

11781



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

MECANISMOS CENTRALES PARA EL OSCILADOR SINCRONIZADO POR ALIMENTO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

JORGE IGNACIO MENDOZA CAMACHO

TUTOR:

DRA. CAROLINA ESCOBAR BRIONES



MÉXICO, D. F.

2004



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.

A mi Familia

A mi Padre "Todo se lo debo a mi manager": por siempre, gracias por tu cariño, tus consejos, tus enseñanzas, tu apoyo, por que el verdadero título de Doctor (de la vida) te corresponde a ti, pero sobre todo, gracias por haber existido para ser mi Padre. Te quiero mucho.

A mi Madre: por toda esa fuerza y valentía que siempre te ha caracterizado y que te ha ayudado a darme todo tu cariño, por ser quien todos los días sin importar que suceda a tu alrededor saca adelante a la familia, porque sin tu apoyo nunca hubiera podido llegar hasta donde estoy, todo eso te lo debo a ti. Este trabajo es simplemente una pequeña manera de agradecerte y demostrarte mi cariño y admiración. Gracias por siempre Sra. Laura. Te quiero mucho.

A mis muy queridas hermanas: Laura (Gorda), Rosalía (muñeca), Fernandita (chaparrita), Fany (flaquita), por que nunca podría hablar de *mi* familia sin mencionarlas a ustedes, por todas esas risas, regaños, peleas, por ser parte importante en mi vida para ser feliz.

A mis sobrinas: Pamela y "Frijolina", por ser el fabuloso complemento de la familia Mendoza, por llegar y estar en el justo momento, por sus risas y sus llantos.

A mis brothers: Alex, Edgar, Carlos, Manuel, Alaford y sus respectivas señoras (que también son mis "sisternas"). Carnales no se que haría sin ustedes, gracias por su amistad "from here to eternity....". y todas esas experiencias que hemos vivido juntos y que nos han ayudado a tener cada día más ganas y necesidad de seguir siendo carnales.

A Francesca: porque podría morir en este instante hasta por el simple hecho de no escuchar tu nombre, podría vivir toda una eternidad si tu estas a mi lado, podría deshacerme en pedazos para que tu puedas reconstruirme con un beso, podría matar a la misma muerte si ella trata de alejarme de ti, podría retar a Dios para ver tu sonrisa como un reflejo en el cielo, pero lo que no podría es dejar de estar en ti.

AGRADECIMIENTOS

A mi Maestra la **Dra. Carolina Escobar**, por iniciarme en este maravilloso mundo de las neurociencias, por su amistad, su confianza, sus ganas de seguir siempre adelante (a pesar de todos los obstáculos), por todo su apoyo entusiasta e incondicional para la realización de este trabajo y todos los demás, “...y los que nos faltan todavía”, pero sobre todo por los consejos académicos y personales que me han ayudado a crecer como persona.

Al **Dr. Raúl Aguilar-Roblero**: por todo su apoyo y confianza desde la licenciatura hasta el doctorado, por sus comentarios, por sus críticas, que siempre aportan grandes ideas, pero sobre todo por sus enseñanzas de este excitante campo de los relojes biológicos. Muchas gracias Doctor.

A mi comité tutorial: por que siempre aportaron excelentes comentarios y sugerencias.

Dra. Carolina Escobar
Dra. María Luisa Fanjul
Dr. Roberto Prado-Alcalá

Al jurado del examen de grado: por su tiempo para revisar este trabajo objetivamente y por todos sus excelentes comentarios y sugerencias que enriquecieron y me ayudaron a mejorarlo.

Dra. Rosalinda Guevara Guzmán
Dra. Carolina Escobar Briones
Dra. María Corsi Cabrera
Dra. Robyn Elizabeth Hudson
Dr. Raúl Aguilar-Roblero
Dr. Miguel Pérez de la Mora
Dr. Oscar Prospéro García

A mis compañeros de laboratorio, Manuel (San Martín), Mary Carmen, Teresita, Tere Martínez, por ese entusiasmo que contagia para hacer investigación (ojalá nunca cambie), por aguantar mi arrogancia y mis críticas y disgustos durante los seminarios y por compartir sus ideas y aceptar las mías. Por supuesto también a los nuevos integrantes y futuras estrellas del laboratorio de Ritmos Biológicos y Metabolismo, Hans, Katia, Gabriela y quien quiera integrarse a este gran equipo de trabajo. ¡Bienvenidos! . A todos ustedes “*gracias, muchas gracias por haberme aguantado tanto tiempo, desde 1998 hasta el 2004.....*”

