreas del tronco

cerebral involucradas en el proceso de comunicación metabólica, incluyendo el núcleo del tracto solitario (NTS) (Ángeles-Castellanos y cols. 2005).

El núcleo dorsomedial del hipotálamo (DMH) inhibe la activación de NSQ para permitir la actividad locomotora observada momentos previos a la llegada del alimento (Acosta-Galván y cols. 2011). La restricción de alimento sincroniza estructuras del sistema nervioso central, a las cuales impone fase y periodo en relación al momento del acceso de alimento (Ángeles-Castellanos y cols. 2004; 2007, 2008), sin cambio a nivel de NSQ. Sin embargo se han reportado trabajos donde se demuestra que los horarios restringidos de alimentación modifican la liberación de vasopresina en el NSQ (Kalsbeek y cols. 1998), por lo tanto las señales metabólicas estarían influyendo en el funcionamiento del marcapaso. Aunado a lo anterior la hojuela intergeniculada IGL también puede transmitir información metabólica hacia el NSQ (Saderi y cols. 2013).

## **DESINCRONIZACION**

En todos los órganos del cuerpo se presentan variaciones en su funcionamiento y tienen su propio ritmo circadiano (Dibner y cols. 2010; Bass 2012). Si bien, cada órgano es independiente en su funcionamiento; es decir el ciclo en la temperatura corporal es independiente del ciclo en la secreción de melatonina y de cortisol, tienden a ocurrir con una secuencia y con un intervalo fijo entre ellas, manteniendo una relación de fase estable entre las diversas oscilaciones. Todos los órganos que forman parte de un sistema tienen que trabajar en sincronía para mantener la homeostasis. En ausencia de señales externas de tiempo, los ritmos circadianos, incluyendo el sueño y el tiempo de atención, irán modificándose transitoriamente después de cada día, es decir se expresarán en libre corrimiento (Aschoff y cols. 1971; Mills y cols. 1974). Aunque los ritmos circadianos son generados de forma endógena, están fuertemente influenciados por el ciclo de luz-oscuridad del medio ambiente. Cuando la señal temporal externa se altera ocurre la pérdida de coherencia entre el medio externo y el reloj biológico a esta alteración se le conoce como *desincronización externa* y la pérdida de relación de fase entre el

reloj biológico con los osciladores periféricos resulta en un fenómeno de *desincronización interna* (Rockwell 1975).

En la sociedad actual se reconocen 2 causas principales de alteración temporal: jet lag y el trabajo nocturno. El transporte aéreo hace posible que en poco tiempo podamos viajar de México a Francia o Japón, esto es, en tan sólo unas pocas horas, la velocidad con la que nuestro reloj circadiano se ajusta a estos cambios en el entorno externo lleva mucho más tiempo. Esta desincronización producida por un viaje a través de varios husos horarios genera un adelanto o retraso en la fase de la señal sincronizadora (ciclo L/D) ocasionando el fenómeno conocido como síndrome de “Jet lag” (Waterhouse y cols. 1997). Cuando una persona se somete a estos traslados suele referir múltiples alteraciones como cansancio, fatiga, dificultad para concentrarse, insomnio, somnolencia excesiva, dificultad para realizar tareas físicas y cognitivas, alteración en los patrones de alimentación con problemas gastrointestinales (Reid y Abbott 2015). La severidad de los síntomas está en función tanto del número de zonas cruzadas y el sentido del viaje (este u oeste). Al viajar al este, el reloj circadiano necesita avanzar su fase. En general, por su naturaleza endógena es más difícil que el reloj circadiano en el humano y la rata se ajuste a un avance de fase que a un retraso de fase, ya que el periodo intrínseco del reloj circadiano en humanos es, en promedio, más de 24 horas (Czeisler y cols. 1999) y pueden persistir los síntomas del jet lag durante más tiempo y ser peor que para los viajes hacia el oeste. Esta situación de cambio de horario conduce a una desincronización de los ritmos circadianos, es decir, los ritmos circadianos se desacoplan del horario externo y por varios días las oscilaciones hormonales y digestivas se mueven a diferentes velocidades, generando una pérdida de relación entre el NSQ y los osciladores periféricos que se cree es la causa del malestar general que caracteriza al Síndrome de Jet-Lag (Waterhouse y cols. 2004). De manera crónica estas alteraciones circadianas se convierten en factores de riesgo para desencadenar obesidad, hipertensión, diabetes y cáncer (Zelinski y cols. 2014). La Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) en 2007 concluyó que el trabajo nocturno o rotatorio genera alteraciones en la organización temporal

circadiana del organismo y predispone al desarrollo de cáncer en los seres humanos (Straif y cols. 2007).

## **ESTUDIOS EXPERIMENTALES DE AVANCE DE FASE**

Debido a la sintomatología relacionada con el Jet Lag se han creado modelos experimentales para estudiar el efecto de los cambios de horario sobre el sistema circadiano y proponer estrategias preventivas o de tratamiento.

Los estudios a nivel experimental muestran que después de un avance de fase de 6 horas en ratas se requieren 7 días (Yamazaki y cols. 2000) incluso de 12-14 días (Nagano y cols. 2003) para ajustar la conducta de actividad locomotora al nuevo horario. Los estudios anteriores difieren en el número de ciclos transitorios los cuales pueden deberse a que en el primer estudio sólo se hizo una inspección visual. Un trabajo más detallado determinó mediante análisis de cosinor el cambio del ritmo de la actividad locomotora después de un avance de fase de 6 horas (Ángeles-Castellanos y cols. 2011) encontrando que se requieren 10 días para resincronizarse al nuevo horario. En experimentos donde los animales se mantienen en DD después de 6 horas de avance de fase para excluir los continuos efectos del ciclo de luz y oscuridad muestran poca evidencia de restablecer su relación de fase normal, incluso después de 6 días en la oscuridad constante (Vansteensel y cols. 2003).

En animales con periodo corto como el ratón después de un avance de fase de 6 horas se requieren 7 días para la resincronización en actividad locomotora (Reddy y cols. 2002).

## **EFFECTOS DEL AVANCE DE FASE SOBRE EL NSQ Y OSCILADORES PERIFÉRICOS**

A diferencia de la conducta después de un avance de fase de 6 horas se observa que, en el NSQ se da un ajuste al primer ciclo en la expresión de *Per1* (Yamazaki

y cols. 2000), aunque con disminución en la amplitud (Nagano y cols. 2003). Se ha observado también que la velocidad con que el NSQ se reajusta al cambio de horario es distinta si se analiza el funcionamiento regional mostrando un ajuste heterogéneo con inducción de *per1* en el primer día específico en la zona ventral mientras que se requirieron 9-13 días para resincronizar *per1* en la zona dorsal (Nakamura y cols. 2005). Estos hallazgos coinciden con estudios donde los pulsos de luz en la fase de oscuridad inducen incrementos en la expresión de *per1* en la zona ventrolateral (Zylka y cols. 1998; Yan y Silver 2004). Estos modelos de jet lag dejan claro que responde inicialmente la zona ventral por efecto de la luz, ya que al quitar este estímulo ya no se observa resincronización rápida de *per1* (Reddy y cols. 2002). Lo anterior demuestra que después del jet lag hay un ajuste transitorio del reloj a un nuevo horario provocando desincronización en las zonas ventrolateral y dorsomedial del NSQ comprometiendo la transmisión de la ritmicidad al resto del organismo.

También se ha estudiado el efecto de los cambios de horario sobre osciladores centrales donde existe una respuesta diferencial en estructuras que responden rápidamente a los cambios de horario como son el núcleo paraventricular de hipotálamo y la glándula pineal, además de que estas estructuras cambian lentamente como el núcleo arqueado (Abe y cols. 2002), mostrando que a nivel central se presenta una desincronización interna después de un jet lag.

En osciladores periféricos como hígado, pulmón, músculo (Yamazaky y cols. 2000), timo, bazo y esófago (Davidson y cols. 2009) la respuesta ante un avance de fase es gradual necesitando hasta 6 días para el ajuste y es distinto entre órganos. Con base a los resultados anteriores podemos decir que el ajuste lento y transitorio de los osciladores periféricos interfiere con el acoplamiento del sistema circadiano.

## **ESTRATEGIAS DE RESINCRONIZACION**

Con el fin de acelerar la resincronización se han propuesto varias estrategias en las que el objetivo principal es combinar señales de sincronización débiles

(Mistlberger y cols. 2004) con el ciclo LD modificado. En seres humanos las estrategias de resincronización para disminuir la sintomatología durante el jet lag incluyen el ejercicio (Van Reeth y cols. 1994), exposición a la luz brillante por el día (Burgess y cols. 2003) y principalmente la administración de melatonina al inicio de la noche (Arendt y Skene 2005; Waterhouse y cols. 2007).

A nivel experimental los modelos de jet lag han buscado alternativas para acelerar la resincronización por ejemplo: el uso de corticoides (Kiessling y cols. 2010) una rueda de actividad (Castillo y cols. 2011), melatonina (Ángeles-Castellanos y cols. 2011), alimento (Ángeles-Castellanos y cols. 2011; Carneiro y Araujo 2011), análogos de neuropéptidos como VIP (An y cols. 2013) y vasopresina (Yamaguchi y cols. 2013), pueden resincronizar conductualmente a los animales. El alimento, VIP y Vasopresina mostraron ser los más eficientes ya que resincronizaron en 3 días la actividad locomotora.

El alimento es un potente sincronizador, sincroniza ritmos de temperatura corporal y conducta (Krieger, 1979; Stephan, 2001), metabolismo energético (Escobar y cols. 1998) y la melatonina (Feillet y cols. 2008). También ha mostrado ser un potente sincronizador de genes reloj en órganos relacionados con el metabolismo (Davidson y cols. 2009).

En cuanto al alimento estas adaptaciones conductuales indican que los estados internos de energía inducen en el organismo modificaciones que permiten disminuir los días necesarios para la resincronización. Se sabe que hay mecanismos de modulación hipotalámicos de la saciedad que han evidenciado la estrecha relación entre los estados metabólicos (niveles de energía) y la excitabilidad de la corteza cerebral. El hambre o un bajo metabolismo inducirán al organismo a un estado de vigilia o excitación cortical (Nicolaidis 2010). Por otra parte los estados de saciedad inducen en el organismo estados de sueño o inactivación cortical (Guan y cols. 2008).

Los modelos donde se utilizan análogos de VIP y Vasopresina proponen que la rápida resincronización se debe a un desacoplamiento de las zonas ventral y dorsal. Este mismo desacoplamiento se presenta en modelos donde no se recibe ningún tratamiento por lo que más allá de un desacoplamiento entre las zonas del

NSQ, la resincronización puede deberse a la atenuación de una parte de este oscilador central.

Este trabajo propuso que el mecanismo de rápida adaptación reside en que el alimento sincroniza el funcionamiento de osciladores periféricos después de un avance de fase y que las señales de alimentación modifican el funcionamiento de NSQ.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Teniendo en cuenta que el alimento puede sincronizar al sistema circadiano, en este estudio proponemos la utilización del alimento como una estrategia de rápida resincronización para contrarrestar las alteraciones circadianas generadas por un avance de fase súbito de 6 horas, como las que se producen en el síndrome de jet-lag.

El presente proyecto propone determinar cambios en los osciladores periféricos en el proceso de resincronización después de un avance de fase de 6 horas. Para ello se determinará la expresión de c-Fos y de la proteína reloj PER 1 en el NSQ, el PVN, ARC, IGL y NTS.

## **HIPÓTESIS**

1. Ratas expuestas a un avance de fase de 6 horas mostrarán ciclos transitorios en la actividad neuronal (c-Fos) y expresión de proteína reloj (PER-1) en osciladores periféricos (DMH, PVT, ARC, IGL, NTS).
2. El alimento programado con el avance de fase sincronizará más rápido los ritmos de actividad neuronal y expresión de proteína reloj (PER 1) en osciladores periféricos (DMH, PVT, ARC, IGL, NTS).

## OBJETIVO

1. Caracterizar los ritmos circadianos de actividad neuronal y de expresión de genes reloj en osciladores periféricos en un modelo de jet lag en ratas.
2. Determinar el impacto del alimento como sincronizador para acelerar los ritmos de actividad neuronal y expresión de genes reloj en osciladores periféricos en el modelo de jet lag en ratas.

## MATERIALES Y MÉTODO

### Sujetos

Se utilizaron 304 ratas macho Wistar de 250 a 300 gramos de peso. Fueron obtenidas del bioterio general de la Facultad de Medicina de la UNAM y alojadas en cajas individuales en el Departamento de Anatomía, en un ambiente con una temperatura constante (21° C) y un horario de iluminación 12:12 (encendido de la luz 07:00 a.m., definido como tiempo del sincronizador “0” (ZT0) con agua y alimento (Rodent Laboratory Chow 5001, Purina, Minnetanka, MN, US) *ad libitum*. El manejo y trato de los animales se realizó bajo las normas de uso de animales de experimentación según el decreto de ley de protección a los animales del Distrito Federal, publicada en la *Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999*, el proyecto fue aprobado por la comisión de ética e investigación de la Facultad de Medicina de la UNAM.