Je vous remercie **Dr. Paul Pévet, Dr. Mireille Masson Pévet et Dr Etienne Challet** pour me donner confiance, et pour m'avoir permis de réaliser cette expérience dans le laboratoire de Neurobiologie des Rythmes à Strasbourg. Merci aussi à tout des étudiants pour les bons moments partagés ensemble au labo et à la Giraffe et Rock city: Jérôme, Hugues, Florent, Benjamín, Ione, Natalia, Daniel, Zeina, Céline, Annika, David, Rosie, Laurent, Stéphanie, Caroline.

A mis camaradas y compañeros de carrera en la Facultad de Psicología: Adriana, Ayleen, Cristina, Diana H, Diana O, Fusae, Ranier, Tania, por su amistad y por fomentar, como siempre, el gusto por hacer de la Psicología una verdadera ciencia.

Esta tesis se realizó gracias al apoyo a los proyectos: CONACyT: N33033, M43950 y DGAPA IN 203803, IX227504. Y con el apoyo de las becas obtenidas del programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas: CONACyT y DGEP.

RESUMEN

Los horarios restringidos de alimento (HRA) generan conducta de anticipación y sincronizan ritmos fisiológicos aún en animales con lesiones del núcleo supraquiasmático (NSQ), sugiriendo la existencia de un oscilador sincronizado por alimento (OSA). Sin embargo, en animales intactos, cuando el alimento se presenta en proporciones insuficientes en cantidad y calidad, éste puede ser un potente sincronizador para el NSQ, lo que sugiere que durante la sincronización por alimento están implicados mecanismos metabólicos y motivacionales. Para explorar el papel de los mecanismos motivacionales en la sincronización por alimento este estudio fue dividido en 3 fases experimentales.

Debido a la relevancia del núcleo accumbens como una estructura importante para la expresión de conductas motivadas de acuerdo a sus divisiones ventromedial (Acc-shell) y dorsolateral (Acc-Core), en el primer experimento exploramos su papel en la sincronización por alimento. Utilizamos la técnica inmunohistoquímica para la proteína c-Fos como un marcador de activación neuronal y evaluamos el efecto diferencial de lesiones excitotóxicas con NMDA en Acc-Shell y Acc-Core sobre la sincronización conductual y fisiológica a HRA. Los resultados muestran que en Acc-Shell hay un incremento de la inmunoreactividad de c-Fos por la sincronización, principalmente durante la ingestión, mientras que la expresión de c-Fos en Acc-Core incrementó durante la ingestión y también anticipando la hora de llegada del alimento. Todas las ratas exhibieron actividad de anticipación al alimento (AA), sin embargo, la AA incrementó en los animales con lesiones en Acc-Shell y fue casi ausente en los animales con lesiones en Acc-Core, indicando un papel diferencial entre ambas regiones en la expresión de la AA. Las concentraciones de ácidos grasos libres (AGL) se sincronizaron en ambos grupos lesionados, pero el nivel basal fue más bajo en las ratas con lesiones en Acc-Core.

Para explorar si la motivación generada por el alimento es suficiente para sincronizar al OSA, en el segundo experimento evaluamos en ratas, mantenidas *ad libitum*, si el acceso fijo diario a un alimento apetitoso sincroniza la actividad locomotora y las concentraciones de glucosa y AGL en plasma. La respuesta de las ratas sincronizadas a un alimento apetitoso (SAA) fue comparada con la de ratas sincronizadas a HRA. Además, utilizamos inmunohistoquímica para la proteína c-Fos para identificar estructuras en el sistema nervioso central involucradas con esta sincronización. Las ratas mostraron AA al acceso diario al alimento apetitoso, aunque con menor intensidad que las ratas sincronizadas a HRA, mientras que la glucosa y AGL no se sincronizaron. La AA persistió al menos por 4 ciclos después de interrumpir la SAA, sugiriendo que esta persistencia depende de un oscilador circadiano. La expresión de c-Fos en núcleos del sistema límbico se presentó anticipando y respondiendo al tiempo del acceso al alimento, sugiriendo que estas estructuras pueden estar involucradas con la expresión de la AA y la sincronización a un alimento apetitoso.