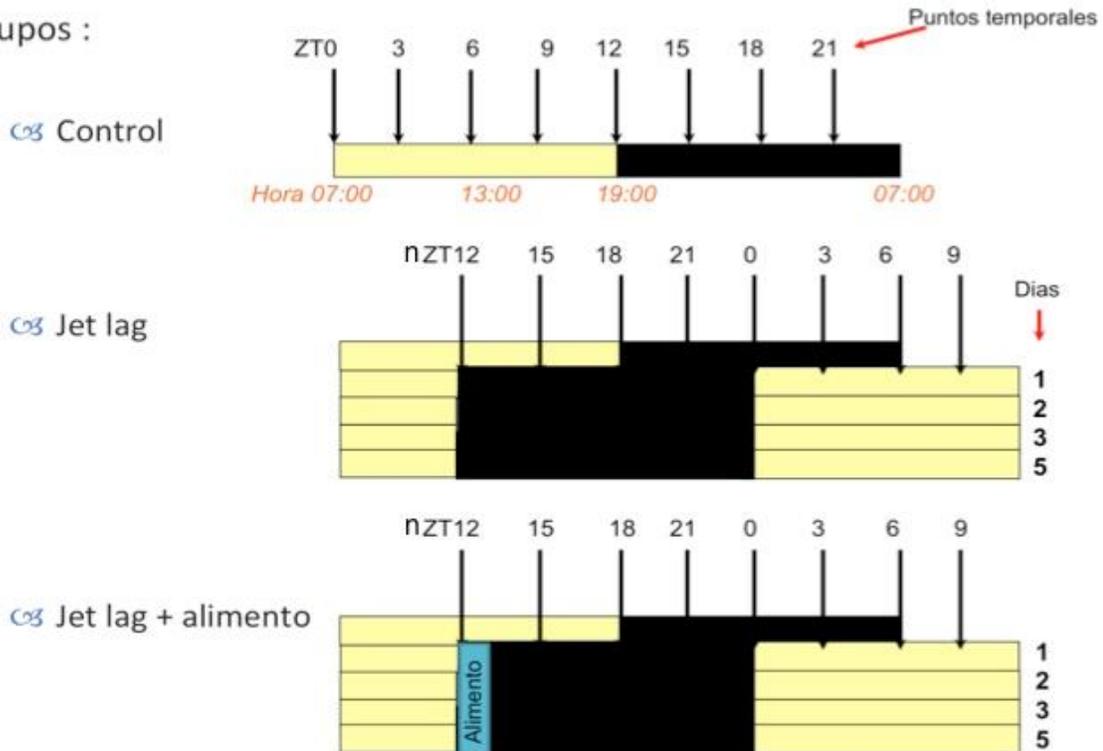
### Diseño experimental

- Grupo **Control**: (n=32), se mantuvieron en condiciones de bioterio, bajo un ciclo de luz-oscuridad, de 12:12 horas, con el encendido de luz a las 7:00 a.m. con agua y alimentación *ad libitum*. Se sacrificaron 4 ratas en los puntos temporales ZT 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, y 21, con el objeto de construir una curva temporal de un ciclo de 24 horas. La obtención de los cerebros se realizó en 4 series experimentales, cada una de las cuales consistió en

el sacrificio de un sujeto por punto temporal, desde ZT0 hasta ZT21 cada 3 horas.

- Grupo **Jet-Lag**: (n=136, de las cuales 8 ratas fueron utilizadas solo para registro de actividad locomotora) se mantuvieron bajo condiciones de luz-oscuridad 12-12 (encendido de la luz 07:00h) por 2 semanas para obtener una línea base. Posteriormente se realizó un cambio en el horario, con un adelanto de 6 horas (apagado de la luz 13:00 h) y mantenidas en el nuevo ciclo por 5 días, con agua y alimentación *ad libitum*. Se sacrificaron 4 ratas en los puntos temporales nueva ZT 12, 15, 18, 21, 0, 3, 6, 9, en los días 1, 2, 3 y 5 posteriores al cambio de horario con el objeto de construir una curva temporal de cada día.
- Grupo **Jet-Lag + Alimento**: (n=136, de las cuales 8 fueron utilizadas solo para registro de actividad locomotora) se mantuvieron bajo condiciones de luz-oscuridad 12-12 (encendido de la luz 07:00h) por 2 semanas para obtener una línea base. El alimento fue retirado 1 día previo al cambio de horario a las 13:00 para dejarlas en ayuno. Posteriormente se realizó el avance de fase de 6 horas (apagado de la luz 13:00 h) aunado al acceso al alimento restringido únicamente por 2 h diarias (13:00-15:00 horas) por 5 días. Se sacrificaron 4 ratas en los puntos temporales nueva ZT 12, 15, 18, 21, 0, 3, 6, 9, en los días 1, 2, 3 y 5 posteriores al cambio de horario con el objeto de construir una curva temporal de cada día (ver figura 10).

Grupos :



**Figura 10 .** Modelo explicativo de el diseño experimental. Arriba se muestra el grupo control con cada punto temporal (ZT) y las horas geograficas que coinciden con los puntos ZT. En medio se muestra el grupo Jet lag y los días que se analizarón. Abajo se muestra el grupo jet lag donde la barra azul es el momento de acceso al alimento el cual coincide con el apagado de la luz. Las barras amarillas representan el periodo de luz y las barras negras el periodo de oscuridad.

### Obtención de cerebros

Las ratas fueron anestesiadas con una sobredosis de Pentobarbital, (a las ratas que se encontraban en la fase de oscuridad se les cubrieron los ojos para evitar exposición a la luz). Posteriormente fueron perfundidas por vía intracardiaca con 250 mL de solución salina al 0.9%, seguida de paraformaldehído al 4% preparado en una solución amortiguada 0.1M de fosfato de sodio pH 7.2 (PB). Se extrajeron los cerebros y se postfijaron en paraformaldehído 4% por 24 horas. Posteriormente se crioprotegieron con solución de sacarosa 30%. Se obtuvieron 4 series de cortes coronales de 40 micrómetros de espesor, en un criostato (Leica) y se depositaron en una solución de PB y 0.9% de NaCl (PBS).

### **Inmunohistoquímica**

Los cortes se depositaron en tinas y se preincubaron con PBS, pH 7.2 + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, por 10 minutos. Posteriormente se lavaron tres veces con PBS pH 7.2, y se incubaron por 48 h a 4°C en una solución de PBS + gelatina nutritiva 0.25% + Tritón X-100 0.5% (supermix) conteniendo anticuerpos primarios desarrollados en conejo contra c-Fos (Santa Cruz-1:1000) o PER1 (Santa Cruz, 1:1000). Terminado el tiempo de incubación, los cortes fueron lavados tres veces con PBS, y se incubaron en solución supermix conteniendo anticuerpo biotinilado anti-conejo (Vector, 1:200) por 120 minutos, a temperatura ambiente. Después los cortes se lavaron tres veces con PBS, y se incubaron en solución supermix conteniendo el complejo avidina-biotina-peroxidasa (Vector, 9:1000), por 120 minutos. Después se lavaron nuevamente en PBS tres veces, y se depositaron en tinas conteniendo buffer Trizma 7.2 0.01M, 35µl de peróxido de hidrógeno 30% y diaminobencidina 0.05% como cromógeno. Al terminar el revelado, los cortes fueron montados en portaobjetos gelatinizados, y se permitió que se secaran al aire por 1 día. Después fueron deshidratados con una serie de alcoholes y xileno, y finalmente cubiertos con cubreobjetos y medio de montaje (Entellan-Merck).

### **Digitalización de imágenes y cuantificación de células (inmunopositivas)**

Se tomaron fotografías del NSQ medial con una cámara digital (Evolution LC) conectada a un microscopio óptico (Olympus), a 20X, que correspondieran con las siguientes coordenadas estereotáxicas (VER ANEXO 1) de Bregma Paxinos y Watson (1998): NSQ (-0.72 mm), DMH (-3.12 mm), ARC (-1.80 mm), (PVN) (-1.32 mm), IGL (-3.96 mm) y NTS (-12.12 mm). De cada sujeto, se adquirieron 2 imágenes las cuales después se analizaron con el programa ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda).

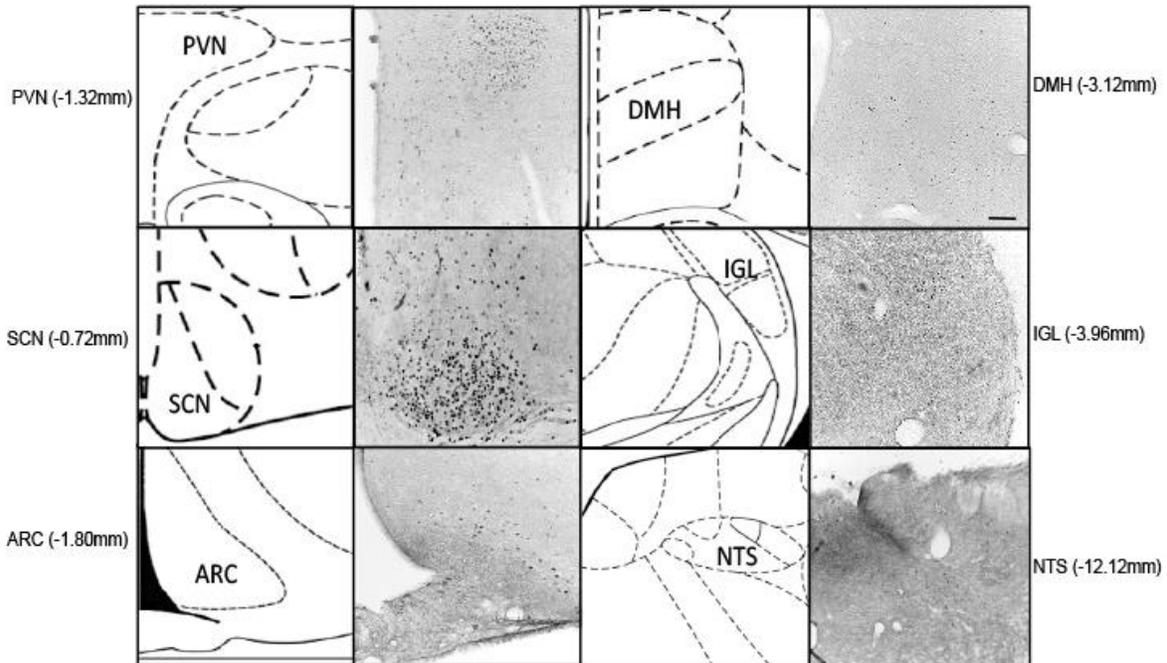


Figura 11. Microfotografías representativas (c-fos) y coordenadas estereotáxicas de Paxinos y Watson (1998) para NSQ (-0.72 mm), DMH (-3.12 mm), ARC (-1.80 mm), (PVN) (-1.32 mm), IGL (-3.96 mm) y NTS (-12.12 mm).

### Análisis de datos

Los datos obtenidos de los conteos celulares en cada núcleo (c-Fos-IR para NSQ, PVN, DMH, NTS y PER1-IR sólo para NSQ) de cada serie experimental se ordenaron de acuerdo a horas geográficas (se presenta como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM), se sometieron a un ajuste Cosinor, usando el programa MatLab. Con este análisis se obtuvieron las amplitudes y las acrofases de cada serie experimental. Las acrofases y las amplitudes se sometieron a un análisis de varianza, seguido de una prueba post-hoc de Tuckey (HSD; honest significant difference). Se consideró un valor estadísticamente significativo con una  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS

### Actividad locomotora

La inspección visual de los actogramas indicó que durante la línea base todas las ratas exhibían un ritmo diario sincronizado con el ciclo LD (Figura 10A,C). En el grupo jet lag el análisis de cosinor para la actividad general en la línea base detectó una acrofase media a las  $16.4 \pm 0.2$  y después del avance de fase de 6 horas todas las ratas exhibieron ciclos transitorios en la actividad general requiriendo más de 5 ciclos transitorios para alcanzar la nueva fase esperada (Figura 10B). La acrofase basal del grupo Jet Lag + alimento fue a las  $16.8 \pm 0.2$  y requirió 3 ciclos transitorios para alcanzar la nueva acrofase esperada, el ANOVA de una vía indicó un efecto significativo entre grupos ( $p < 0.05$  Figura 10D).

## Actividad General

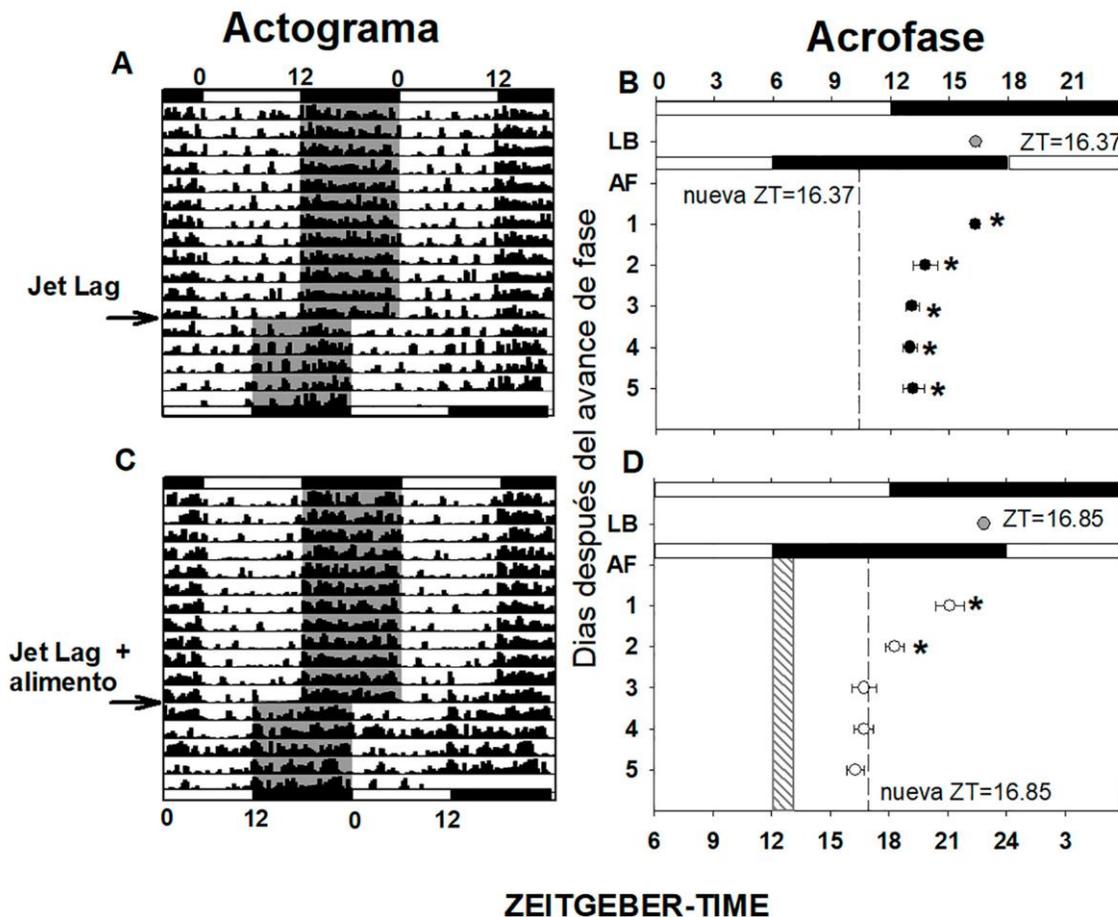


Figura 12. A) Actogramas representativos de actividad general del grupo expuesto al avance de fase 6h (Jet Lag) durante la línea de base y después del avance de fase 6h del ciclo luz-oscuridad (flecha). B) Mapa de acrofases media  $\pm$  SE de la actividad locomotora durante la línea de base (LB) y durante 5 días después del avance de

fase(AF), (n = 8). C) Actograma representativo del grupo expuesto a 6h de avance de fase + 2h de alimentación restringida (Jet Lag + alimento), (flecha). D) Acrofases (media  $\pm$  SE) resultantes del análisis cosinor para la actividad general del grupo Jet Lag + alimento (el acceso al alimento se indica con una barra vertical en rayas oscuras). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con la nueva fase esperada (línea punteada) después de 6h de avance de fase del ciclo luz-oscuridad ( $P < 0.05$ ). Las barras horizontales blancas y negras sobre el eje x y sobre los actogramas indican el ciclo de luz y oscuridad.

### **Estómago**

Los animales control tienen su mayor llenado del estómago en el periodo de alimentación que es en la fase de oscuridad. En los animales que son sometidos a jet lag en condiciones *ad libitum* presentan su mayor periodo de alimentación al finalizar el ciclo de oscuridad y continúa asociado a la fase de oscuridad previa al cambio de horario. Cuando son sometidos a jet lag + 2 horas de alimentación presentan un llenado del estómago posterior a la ingesta de alimento y en capacidad aproximada de 80% respecto a los animales control (Figura 11A). El ANOVA de 2 vías indicó un efecto significativo en la interacción grupo x tiempo para el día 1 ( $F_{(7,48)} = 34.4$ ;  $P < 0.0001$ ); día 2 ( $F_{(7,48)} = 48.3$ ;  $P < 0.0001$ ); día 3 ( $F_{(7,48)} = 61.8$ ;  $P < 0.0001$ ); y día 5 ( $F_{(7,48)} = 81.3$ ;  $P < 0.0001$ ) después del avance de fase. Para el grupo control el mapa de acrofases para el peso del estómago indicó una acrofase en ZT  $20 \pm 0.04$  (Figura 11B), en el grupo Jet Lag las acrofases no cambiaron permaneciendo similares a la condición basal aunque son diferentes de la nueva acrofase esperada. En el grupo Jet Lag + alimento cuando el alimento coincide con la nueva noche produce un efecto inmediato sobre las acrofases del estómago (Figura 11A) ajustándose al nuevo momento de alimentación y por lo tanto supera la nueva acrofase esperada en el nuevo ZT 20 (Figura 11B).

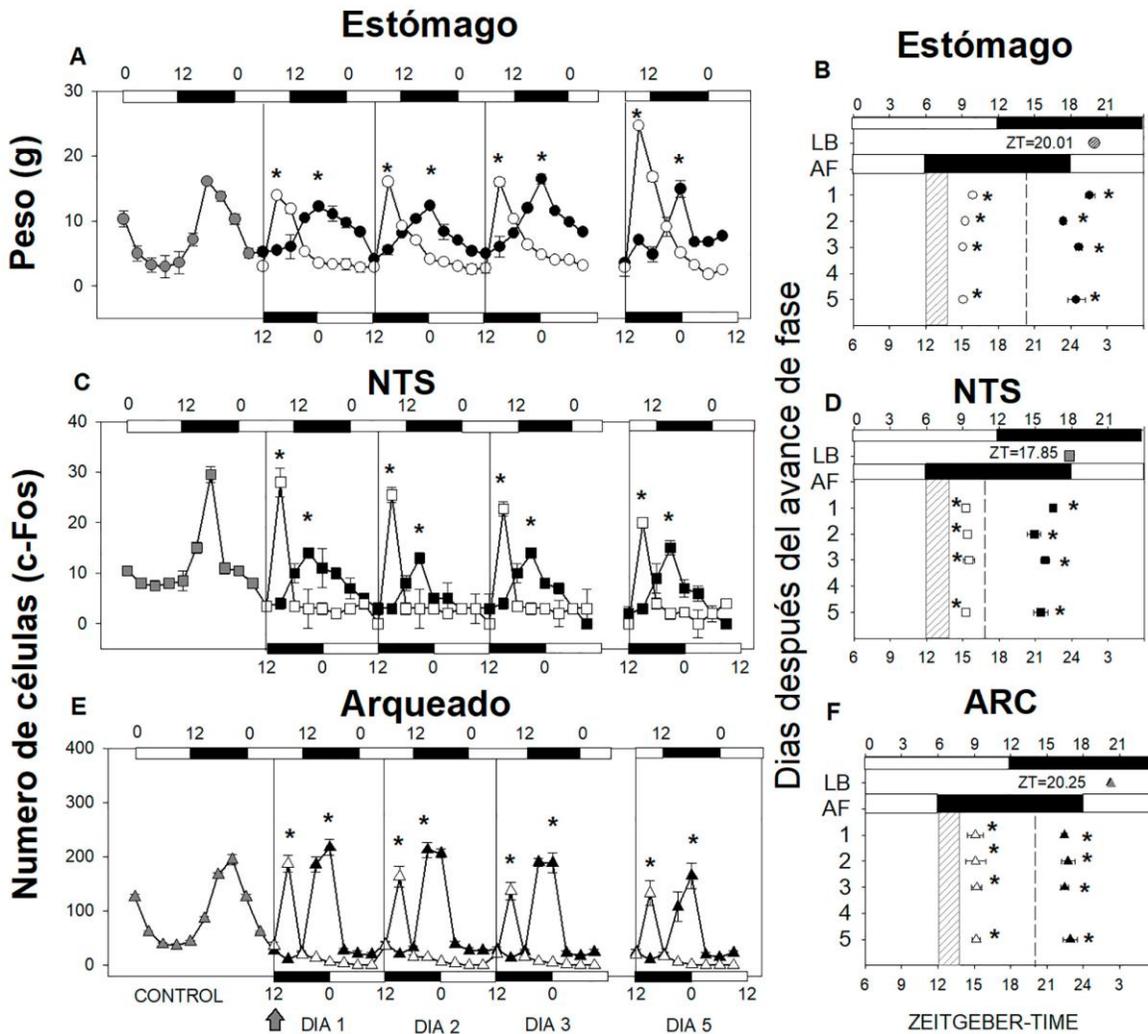


Figura 13. A) Dinámica de re-sincronización durante los 5 días de avance de fase de 6h en el estómago (arriba). C) Número de células positivas c-Fos en el Núcleo del tracto solitario (NTS) y E) Núcleo arqueado (ARC) en el grupo Jet Lag (símbolos negros) y el grupo Jet Lag + alimento (símbolos blancos). El grupo control se representa en el primer ciclo con símbolos grises. B) Acrofases (media  $\pm$  SEM) ( $n = 4$ ) resultante del análisis de cosinor para el peso del estómago, D) para NTS y para ARC (F) después del avance de fase de 6 h del ciclo de oscuridad, respectivamente. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas con respecto a la nueva fase esperada (línea punteada,  $p < 0.05$ ), la flecha indica el tiempo en que la fase de oscuridad avanzó 6 horas. El acceso al alimento está indicado con una barra vertical en rayas oscuras para el grupo Jet Lag + alimento. Las barras horizontales blancas y negras en la parte superior del gráfico indican el ciclo de luz y oscuridad.

### **Núcleo del tracto solitario**

El NTS recibe información aferente directa del sistema digestivo. En el grupo control el NTS mostró un ritmo en la expresión de c-Fos con valores máximos en la fase de oscuridad (Figura 11C) y el grupo Jet lag después del avance de fase mostró una disminución del pico nocturno el cual permaneció acoplado a la noche anterior. Por el contrario, en el 1er día después del avance de fase en el grupo jet lag + Alimento mostró un aumento en el número de células inmunoreactivas a c-Fos después de la hora de comer y este pico permaneció asociado a la hora de alimentación en los días subsecuentes (Figura 11C). Debido a la interacción grupo x tiempo, el ANOVA de 2 vías indicó un efecto significativo en la interacción grupo x tiempo para el día 1 después del avance de fase ( $F_{(7,48)} = 52.6$ ;  $P < 0.0001$ ); día 2 ( $F_{(7,48)} = 45$ ;  $P < 0.0001$ ); día 3 ( $F_{(7,48)} = 41$ ;  $P < 0.0001$ ) y día 5 ( $F_{(7,48)} = 37.4$ ;  $P < 0.0001$ ). En el mapa de acrofases para el grupo control el ritmo de c-Fos indicó una acrofase en ZT  $17.08 \pm 0.3$  (Figura 11D), para el grupo Jet Lag fue similar a lo observado en el estómago, las acrofases no cambiaron permaneciendo similares a la condición basal aunque son diferentes de la nueva acrofase esperada. El alimento al coincidir con la nueva fase de oscuridad en el grupo Jet Lag + Alimento produjo un cambio inmediato de la acrofase en el NTS ajustándose a la nueva hora de la comida similar al peso gástrico (Figura 11D), sin embargo, lo anterior supera la nueva acrofase esperada (ZT 17.8).

## **Arqueado**

En el grupo control, el núcleo ARC similar al NTS mostró un ritmo diurno en la expresión de c-Fos acoplado al ciclo LD, con valores incrementados durante la noche. En el grupo Jet Lag después del avance de fase de 6 horas mantuvo un patrón temporal similar al del grupo CTRL con valores máximos que coincidían con la noche anterior mientras que en el grupo Jet Lag + Alimento desde el primer día después del avance de fase presento un pico asociado con la nueva programación del alimento (Figura 11E). El ANOVA de 2 vías indico un efecto significativo en la interacción grupo x tiempo para el día 1 después del avance de fase ( $F_{(7,48)} = 141.8$ ;  $P < 0.0001$ ); día 2 ( $F_{(7,48)} = 179.4$ ;  $P < 0.0001$ ); día 3 ( $F_{(7,48)} = 101.2$ ;  $P < 0.0001$ ) y día 5 ( $F_{(7,48)} = 28.7$ ;  $P < 0.0001$ ).

El mapa de acrofases indicó para el grupo CTRL una acrofase en ZT  $20.2 \pm 0.02$  (Figura 11F), en el grupo Jet Lag las acrofases se mantuvieron similar a la condición basal y fueron diferentes de la nueva acrofase esperada. El grupo Jet Lag + Alimento mostró una clara activación del núcleo ARC en respuesta a la hora de alimentación desde el primer día después del avance de fase (Figura 11F). Similar a lo observado en el estómago y el NTS la acrofase se ajusta a la hora de la alimentación y supera la acrofase esperada.