Un tercer experimento fue diseñado para evaluar si la motivación dada por el alimento es suficiente para sincronizar al NSQ en ausencia de un ciclo luz-oscuridad. Evaluamos si la SAA, sin una privación de alimento regular, sincroniza la actividad locomotora, la expresión de las proteínas c-Fos y PER-1 en el NSQ, el ritmo circadiano de glucosa y las concentraciones de AGL. Animales en oscuridad constante fueron SAA iniciando a la mitad del día subjetivo. Cuando el final de la actividad locomotora ajustó su fase al momento de acceso al alimento, el ritmo de actividad locomotora en libre corrimiento se sincronizó a la hora del alimento apetitoso. Las concentraciones de glucosa mostraron sincronización y un incremento de sus concentraciones por la ingestión del alimento. En el NSQ la expresión máxima de c-Fos fue en ZT-0, ajustada al momento de acceso al alimento, y PER-1 mostró su máxima expresión en ZT-8, en concordancia con el ciclo de actividad. Además, la expresión de c-Fos y PER-1 en el núcleo paraventricular del tálamo (PVT), una de las principales entradas hacia el NSQ, también mostró sincronización al alimento apetitoso.

En conclusión, estos datos indican que los mecanismos motivacionales que subyacen a la ingestión de alimento son relevantes para la sincronización por alimento y que (1) el núcleo accumbens es importante para la sincronización conductual y metabólica por alimento. Las dos regiones del núcleo muestran un papel diferencial durante la sincronización. Además, (2) para la sincronización por alimento, no es necesaria la privación de alimento (un estado catabólico), un incremento en el estado motivacional, por las propiedades reforzantes del alimento, es suficiente para sincronizar la AA, y estructuras del sistema límbico están involucradas con esta sincronización. Finalmente, (3) el NSQ puede ser sincronizado por un alimento apetitoso bajo condiciones *ad libitum*. Las propiedades reforzantes del alimento, que producen un incremento en el estado motivacional, ejercen influencia en la sensibilidad del NSQ para responder a señales de sincronización por alimento, donde el PVT puede ser una de las principales vías para sincronizar al NSQ a un alimento apetitoso.

ABSTRACT

Restricted feeding schedules (RFS) produces food-anticipatory activity (AA) and entrainment of physiological rhythms even in suprachiasmatic nucleus (SCN) ablated animals, suggesting the existence of a food-entrained oscillator (FEO). However, in intact animals, when food is supplied in insufficient properties in quantity and quality, it can become a potent *zeitgeber* for the SCN, suggesting that for food entrainment, metabolic and motivational mechanisms are implicated. To explore the role of motivational mechanisms in food entrainment, this study was divided in 3 experimental phases.

Due to the relevance of the nucleus accumbens as an important structure for the expression of motivational behaviors and in accordance with its anatomical divisions, ventromedial (Acc-Shell) and dorsolateral (Acc-Core), in the first experiment we explored its role in food-entrainment. We used the immunohistochemical technique to the protein c-Fos as a transcriptional activation marker and we tested the differential effect of Acc-Shell and Acc-Core NMDA excitotoxic lesions on behavioral and physiological entrainment to RFS. Data show that in the Acc-Shell there is an increase of c-Fos immunoreactivity in food-entrained rats mainly during feeding, whereas c-Fos expression in the Acc-Core region was increased during feeding and also anticipating mealtime. All rats exhibited food-anticipatory activity (AA), however, AA was increased in Shell-lesioned animals and was almost abolished in the Core-lesion rats, indicating a differential role between the two subregions on the expression of AA. Free fatty acids (FFA) were entrained in both lesioned groups, but the basal level was lower in Core-lesion rats.

To explore if the food-driven motivation is sufficient to entrain the FEO, in the second experiment, we evaluated in rats maintained *ad libitum* whether daily fixed access to a highly palatable-meal (PME), entrains locomotor activity, serum glucose and FFA concentrations. The entrained response of PME rats was compared with rats entrained to RFS. In addition, we used c-Fos-IR to identify structures in the central nervous system involved in this entrainment. Rats showed AA to a daily palatable meal, although with a lesser intensity than rats entrained to RFS, whereas glucose and FFA were not entrained. AA persisted at least for 4 cycles after interrupting PME, suggesting that this persistence depends on a circadian oscillator. c-Fos expression in limbic system nuclei was in phase with AA and meal time, suggesting that these structures may be involved with the expression of AA and the palatable meal entrainment.