## **Paraventricular del hipotálamo**

El núcleo paraventricular responde a las señales metabólicas y es también una de las principales eferencias autónomas y hormonales desde el núcleo supraquiasmático. En el grupo CTRL el PVN mostró una expresión rítmica de c-Fos asociada al ciclo LD con valores máximos al inicio de la fase de oscuridad, mientras que en el grupo Jet Lag después del avance de fase los valores pico permanecieron en la fase de oscuridad anterior. En el grupo Jet Lag + Alimento desde el primer día el PVN mostró un avance de fase rápido y una activación neuronal claramente asociada con la nueva noche y el momento de la alimentación (Figura 12A). El ANOVA de 2 vías indicó un efecto significativo en la interacción grupo x tiempo para el día 1 después del avance de fase ( $F_{(7,48)} = 91$ ;  $P < 0.0001$ ); día 2 ( $F_{(7,48)} = 116.6$ ;  $P < 0.0001$ ); día 3 ( $F_{(7,48)} = 89$ ;  $P < 0.0001$ ) y día 5 ( $F_{(7,48)} = 89$ ;  $P < 0.0001$ ).

( $F_{(7,48)} = 59.2$ ;  $P < 0.0001$ ). El mapa de acrofases indicó para el grupo CTRL una acrofase en ZT  $13.1 \pm 0.1$  (Figura 11B), en el grupo Jet Lag la acrofase se mantuvo similar a la condición basal y es diferente de la nueva acrofase esperada. En el grupo Jet Lag + Alimento, el alimento programado en la nueva noche produjo un cambio inmediato en el PVN desde el primer día después del avance de fase (Figura 12B) sin embargo no se desplazó a la nueva fase esperada.

### **Dorsomedial del hipotálamo**

En el grupo CTRL la expresión de c-Fos en el núcleo DMH mostró una ritmicidad diurna ajustada al ciclo LD con valores máximos durante la fase de oscuridad. Después del avance de fase de 6 horas se observó en el grupo Jet Lag un patrón de activación desorganizado durante los primeros 3 días (Figura 12C) y después de 5 días del avance los valores pico continuaron asociados a la noche anterior. En el grupo Jet Lag + Alimento no se observó un ritmo claro en el primer día después del cambio de horario sin embargo en los días subsecuentes se observaron valores máximos correspondientes al inicio nocturno aunado al acceso de alimento (Figura 12C). El ANOVA de 2 vías indicó un efecto significativo en la interacción grupo x tiempo para el día 1 después del avance de fase ( $F_{(7,48)} = 41.8$ ;  $P < 0.0001$ ); día 2 ( $F_{(7,48)} = 52.2$ ;  $P < 0.0001$ ); día 3 ( $F_{(7,48)} = 148.9$ ;  $P < 0.0001$ ) y día 5 ( $F_{(7,48)} = 55.8$ ;  $P < 0.0001$ ). El mapa de acrofases indicó el ritmo de c-Fos para el grupo CTRL en ZT  $21.4 \pm 0.04$ , tanto para los grupos Jet Lag y Jet Lag + Alimento el análisis de Cosinor no detectó un ritmo significativo el primer día después del cambio de horario (indicado en la línea horizontal punteada). El grupo Jet Lag + Alimento fue desplazado por la influencia del tiempo de alimentación (Figura 12D).

## IGL

La IGL se considera una vía relevante para la integración de señales luminosas desde el núcleo supraquiasmático con el estado metabólico (Saderi et al., 2013). El grupo CRTL mostró una ritmicidad diurna de la expresión de c-Fos, con valores pico en la fase temprana de luz en ZT3. Los grupos Jet Lag y Jet Lag + Alimento mostraron el mismo patrón de activación después del avance de fase de 6 horas, con valores pico en ZT3 coincidiendo con el inicio del nuevo día (Figura 12E). El ANOVA de 2 vías indicó un efecto significativo debido a la interacción de grupo x tiempo en todos los días excepto para el día 2; Los resultados de ANOVA fueron para el día 1 después del avance de fase ( $F_{(7,48)}=13.1$ ;  $P < 0.0001$ ); Día 2 ( $F_{(7,48)}=11.8$ ;  $P = \text{NS}$ ); Día 3 ( $F_{(7,48)}=5.4$ ;  $P < 0.0001$ ); Día 5 ( $F_{(7,48)}=24.6$ ;  $P < 0.0001$ ).

Para el grupo control, el análisis de cosinor indicó una acrofase en ZT  $3.87 \pm 0.21$  ambos grupos experimentales fueron desplazados inmediatamente a la nueva acrofase esperada (línea vertical punteada), este núcleo no mostró activación relacionada con el esquema de alimentación (Figura 12F).

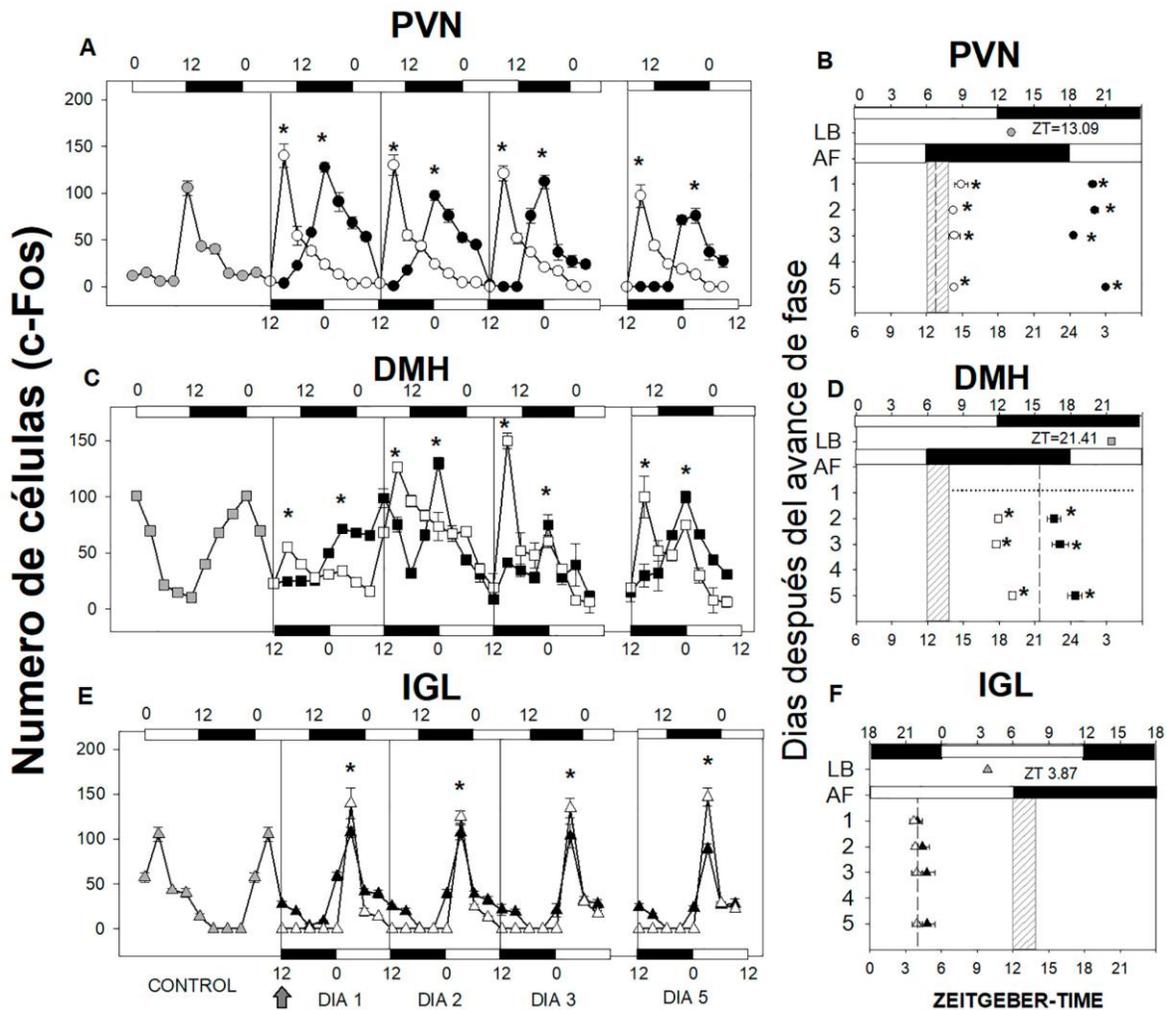


Figura 14 A) Número de células positivas c-Fos en el núcleo paraventricular (PVN), en C) núcleo dorsomedial y E) Ojuela Intergeniculada (IGL) en el grupo Jet Lag (símbolos negros) y Jet Lag + Alimento (símbolos blancos) . El grupo control se representa en el primer ciclo con símbolos grises. Las acrofases (medias  $\pm$  SEM) resultantes del análisis de cosinor para PVN se representan en (B), en (D) para DMH, y en (F) para IGL después del avance de fase de 6 h del ciclo de luz oscuridad, respectivamente. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas con respecto a la nueva fase esperada (línea punteada,  $p < 0.05$ ). Otras indicaciones como en Fig. 2.

### **Núcleo supraquiasmático**

En el núcleo supraquiasmático el grupo control mostró un ritmo diurno de c-Fos ajustado al ciclo LD en las sub-regiones ventral y dorsal, con valores más altos durante el inicio de la fase de luz para la región ventral y al mediodía para la región dorsal (Figura 13); Los valores más bajos se observaron después de apagar la luz (Figura 14A). El análisis de cosinor mostró que el NSC en el grupo CTRL tiene una acrofase en ZT  $6.7 \pm 0.07$  para el NSC total, en ZT  $5.1 \pm 0.13$  para el ventral y ZT  $8.1 \pm 0.15$  para la región dorsal (véase la Figura 14B). Después del avance de fase, el grupo Jet Lag mostró en el NSQ ventral en los primeros 2 días un ritmo diario de c-Fos en fase con el nuevo ciclo LD. En contraste, la región dorsal mostró una arrítmicidad en c-Fos los cinco días después del avance de fase. El grupo Jet Lag + Alimento mostró en NSC ventral una respuesta similar a la del grupo Jet Lag después del cambio de 6h; con una respuesta inmediata a la luz que continuó hasta el día 5. La zona dorsal, también mostró un patrón arrítmico durante los tres primeros días, pero curiosamente mostró ritmicidad en el quinto día con un pico asociado a la fase de oscuridad (ver la Figura 14A). El ANOVA de dos vías indicó un efecto significativo debido a la interacción grupo x tiempo para el día 1 después del avance de fase ( $F_{(7,48)}=3.6$ ;  $P < 0.002$ ); Para el día 2 ( $F_{(7,48)}=3.5$ ;  $P < 0.003$ ); Para el día 3 ( $F_{(7,48)}= 29.6$ ;  $P < 0.0001$ ) y para el día 5 ( $F_{(7,48)}= 11.7$ ;  $P < 0.0001$ ).

Estos datos indican una respuesta desincronizada al avance de fase de 6 h, generada por la respuesta diferencial entre la parte ventral y dorsal.

DIA 1 DESPUES DE 6 HORAS DE AVANCE DE FASE

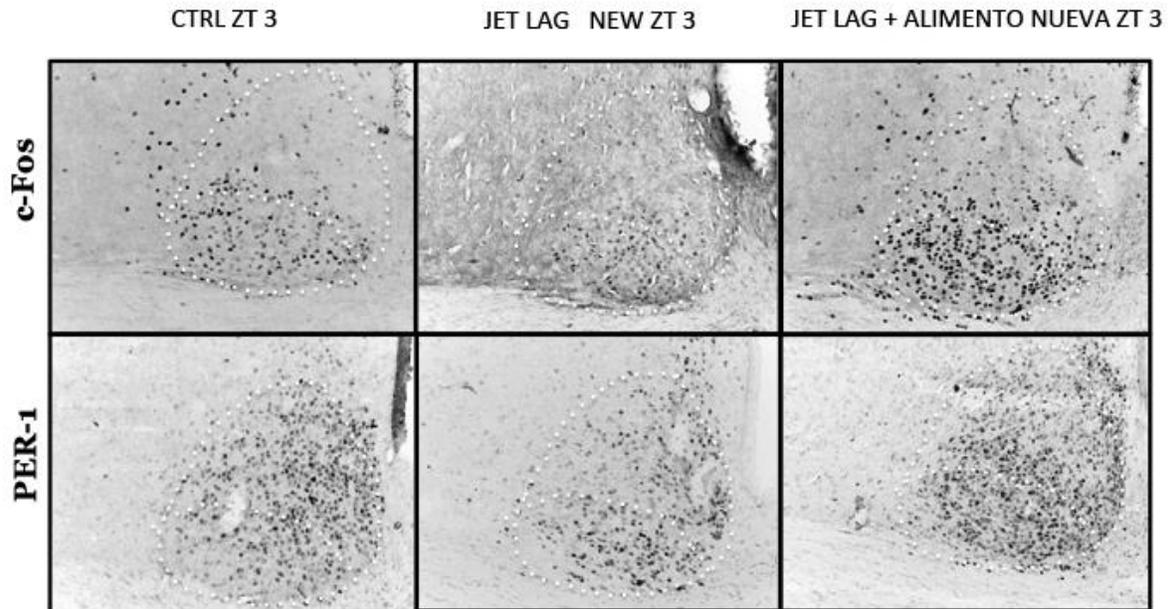


Figura 15. Microfotografías representativas en ZT3 de c-Fos y expresión de PER-1 en el núcleo supraquiasmático (SCN), en el grupo control y primer día después de 6 h avance de fase (grupos jet Lag y Jet Lag + Alimento). 3V = tercer ventrículo; OX = quiasma óptico, la barra de escala corresponde a 50  $\mu$ m.

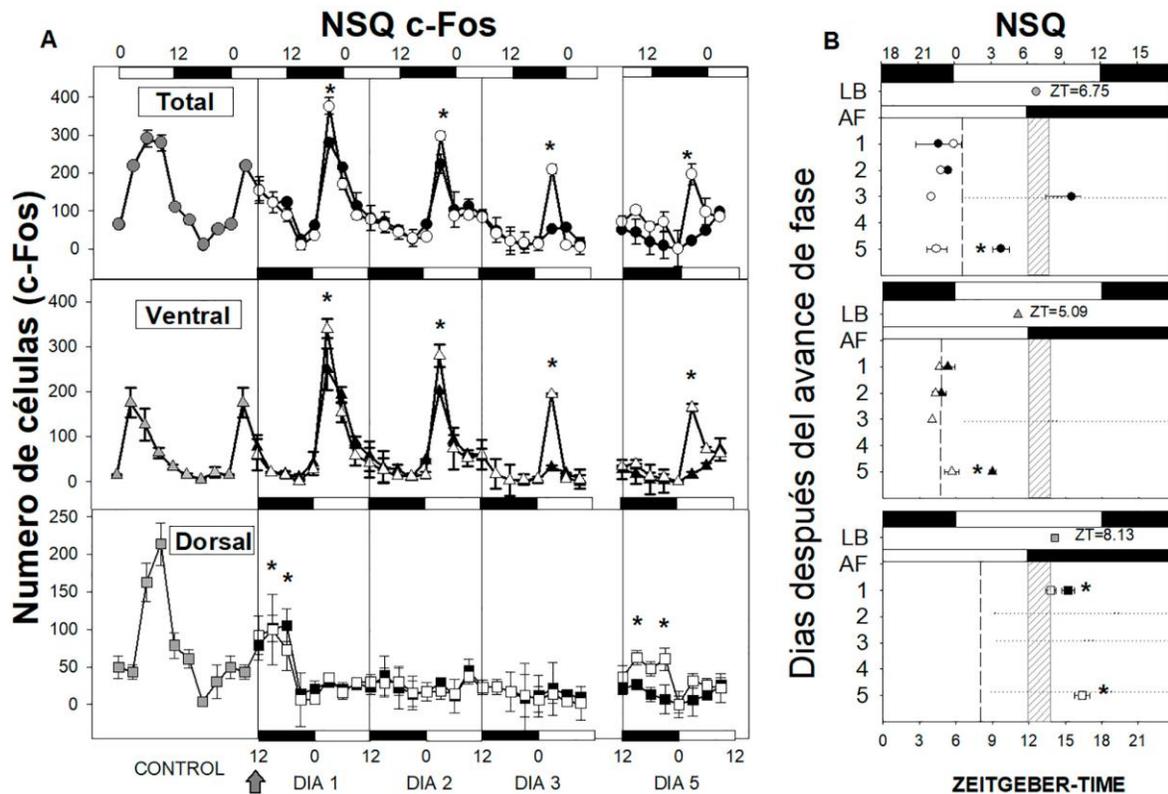


Figura 16. A) Número de células positivas c-Fos en el núcleo supraquiasmático total (parte superior) y NSQ ventral (medio) y NSQ dorsal (parte inferior) en el grupo Jet Lag (símbolos negros) y grupo Jet Lag + Alimento (símbolos blancos). El grupo control se representa en el primer ciclo con símbolos grises. B) Las acrofases (medias  $\pm$  SEM) resultantes del análisis de cosinor para NSQ total se representan en LA PARTE superior, para la región ventral (media) y NSQ dorsal (inferior) después del avance de fase de 6 h del ciclo de luz oscuridad, respectivamente. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas con respecto a la nueva fase esperada (línea punteada,  $p < 0.05$ ). Otras indicaciones como en Fig.12.

### PER1 en el NSQ

La proteína PER1 en el NSQ del grupo control mostró un ritmo diurno con valores bajos durante la fase de luz y valores altos en la fase de oscuridad. La acrofase se detectó en  $ZT 14.4 \pm 0.10$  (ver Figura 15).

En ambos grupos sometidos a avance de fase, el ritmo de la expresión de PER1 en el NSQ disminuyó de amplitud en los dos primeros días después del avance de fase en la región ventral y ambos grupos mostraron una recuperación de la

ritmicidad de la expresión de PER1 en el día 3 después del cambio de fase en ambas regiones. El ANOVA de dos vías indicó un efecto significativo debido a la interacción grupo x tiempo para el día 1 después del avance de fase ( $F_{(7,48)}=12.6$ ;  $P < 0.0001$ ); día 2 ( $F_{(7,48)}=7.3$ ;  $P < 0.0001$ ); día 3 ( $F_{(7,48)}=15.2$ ;  $P < 0.0001$ ); día 5 ( $F_{(7,48)}=12.1$ ;  $P < 0.0001$ ).

El análisis de cosinor para PER1 mostró que ambos grupos, Jet Lag y Jet Lag + Alimento perdieron ritmicidad en los dos primeros días para la parte ventral y mostraron ajuste lento en la región dorsal. Al día cinco el grupo Jet Lag había alcanzado la nueva acrofase esperada en la región ventral, mientras que el grupo Jet Lag + Alimento había alcanzado la acrofase esperada en la región dorsal.

La comparación final de acrofases considerando todas las variables exploradas en este estudio, indicó que el alimento afecta diferencialmente las oscilaciones extra-NSC (Tabla 2). Las estructuras que respondieron directamente a la ingesta de alimentos (estómago, NTS, ARC y DMH) exhibieron grandes avances de fase que se ajustaron a la hora de la comida, mientras que el PVN, la actividad locomotora y el IGL lograron casi la nueva fase esperada. El NSC debido a la pérdida de ritmicidad dificulta la evaluación.

Tabla 2. ESTIMACIÓN DEL AVANCE DE FASE DESPUES DE 5 DÍAS

	Línea base				Fase final				Delta-Phi	
	JL		JL + A		JL		JL + A		AL JL	JL + A
	Promedio	D.E.	Promedio	D.E.	Promedio	D.E.	Promedio	D.E.	Avance (h)	
<b>Actividad</b>	16.4	0.18	16.9	0.19	13.2	0.55	10.3	0.43	3.2	6.6
<b>Estomago</b>	20.0	0.04	20.0	0.04	18.5	0.71	9.1	0.08	1.5	10.9
<b>NTS</b>	17.9	0.32	17.9	0.32	15.5	0.59	9.2	0.30	2.4	8.6
<b>ARC</b>	20.3	0.02	20.3	0.02	16.9	0.59	9.2	0.30	3.3	11.1
<b>PVN</b>	13.1	0.10	13.1	0.10	21.0	0.15	8.3	0.08	-7.9	4.8
<b>DMH</b>	21.4	0.04	21.4	0.04	18.4	0.60	13.1	0.21	3.0	8.3
<b>IGL</b>	3.9	0.22	3.9	0.22	-2.8	0.60	-2.0	0.41	6.7	5.8

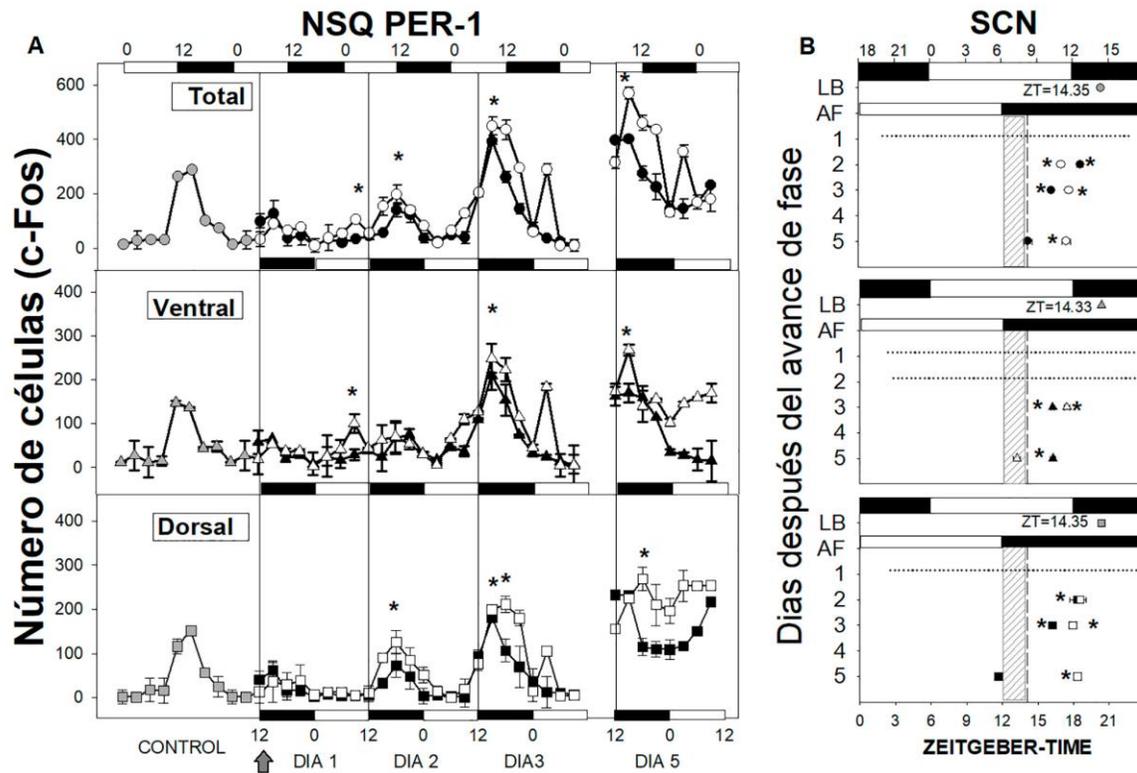


Figura 16. A) Número de células positivas a PER-1 en el núcleo supraquiasmático total (NSQ, arriba) y el NSQ ventral (medio) y dorsal (inferior) del grupo Jet Lag (símbolos negros) y el grupo Jet Lag + Alimento (símbolos blancos). El primer ciclo (símbolos grises) representa el grupo control. B) Las acrofases (medias  $\pm$  SEM) resultantes del análisis de cosinor para NSQ total se representan arriba, para región ventral (centro) y para región dorsal (inferior) después del avance de fase de 6 h del ciclo luz-oscuridad respectivamente. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas con respecto a la nueva fase esperada (línea punteada,  $p < 0.05$ ). Otras indicaciones como en la Fig. 2

## DISCUSIÓN

Este estudio apoya la hipótesis de que en un modelo de avance de fase, el acceso al alimento acoplado a la nueva fase de actividad acelera la resincronización. Lo anterior se debe al ajuste temporal inmediato de las oscilaciones extra NSQ asociadas con la hora de comer. Los resultados actuales también muestran que los núcleos cerebrales que reciben información metabólica cambian inmediatamente su actividad al tiempo de disponibilidad del alimento, mientras que la IGL y el NSQ ventral responden inmediatamente al encendido de la luz.

En el presente estudio, las ratas alimentadas *ad libitum* y expuestas a un avance de fase de 6 horas requirieron más de 5 días para alcanzar la nueva fase en actividad general. Nuestros datos son consistentes con un estudio previo en el que se informó que se necesitaban hasta 10 días para que la rata pudiera sincronizarse después de un avance de fase de 6 h (Ángeles-Castellanos y cols. 2011); esto es similar a los datos obtenidos con experimentos en ratones (Davidson y cols. 2009; An y cols. 2013; Yamaguchi y cols. 2013). En este sentido, confirmamos que dar alimento en sincronía con el nuevo ciclo LD parece ser una estrategia útil para reducir el número de ciclos transitorios (Ángeles-Castellanos y cols. 2011; Carneiro y Araujo 2011) después de un avance de fase.

Estructuras que respondían a los alimentos como el estómago y otras regiones del cerebro exhiben una respuesta inmediata a la nueva hora de la comida, alcanzando una nueva acrofase que superaba la nueva fase esperada.

Las ratas del grupo Jet Lag + Alimento mostraron un aumento significativo del peso del estómago inducido por los alimentos en la nueva ZT12, aumentando  $24,65 \pm 1.31$  g durante las 2 h de acceso al alimento. Esto coincide con las observaciones previas de un ciclo diario de distensión del estómago inducido por la alimentación restringida (Martínez-Merlos y cols. 2004). El evento de comida restringida provocó un aumento de c-Fos-IR en el NTS, ARC y PVN, lo cual es consistente con estudios previos que mostraron aumento de c-Fos-IR en núcleos de tronco encefálico inducidos por una comida o distensión gástrica (Renaud y

cols. 1987; Verbalis y cols. 1991; Olsen y cols. 1993; Emond y cols. 2001; Ángeles-Castellanos y cols. 2005). Por otra parte, un estudio realizado en crías de conejo (Morgado et al., 2011) determinó que la distensión del estómago por alimentación programada o por infusión intragástrica de leche es un estímulo de sincronización suficiente para las regiones hipotalámicas implicadas en el metabolismo y la conducta de alimentación. La distensión del estómago causada por un evento de alimentación genera señales sensoriales al NTS, que recibe, aferencias del estómago, intestino e hígado y transmite esta información visceral hasta otras áreas de integración del sistema nervioso central (Renaud et al., 1987). También se ha observado un aumento del c-Fos en el NTS debido a la distensión del estómago producida por la inflación de un globo gástrico (Verbalis et al., 1991) o por la alimentación (Emond et al., 2001; Ángeles-Castellanos et al., 2005). La ingesta de alimento también genera señales humorales que son recibidas principalmente por el ARC. En el grupo Jet Lag + Alimento el ARC mostró un cambio inmediato en la activación neuronal asociado con el acceso al alimento, mientras que la activación neuronal en el grupo Jet Lag se mantuvo ajustada a la noche anterior. El ARC es un núcleo en el hipotálamo donde la información metabólica llega de la circulación y se transmite a otros núcleos hipotalámicos especialmente al PVN, al DMH, al hipotálamo lateral (LH) y al NSQ (Williams et al., 2001; Waterson y Horvath, 2015). A pesar de la importante relación anatómica y funcional del ARC con el NSQ (Yi et al, 2006, Saderi et al., 2013), los datos actuales muestran que para el NSQ la información fótica es predominante sobre las señales metabólicas.

Curiosamente, en el grupo Jet Lag + Alimento observamos un aumento de la activación neuronal del PVN después de la ingesta de alimento. Estudios previos indican que el PVN responde a la distensión gástrica y a la distensión del estómago (Renaud et al., 1987, Ueta et al., 2000, Ángeles-Castellanos et al., 2004), recibe señales directas tanto del NTS como del NSQ y es el principal integrador de señales circadianas y metabólicas que se traducen en señales hormonales y autónomas (Kalsbeek et al., 1996, Buijs et al., Perreau-Lenz et al., 2003). Por lo tanto, es posible que el acceso al alimento en el momento de la

nueva noche pueda influir, a través del PVN, tanto en la salida circadiana como metabólica hacia los osciladores extra NSQ.

El DMH está involucrado en la sincronización por alimento (Ángeles-Castellanos et al., 2004, Gooley et al., 2006, Acosta-Galvan et al., 2011). Los datos actuales demuestran que la restricción de alimento desacopla la actividad de DMH de la del NSQ y presenta un patrón de fase de activación celular relacionado con la hora de comer. El DMH está sincronizado con el NSQ en condiciones LD, pero puede desplazar sus oscilaciones diarias a los horarios de alimentación (Mieda et al., 2006; Verwey et al., 2007). El DMH responde a señales humorales incluyendo grelina (Mitchell et al., 2001), leptina (Elmqvist et al., 1998), glucosa e insulina; distribuye información metabólica a las regiones cerebrales que regulan el sueño-vigilia, temperatura corporal y la secreción de corticosteroides (Herzog y Muglia, 2006). Acosta-Galvan et al. (2011) mostró una estrecha interacción DMH-NSQ, donde la activación del DMH inhibe temporalmente el NSQ para permitir a los animales anticiparse.

La IGL y el NSQ ventral obedecen principalmente a las señales fóticas. La IGL recibe una proyección densa, bilateral de la retina y proyecta al NSQ a través del tracto genículo-hipotalámico (Moore & Card, 1994). La IGL desempeña un papel clave en la transmisión de información no fótica al NSQ (Harrington et al., 1985), incluyendo información sobre las condiciones metabólicas del animal (Saderi et al., 2013). Además, otra evidencia indica que la IGL está involucrada en mediar los cambios de fase de los ritmos circadianos inducidos por estímulos no-fóticos (Wickland y Turek, 1994, Challet et al., 1996). Aquí, mostramos que bajo un avance de fase o jet lag experimental, la IGL responde sólo a la señalización fótica asociada con el inicio de la luz; en el presente protocolo experimental no se produjo un cambio de fase temporal de la actividad en la IGL.

En la región ventral del NSQ se obtuvo la expresión de c-Fos por inicio de la nueva fase de luz confirmando que c-Fos es inducido por la luz (Rusak et al., 1990). Los datos actuales confirman un estudio previo donde un ajuste inmediato similar en la activación c-Fos fue observado en ratas después de un avance de fase de 6 h (Nagano et al., 2003). Esta región ventral, a diferencia del NSQ

dorsomedial, no tiene ritmicidad en la expresión endógena de c-Fos (Sumova et al., 1998). Curiosamente, también en la expresión de PER1 se experimentó un cambio rápido, que permaneció constante durante los siguientes 5 días, mostrando que también PER1 en la región ventral puede responder a la luz. Contrastando con la región ventral, durante los 5 días siguientes al cambio de fase de 6 h, la fluctuación temporal de c-Fos y PER1 en el NSQ dorsomedial fue abolido. Así, el avance de fase de 6 h del ciclo LD causó una disociación inmediata de las oscilaciones circadianas entre ambas subregiones del NSQ. Los datos actuales muestran que la señal fótica predomina sobre cualquier otra señal en la actividad neuronal del NSQ e IGL neuronal, consecuentemente, consideramos que la sincronización rápida en estructuras extra-NSQ se genera por las señales metabólicas y este cambio requiere ser coordinada con la fase impuesta por la luz a la IGL y NSQ. Aquí, proporcionamos pruebas de que al menos dos sistemas contribuyen a el ajuste diario del sistema circadiano: uno basado en la luz y otro basado en señales metabólicas. Otros estudios han sugerido que el ajuste a los ciclos diarios depende de la integración de Zeitgebers múltiples además del ciclo de LD (Blum et al., 2012; Webb et al., 2014). La aceleración de la resincronización ha sido en modelos experimentales de jet lag, utilizando el acceso programado a una rueda de actividad (Castillo et al., 2011, Flores et al., 2016), dando corticosterona (Kiessling et al., 2010) o con melatonina (Ángeles-Castellanos et al., 2011, Pfeffer et al., 2012). Este estudio proporciona evidencia de que el alimento es una señal eficiente de arrastre para el sistema circadiano, logrando cambiar la actividad de estructuras centrales, mediando así las respuestas metabólicas y autonómicas que sincronizan las oscilaciones extra-NSQ a la hora de la comida.

## **CONCLUSIÓN**

El avance de fase ocasiona cambios rápidos en las señales de entrada al sistema circadiano mediante la exposición de la luz hacia el NSQ debido a un cambio en el ciclo de LD. La manipulación experimental utilizada en este estudio imita los vuelos transatlánticos de oeste a este. Indica que la desincronización circadiana

interna se produce debido a un conflicto de Zeitgebers que desencadenan una respuesta diferencial a la luz y a los alimentos en las distintas regiones cerebrales. Esta desincronización puede ser la causa de los síntomas de enfermedad resultantes del cambio transmeridional rápido experimentado por los viajeros, así como por los trabajadores por turnos que están expuestos a cambios frecuentes debido a sus horarios de trabajo. Los datos actuales también confirman la importancia de mantener los programas de alimentación acoplados al inicio de la actividad con el fin de mantener la sincronía interna ya que el alimento asociado al nuevo horario de actividad sincroniza los ritmos de actividad neuronal. Los factores no fóticos, en este caso el alimento; son importantes ya que pueden modular las respuestas circadianas a la luz y/o modificar la organización rítmica regulada por el ciclo luz-oscuridad (Figura 16). Aparentemente, la señal metabólica no es de importancia para el núcleo supraquiasmático cuando el reloj se sincroniza con un ciclo LD (Damiola et al, 2000; Sládek et al, 2007). Este estudio muestra que la señal de alimento podría llegar a ser importante cuando la función del NSQ se distorsiona como en el caso del avance de fase.

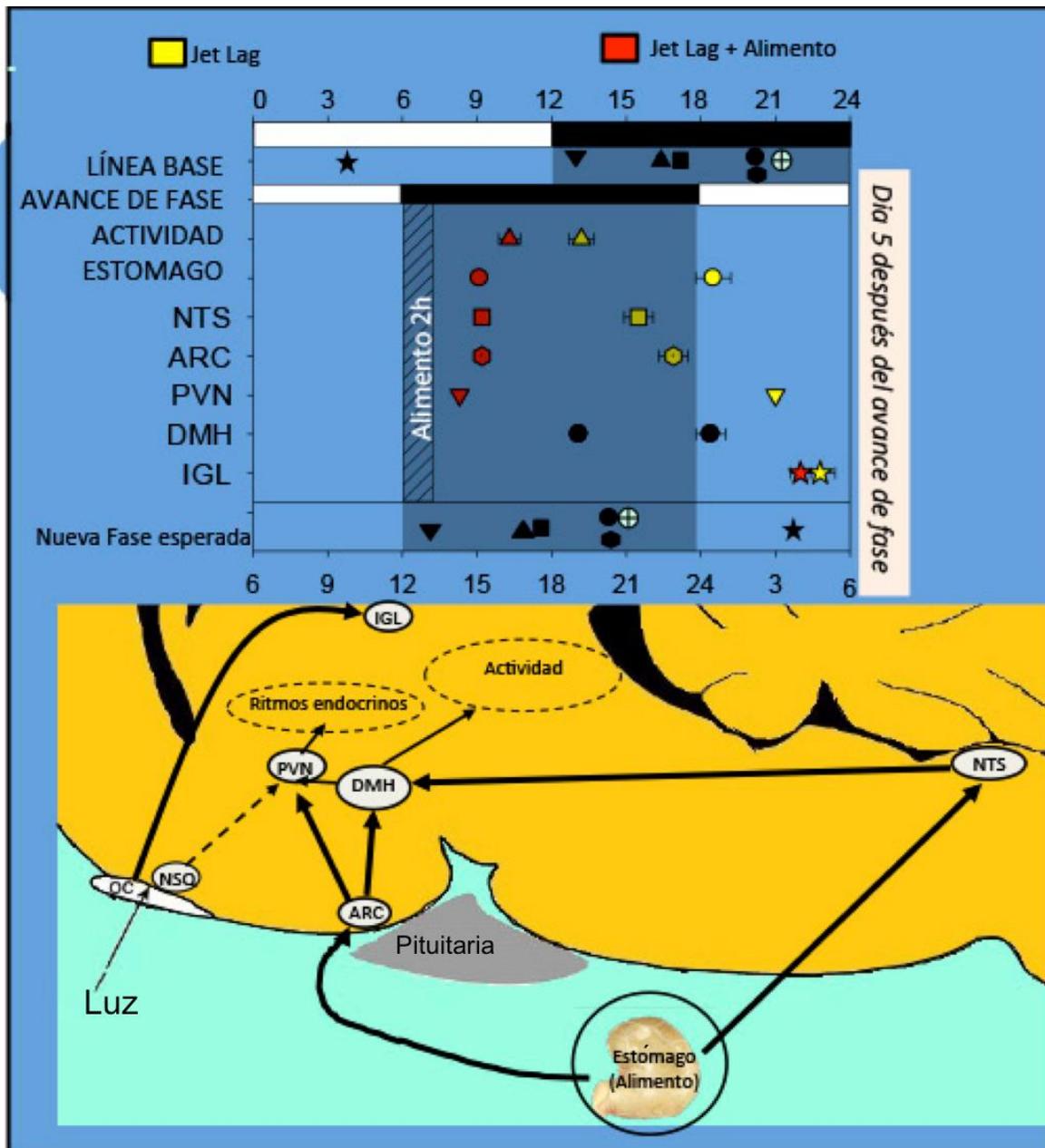


Figura 16. El individuo expuesto a un avance de fase requiere 7-10 ciclos para resincronizarse. Los alimentos programados que coinciden con el nuevo comienzo nocturno aceleran la resincronización. Aquí mostramos que los alimentos programados en fase con la nueva noche produjeron un cambio inmediato en las áreas cerebrales que reciben y procesan señales generadas por alimentos (símbolos rojos), contrastando con regiones cerebrales que reciben luz directa de la retina (IGL y NSQ). Estas observaciones indican que los efectos de la alimentación programada están mediados por estructuras de primer y segundo orden para el SNA (Ubaldo y cols 2017).

## REFERENCIAS

Abe, M., Herzog, E.D., Yamazaki, S., Straume, M., Tei, H., Sakaki, Y., Menaker, M. & Block, G.D. (2002) Circadian rhythms in isolated brain regions. *J. Neurosci.*, 22, 350–356.

Acosta-Galvan, G., Yi, C. X., van der Vliet, J., Jhamandas, J.H., Panula, P., Angeles-Castellanos, M., Basualdo, M.C, Escobar, C. & Buijs, R.M. (2011) Interaction between hypothalamic dorsomedial nucleus and the suprachiasmatic nucleus determines intensity of food anticipatory behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108, 5813-5818.

Aguilar-Roblero R, Morin L and Moore RY. (1994) Morphological correlates of circadian rhythms restoration induced by transplantation of the suprachiasmatic nucleus in hamster. *Experimental Neurology*. 130:250-260.

An, S., Harang, R., Meeker, K., Granados-Fuentes, D., Tsai, C.A., Mazuski, C., Kim, J., Doyle, III F.J., Petzold, L.R. & Herzog, E.D. (2013) A neuropeptide speeds circadian entrainment by reducing intercellular synchrony. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110, E4355-E4361.

Ando H, Yanagihara H, Hayashi Y, Obi Y, Tsuruoka S, Takamura T, Kaneko S, Fujimura A. (2005) Rhythmic messenger ribonucleic acid expression of clock

genes and adipocytokines in mouse visceral adipose tissue. *Endocrinology*. 146(12):5631-6.

Ángeles-Castellanos, M., Aguilar-Roblero, R. & Escobar, C. (2004) C-Fos expression in hypothalamic nuclei of food-entrained rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 286, R158–R165.

Ángeles-Castellanos, M., Mendoza, J., Díaz-Muñoz, M. & Escobar, C. (2005) Food entrainment modifies the c-Fos expression pattern in brain stem nuclei of rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 288, R678-84.

Ángeles-Castellanos, M., Mendoza, J. & Escobar, C. (2007) Restricted feeding schedules phase shift daily rhythms of c-Fos and protein Per1 immunoreactivity in corticolimbic regions in rats. *Neuroscience*, 144, 344–355.

Ángeles-Castellanos, M., Amaya, J.M., Salgado-Delgado, R., Buijs, R.M. & Escobar, C. (2011) Scheduled food hastens re-entrainment more than melatonin does after a 6-h phase advance of the light-dark cycle in rats. *J. Biol. Rhythms*, 26, 324–334.

Ángeles-Castellanos, M., Salgado-Delgado, R., Rodríguez, K., Buijs, R. M. & Escobar, C. (2008) Expectancy for food or expectancy for chocolate reveals timing systems for metabolism and reward. *Neuroscience*, 155, 297-307.

Antle MC, Silver R. (2005) Orchestrating time: arrangements of the brain circadian clock. *Trends Neurosci* 28(3):145-51.

Arendt, J. & Skene, D.J. (2005) Melatonin as a chronobiotic. *Sleep Med. Rev.*, 9, 25–39.

Aschoff J. (1981) Free running and entrained circadian rhythms. Handbook of Behavioral Neurobiology. Vol. 4: *Biological Rhythms* (Jurgen Aschoff, Ed) New York: Plenum Press.

81-93.

Aschoff J., Fatranska M., Giedke H., Doerr P., Stamm D., Wisser H. (1971) Human circadian rhythms in continuous darkness: entrainment by social cues. *Science* 171, pp. 213–215.

Bass J. (2012) Circadian topology of metabolism. *Nature* 491 (7424) pp. 348–356.

Bass J & Takahashi J. (2010) Circadian integration of metabolism and energetics. *Science* 330(60009):1349-1354.

Blum, I.D., Lamont, W.E. & Abizaid, A. (2012) Competing clocks: Metabolic status moderates signals from the master circadian pacemaker. *Neuroscience & Biobehavioral reviews*, 36, 254-270.

Bodosi B, Gardi J, Hadju I, Szentirmai E, Obal F Jr, Krueger JM. (2004) Rhythms of ghrelin, leptin and sleep in rats: effects of the normal diurnal cycle, restricted feeding, and sleep deprivation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 287(5): R1071-9.

Boulamery-Velly A, Simon N, Vidal J, Mouchet J, Bruguerolle B (2005) Effects of threehour restricted food access during the light period on circadian rhythms of temperature, locomotor activity, and heart rate in rats. *Chronobiol. Int.* 22:489–498.

Buijs, R.M., Chun, S.J., Nijijima, A., Romijn, H.J. & Nagai, K. (2001) Parasympathetic and sympathetic control of the pancreas: a role for the suprachiasmatic nucleus and other hypothalamic centers that are involved in the regulation of food intake. *J. Comp. Neurol.*, 432, 405–423.

Buijs, F.N., Cazarez, F., Basualdo, M.C., Scheer, F.A., Perusquia, M., Centurion, D. & Buijs, R.M. (2014) The suprachiasmatic nucleus is part of a neural feedback circuit adapting blood pressure response. *Neuroscience*, 266, 197–20.

Burgess, H., Crowley, S., Gazda, C., Fogg, L. & Eastman, C. (2003) Preflight adjustment to eastward travel: 3 days of advancing sleep with and without morning bright light. *J. Biol. Rhythms*, 18, 318-328.

Carneiro, B.T.S. & Araujo, J.F. (2011) Influence of scheduled restricted feeding on reentrainment of motor activity rhythm after a 6h light-dark advance in rats. *Psychology Neuroscience*, 4, 317-322.

Cassone VM, Stephan FK (2002) Central and peripheral regulation of feeding and nutrition by the mammalian circadian clock: implications for nutrition during manned space flight. *Nutrition* 18:814–819.

Castillo, C., Molyneux, P., Carlson, R. & Harrington, M.E. (2011) Restricted Wheel Access following a light cycle inversion slows re-entrainment without internal desynchrony as measured in *Per2* mice. *Neuroscience*, 19:169-176.

Challet, E., Malan, A. & Pévet, P. (1996) Daily hypocaloric feeding entrains circadian rhythms of wheel-running and body temperature in rats kept in constant darkness. *Neuroscience Letters*, 211:1- 4.

Comperatore CA, Stephan FK (1987) Entrainment of duodenal activity to periodic feeding, *J. Biol. Rhythms* 2:227–242.

Czeisler CA, Duffy JF, Shanahan TL, Brown EM, Mitchell JF, Rimmer DW, Ronda JM, Silva EJ, Allan JS, Emens JS, Dijk DJ, Kronauer RE. (1999) Stability, precision, and near-24-hour period of the human circadian pacemaker. *Science* 284(5423): 2177–81.

Damiola F, Le Minh N, Preitner N, Kornmann B, Fleury-Olela F and Schibler U. (2000) Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissue from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev.* 14:2950-2961.

Davidson, A.J., Castañon-Cervantes, O., Leise, T.L., Molyneux, P.C. & Harrington, M.E. (2009) Visualizing jet lag in the mouse suprachiasmatic nucleus and peripheral circadian timing system. *Eur. J. Neurosci.*, 29,171-80.

De Boer SF, Van der Gugten J (1987) Daily variations in plasma noradrenaline, adrenaline and corticosterone concentrations in rats. *Physiol Behav* 40:323–328.

Díaz-Muñoz M., Vázquez-Martínez O., Báez-Ruíz., Martínez-Cabrera M., Soto-Abraham V., Ávila-Casado M and Larriva-Sahd J. (2010) Daytime food restriction alters liver, glycogen, triacylglycerols and cell size. A histochemical, morphometric and ultrastructural study *Comparative Hepatology.*, 9:5.

Dibner C., Schibler U., Albrecht U. (2010) The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks *Annu Rev Physiol*, 72:517–549.

Challet E. (2012) CRONOBIOLOGIA Bases y aplicaciones en la nutrición. *Editorial Panamericana.*

Elmquist, J.K., Ahima, R.S., Elias, C.F., Flier, J.S. & Saper, C.B. (1998) Leptin

activates distinct projections from the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:741–746.

Emond, M.H., Schwartz, G.J. & Moran, T.H. (2001) Meal-related stimuli differentially induce c-Fos activation in the nucleus of the solitary tract. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 280: R1315–R1321.

Escobar, C., Díaz-Muñoz, M., Encinas, F. & Aguilar-Roblero, R. (1998) Persistence of metabolic rhythmicity during fasting and its entrainment by restricted feeding schedules in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 274: R1309–R1316.

Feillet, C.A., Mendoza, J., Pévet, P. & Challet, E. (2008) Restricted feeding restores rhythmicity in the pineal gland of arrhythmic suprachiasmatic-lesioned rats. *Eur. J. Neurosci.*, 28:2451–2458.

Flores, D.E., Bettilyon, C.N., Jia, L. & Yamazaki, S. (2016) The running wheel enhances food anticipatory activity: An exploratory study. *Front. Behav. Neurosci.*, 10, 143 doi: 10.3389/fnbeh.2016.00143.

Golombek DA, Rosenstein RE (2010) Physiology of circadian entrainment. *Physiol Rev* 90(3):1063-102.

Gooley, J.J., Schomer, A. & Saper, C.B. (2006) The dorsomedial hypothalamic nucleus is critical for the expression of food-entrainable circadian rhythms. *Nat. Neurosci.*, 9, 398–407.

Guan Zhiwei, Vgontzas Alexandros N, Bixler Edward O, Fang Jidong. (2008) Sleep is increased by weight gain and decreased by weight loss in mice. *Sleep* 5:627–33.

Hara, R., Wan, K., Wakamatsu, H., Aida, R., Moriya, T., Akiyama, M. & Shibata, S. (2001) Restricted feeding entrains liver clock without participation of the suprachiasmatic nucleus. *Genes Cells*, 6:269–278.

Harrington, M.E., Nance, D.M. & Rusak, B (1985) Neuropeptide Y immunoreactivity in the hamster geniculo-suprachiasmatic tract. *Brain Res. Bull.*,15:465-472.

Hastings M. H., Reddy A. B., Maywood E. S. (2003) A clockwork web: circadian timing in brain and periphery in health and disease. *Nat Rev Neurosci* 4(8):649-61.

Herzog, E.D. & Muglia, L.J. (2006) You are when you eat. *Nature Neuroscience*, 9:300-302.

Herzog ED, Takahashi JS, Block GD. (1998) Clock controls circadian period in isolated suprachiasmatic nucleus neurons, *Nature Neuroscience* 1:708–713.

Hirao J, Arakawa S, Watanabe K, Ito K, Furukawa T (2006) Effects of restricted feeding on daily fluctuations of hepatic functions including p450 monooxygenase activities in rats, *J. Biol. Chem.* 281:3165–3171.

Hirota T, Fukada Y (2004) Resetting mechanism of central and peripheral circadian clocks in mammals. *Zoolog. Sci.* 21:359–368.

Honma KI, Honma S, Hioshige T (1983) Critical role of food amount for prefeeding corticosterone peak in rats, *Am. J. Physiol.* 245:R339–R344.

Inouye, S. I. T. & Kawamura, H. (1979) Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic 'island' containing the suprachiasmatic nucleus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 76:5962–5966.

Kalsbeek, A., Vanheerikhuize, J.J., Wortel, J. & Buijs, R.M. (1996) A diurnal rhythm of stimulatory input to the hypothalamo- pituitary-adrenal system as revealed by timed intrahypothalamic administration of the vasopressin V-1 antagonist. *J. Neurosci.*, 16:5555–5565.

Kalsbeek A., van Heerikhuize J. J., Wortel J., Buijs R. M. (1998) Restricted daytime feeding modifies suprachiasmatic nucleus vasopressin release in rats. *J Biol Rhythms* 13(1):18-29.

Kiessling, S., Eichele, G. & Oster, H. (2010) Adrenal glucocorticoids have a key role in circadian resynchronization in a mouse model of jet lag. *J. Clin. Invest.*, 120:2600-2609.

Klein DC, Moore RY, Reppert SM (1991) *Suprachiasmatic Nucleus: The Mind's Clock*. Oxford University Press, New York.

Krieger, D.T. (1979) Regulation of circadian periodicity of plasma corticosteroid concentrations and of body temperature by time of food presentation. In: *Biological Rhythms and Their Central Mechanism*, edited by Suda M, Hayaishi O, and Nakagawa H. New York: Elsevier/North-Holland Biomedical, 247–259.

La Fleur SE, Kalsbeek A, Wortel J, Buijs RM (1999) A suprachiasmatic nucleus generated rhythm in basal glucose concentrations. *J Neuroendocrinol* 11:643–652.

Leak RK and Moore RY. (2001) Topographic organization of suprachiasmatic nucleus projection neurons. *J. Comp. Neurol.* 433:312-334.

Martínez-Merlos, M.T., Ángeles-Castellanos, M., Díaz-Muñoz, M., Aguilar-Roblero, R., Mendoza, J. & Escobar, C. (2004) Dissociation between adipose tissue signals, behavior and the food-entrained oscillator. *Journal of Endocrinology*, 181:53–63.

Maywood ES, O'Neill JS, Chesham JE, Hastings MH. (2007) Minireview: The circadian clockwork of the suprachiasmatic nuclei--analysis of a cellular oscillator that drives endocrine rhythms. *Endocrinology* 148(12):5624-34.

Mendoza, J., Gormelen, S., Dumont, S., Sage-Ciocca., Pévet, P. & Challet, E. (2012) Setting the main circadian clock of a diurnal mammal by hypocaloric feeding. *Journal of physiology* 590:3155-3168.

Merkestein, M., van Gestel, M.A., van der Zwaal, E.M., Brans, M.A., Luijendijk, M.C., van Rozen, A.J., Hendriks, Jn., Garner, K.M., Boender, A.J., Pandit, R. & Adan, R. (2014) GHS-R1a signaling in the DMH and VMH contributes to food anticipatory activity. *Int. J. Obes.*, 38:610–618.

Mieda, M., Williams, S.C., Richardson, J.A., Tanaka, K. & Yanagisawa, M. (2006) The dorsomedial hypothalamic nucleus as a putative food-entrainable circadian pacemaker. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 103:12150–12155.

Mills J.N., Minors D.S., Waterhouse J.M. (1974) The circadian rhythms of human subjects without timepieces or indication of the alternation of day and night. *J Physiol*, 240 (3):567–594.

Mistlberger, R.E. & Skene, D.J. (2004) Social influences on mammalian circadian rhythms: animal and human studies. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 79:533-556.

Mitchell, V., Bouret, S., Beauvillain, J.C., Schilling, A., Perret, M., Kordon, C. & Epelbaum, J. (2001) Comparative distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue-receptor (GHS-R) in *Microcebus murinus* (Primate, lemurian) and rat forebrain and pituitary. *J. Comp. Neurol.*, 429:469–489.

Moga MM, Moore RY. (1997) Organization of neural inputs to the suprachiasmatic nucleus in the rat. *J Comp Neurol.*, 389(3):508-34.

Moga MM, Moore RY. (1996) Putative excitatory amino acid projections to the suprachiasmatic nucleus in the rat. *Brain Res.* 743(1-2):171-7.

Moore RY. (1998) Circadian timing: En Zigmond, Bloom, et al. *Fundamental Neuroscience. Academia Press.* Cap. 45:1189-1209.

Moore, R.Y. & Card, J.P. (1994) Intergeniculate leaflet: an anatomically and functionally distinct subdivision of the lateral geniculate complex. *J. Comp. Neurol.*, 344:403–430.

Moore RY and Eichler ME. (1972) Loss of circadian corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Research*. 42:201-206.

Morgado, E., Juárez, C., Melo, A., Dominguez, B., Lehman, M., Escobar, C., Meza, E., Caba, M. (2011) Artificial feeding synchronizes behavioral, hormonal, metabolic and neural parameters in mother-deprived neonatal rabbit pups. *Eur. J. Neuroscience*, 34:1807-16.

Morgan, J.I. & Curran, T. (1991) Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes *fos* and *jun*. *Annu. Rev. Neurosci.*, 14:421–451.

Mukherji, A., Kobiita, A., Chambon, P. (2015) Shifting the feeding of mice to the rest phase creates metabolic alterations which on their own shift the peripheral circadian clocks by 12 hour. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112: E6683-6690.

Nagano, M., Aadachi, A., Nakahama, K.I., Nakamuta, T., Tamada, M., Meyer-Bernstein, E., Sehgal, A. & Shigeyoshi, Y. (2003) An abrupt shift in the day/night cycle causes desynchrony in the mammalian circadian center. *J. Neuroscience*, 23:6141-6151.

Nakamura, W., Yamazaki, S., Takasu, N.N., Mishima, K. & Block, G.D. (2005) Differential response of Period 1 expression within the suprachiasmatic nucleus. *J. Neurosci.*, 25:5481-5487.

Nicolaidis S. (2006) Metabolic mechanism of wakefulness (and hunger) and sleep (and satiety): role of adenosine triphosphate and hypocretin and other peptides. *Metabolism* 55(10 Suppl. 2): S24–29.

Okamura H, Yamaguchi S, Yagita K. (2002) Molecular machinery of the circadian clock in mammals. *Cell Tissue Res* 309: 47–56.

Olson, B.R., Freilino, M., Hoffman, G.E., Sved, A.F., Stricker, E.M. & Verbalis, J.G. (1993) c-Fos expression in rats brain stem nuclei in response to treatment that alters food intake and gastric motility. *Mol. Cell. Neurosci.*, 4:93–106.

Papaioannou V, Mebazaa A, Plaud B and Legrand M. (2014) 'CHRONOMICS in ICU: circadian aspects of immune response and therapeutic perspectives in the critically ill. *Intensive Care Medicine Experimental* 2:18.

Paxinos, G. & Watson, C. (1998) The rat brain in stereotaxic coordinates. *New York: Academic Press.*

Perreau-Lenz, S., Kalsbeek, A., Garidou, M.L., Wortel, J., Van Der Vliet, J., Van Heijningen, C., Simonneaux, V., Pevet, P. & Buijs, R.M. (2003) Suprachiasmatic

control of melatonin synthesis in rats: inhibitory and stimulatory mechanisms. *Eur. J. Neurosci.*, 17:221-228.

Pfeffer, M., Rauch, A., Korr, HW. & von Gall, C. (2012) The endogenous melatonin (MT) signal facilitates reentrainment of the circadian system to light-induced phase advances by acting upon MT2 receptors. *Chronobiol. Int.*, 29(4):415-29.

Pittendrigh C. Circadian system: Entrainment. Handbook of Behavioral Neurobiology. Vol. 4: Biological Rhythms (Jurgen Aschoff, Ed) New York: Plenum Press. 95-124, 1981.

Prosser R. A., Bergeron H. E. (2003) Leptin phase-advances the rat suprachiasmatic circadian clock in vitro. *Neurosci Lett* 336(3):139-42.

Reddy AB, Field MD, Maywood ES, Hastings MH. (2002) Differential resynchronization of circadian clock gene expression within the suprachiasmatic nuclei of mice subjected to experimental jet lag. *J Neurosci* 22:7326–7330.

Reid, K.J. & Abbott, S.M. (2015) Jet Lag and Shift Work Disorder. *Sleep Medicine Clinics*, 10:523-35.

Renaud, L.P., Tang, M., McCann, M.J., Stricker, E.M. & Verbalis, J.G. (1987) Cholecystokinin and gastric distension activate oxytocinergic cells in rat hypothalamus. *Am. J. Physiol.*, 253: R6661-5.

Reppert, S.M., Weaver, D.R. (2001) Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu. Rev. Physiol.*, 63:647-76.

Rockwell, D.A. (1975) The "Jet Lag" syndrome. *West. J. Med.*, 122:419.

Romijn HJ, Sluiter AA, Pool CW, Wortel J, Buijs RM. (1996) Differences in colocalization between Fos and PHI, GRP, VIP and VP in neurons of the rat suprachiasmatic nucleus after a light stimulus during the phase delay versus the phase advance period of the night. *J Comp Neurol* 372(1):1-8.

Ruiter M, La Fleur S. E, van Heijningen C, van der Vliet J, Kalsbeek A, Buijs R. M. (2003) The daily rhythm in plasma glucagon concentrations in the rat is modulated by the biological clock and by feeding behavior. *Diabetes* 52(7):1709-15.

Rusak, B., Robertson, H.A., Wisden, W. & Hunt, S.P. (1990) Light pulses that shift rhythms induces gene expression in the suprachiasmatic nucleus *Science*, 248:1237-1240.

Saito M, Murakami E, Suda M (1976) Circadian rhythms in disaccharidases of rat small intestine and its relation to food intake, *Biochim. Biophys. Acta* 421:177-179.

Saderi, N., Cazarez-Márquez, F., Buijs, F.N., Salgado-Delgado, R.C., Guzman-Ruiz, M.A., Basualdo, M.C., Escobar, C. & Buijs, R.M. (2013) The NPY intergeniculate leaflet projections to the suprachiasmatic nucleus transmit metabolic conditions. *Neuroscience*, 29:246-291.

Salgado-Delgado R, Angeles-Castellanos M, Saderi N, Buijs RM, Escobar C.(2010). Food intake during the normal activity phase prevents obesity and circadian desynchrony in a rat model of night work. *Endocrinology*. 151(3):1019-1029.

Stephan FK. (2002) The «other» circadian system: food as a Zeitgeber. *J Biol Rhythms*. 17(4):284-92.

Stephan, F.K. (2001) Food-entrainable oscillators in mammals. In: *Circadian Clocks*, edited by Takahashi JS, Turek FW, and Moore RY. *New York: Kluwer Academic/Plenum*, 223–246.

Stephan FK, and Zucker I. (1972) Circadian rhythms in drinking and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc. Natl, Acad. Sci. USA*. 69:1583-1586.

Schwartz WJ, Davidsen LC, Smith CB. (1980) In vivo metabolic activity of a putative circadian oscillator, the rat suprachiasmatic nucleus. *J Comp Neurol* 189(1):157-67.

Scott V, McDade M. M., Luckman S. M. (2007) Rapid changes in the sensitivity of arcuate nucleus neurons to central ghrelin in relation to feeding status. *Physiol Behav* 90(1):180-5.

Stokkan KA, Yamazaki S, Tei H, Sakaki Y, Menaker M. (2001) Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science*. 2001 Jan 19;291(5503):490-3.

Straif K, Baan R, Grosse Y, et al, on behalf of the WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. Carcinogenicity of shiftwork, painting, and fire-fighting. *Lancet Oncol* 2007;8:1065-6.

Sumova, A., Travinickova, Z., Mikkelsen, J.D. & Illnerova, H. (1998) Spontaneous rhythm in c-Fos immunoreactivity in the dorsomedial part of the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.*, 801:254–258.

Ueta, Y., Kannan, H., Higuchi, T., Negoro, H., Yamaguchi K. & Yamashita H. (2000) Activation of gastric afferents increases noradrenaline release in the paraventricular nucleus and plasma oxytocin level. *J. Auton. Nerv. Syst.*, 78:69–76.

Van Reeth, O., Sturis, J., Byrne, M.M., Blackman, J.D., L'Hermite- Baleriaux, M., Leproult, R., Oliner, C., Refetoff, S., Turek, F.W., & Van Cauter, E. (1994) Nocturnal exercise phase delays circadian rhythms of melatonin and thyrotropin secretion in normal men. *Am. J. Physiol.*, 266: E964-E974.

Vansteensel MJ, Yamazaki S, Albus H, Deboer T, Block GD, Meijer JH. (2003) Dissociation between circadian *Per1* and neuronal and behavioral rhythms following a shifted environmental cycle. *Curr Biol* 13(17):1538-42.

Verbalis, J.G., Stricker, E.M., Robinson, A.G., Hoffman, G.E. (1991) Cholecystokinin activates c-Fos expression in hypothalamic oxytocin and corticotropin-releasing hormone neurons. *J. Neuroendocrinol.*, 3:205-13.

Verwey, M., Khoja, Z., Stewart, J. & Amir, S. (2007) Differential regulation of the expression of *Period2* protein in the limbic forebrain and dorsomedial hypothalamus by daily limited access to highly palatable food in food-deprived and free-fed rats. *Neuroscience*, 147:277–285.

Waterhouse J, Atkinson G, Reilly T (1997) Jet lag. *Lancet*, 350:1611–16.

Waterhouse J, Jones K, Edwards B, Harrison Y, Nevill A, Reilly T (2004) Lack of evidence for a marked endogenous component determining food intake in humans during forced desynchronization. *Chronobiol Int* 21:443–66.

Waterhouse, J., Reilly, T., Atkinson, G. & Edwards, B. (2007) Jet lag: trends and coping strategies. *Lancet*, 369:1117-1129.

Waterson, M.J. & Horvath, T.L. (2015) Neuronal regulation of energy homeostasis: Beyond the hypothalamus and feeding. *Cell Metabolism*, 22:962-970.

Webb, I.C., Antle, M.C. & Mistlberger, R.E. (2014) Regulation of circadian rhythms in mammals by behavioral arousal. *Behav. Neurosci.*, 128:304-325.

Wickland, C. & Turek, F.W. (1994) Lesions of the thalamic intergeniculate leaflet block activity-induced phase shifts in the circadian activity rhythm of the golden hamster. *Brain Res.*, 660:293–300.

Williams, G., Bing, C., Cai, X.J., Harrold, J.A., King, P.J. & Liu, X.H. (2001) The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. *Physiol. Behav.*, 74:683-701.

Yamaguchi, Y., Suzuki, T., Mizoro, Y., Kori, H., Okada, K., Chen, Y., Fustin, J.M., Yamazaki, F., Mizuguchi, N., Zhang, J., Dong, X., Tsujimoto, G., Okuno, Y., Doi, M. & Okamura, H. (2013) Mice genetically deficient in vasopressin V1a and V1b receptors are resistant to jet lag. *Science*, 4:85-90.

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

Yan L, Okamura H. (2002) Gradients in the circadian expression of Per1 and Per2 genes in the rat suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci* 15(7):1153-62.

Yan L, Silver R. (2004) Resetting the brain clock: time course and localization of mPER1 and mPER2 protein expression in suprachiasmatic nuclei during phase shifts. *Eur J Neurosci* 19(4):1105-9.

Yannielli, P.C., Molyneux, P.C., Harrington, M.E., Golombek, D.A. (2007) Ghrelin effects on the circadian system of mice. *J. Neurosci.* 27:2890–2895.

Yi, C.X., van der Vliet, J., Dai, J., Yin, G., Ru, L. & Buijs, R.M. (2006) Ventromedial arcuate nucleus communicates peripheral metabolic information to the suprachiasmatic nucleus. *Endocrinology*, 147:283-94.

Zelinski E.L., Deibel S.H., McDonald R.J. (2014) The trouble with circadian clock dysfunction: multiple deleterious effects on the brain and body *Neurosci Biobehav Rev*, 40:80–101.

Zylka MJ, Shearman LP, Weaver DR, Reppert SM. (1998) Three period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron* 20(6):1103-10.