A third experiment was designed to evaluate whether the food-driven motivation is sufficient to entrain the SCN in absent of a light-dark cycle. Here we evaluate whether PME, without normal food deprivation, entrains locomotor activity, c-Fos and PER-1 protein expression in the SCN, circadian rhythm of glucose and FFA concentrations. Animals in constant darkness were entrained with a palatable meal daily starting at the middle of subjective day. When the offset of locomotor activity adjusted its phase to the palatable meal time, the free running rhythm of locomotor activity was entrained to the palatable meal access. Glucose concentrations showed entrainment and an increase in its concentrations by the palatable meal intake. In the SCN c-Fos expression peaked at ZT-0 adjusted to palatable meal time and PER-1 showed its maximal expression at ZT-8, in accordance with the activity cycle. In addition, c-Fos and PER-1 expression in the paraventricular thalamic nucleus (PVT), one main inputs to the SCN, also showed entrainment to palatable-meal time.

In conclusion, these data indicate that motivational mechanisms are relevant for food entrainment and that (1) the nucleus accumbens is involved in behavioral and metabolic food-entrainment. The two subregions showed a differential role during entrainment. In addition, (2) for food entrainment, food deprivation is not necessary (a catabolic state), an increase in motivational state by the reward properties of food is sufficient to entrain behavior, and structures in the limbic system may be involved in palatable meal entrainment. Finally, (3) the SCN can be entrained by a palatable food in *ad libitum* conditions. The reward properties of food, that produce an increase in motivational state, exert an intense influence on the sensitivity of the SCN to food-entraining signals, where the PVT can be one of the main pathways to entrain the SCN to a palatable meal.

Abreviaturas

5-HT : serotonina	<i>npas/NPAS</i> : gene/proteína “neuronal PAS domain protein”
AA : actividad de anticipación	NPB : núcleo parabraquial
Acc-Core : núcleo accumbens core	NPY : neuropéptido Y
Acc-Shell : núcleo accumbens shell	NRD : núcleo dorsal del rafe
AGL : ácidos grasos libres	NRM : núcleo medial del rafe
AL : <i>ad libitum</i>	NSQ : núcleo supraquiasmático
AL-A : <i>ad libitum</i> -ayuno	NTS : núcleo del tracto solitario
AMPc : adenosine monofosfato cíclico	QO : quíasma óptico
AP : área postrema	OSA : oscilador sincronizado por alimento
ARQ : núcleo arqueado del hipotálamo	<i>per/PER</i> : gene/proteína “periodo”
<i>bmal1/BMAL1</i> : gene/proteína “brain and muscle ARNT-like protein 1”	PVN : núcleo paraventricular del hipotálamo
BLA : núcleo basolateral de la amígdala	PVT : núcleo paraventricular talámico
BNST : núcleo del lecho de la estria terminalis	REDOX : estado óxido-reducción celular
CCG : gene controlado por reloj	RHT : trato retinohipotalámico
CeA : núcleo central de la amígdala	SAA : sincronización a un alimento apetitoso
<i>clock/CLOCK</i> : gene/proteína “circadian locomotor output cycles kaput”	SAA-A : sincronización a un alimento apetitoso- <i>ad libitum</i>
<i>cry/CRY</i> : gene/proteína “cryptochrome”	<i>Tau</i> (τ) : periodo endógeno
CT : tiempo circadiano	VA : vasopresina
DMH : núcleo dorsomedial del hipotálamo	VIP : péptido vasoactivo intestinal
GABA : ácido γ -aminobutírico	VMH : núcleo ventromedial del hipotálamo
GLU : glutamato	VTA : área tegmental ventral
HIL : hojuela intergeniculada lateral del tálamo	ZT : tiempo del <i>zeitgeber</i> (sincronizador)
HRA : horarios restringidos de alimento	
HRA-A : horarios restringidos de alimento-ayuno	
LO : ciclo luz-oscuridad	
LV : ventrículo lateral	
NMDA : N-methyl-D-aspartato	

RESUMEN

ABSTRACT

ABREVIATURAS

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Ritmos circadianos	1
1.2 El núcleo supraquiasmático: reloj circadiano maestro	2
1.2.1 Características anatómicas del NSQ	3
1.2.2 Mecanismos moleculares del NSQ	4
1.2.3 Sincronización luminosa y no luminosa del NSQ	5
1.2.4 Sincronización por alimento del NSQ	7
1.3 Los osciladores periféricos	9
1.3.1 Mecanismos moleculares presentes en los osciladores periféricos	10
1.3.2 Sincronización de los osciladores periféricos	10
1.4 El oscilador sincronizado por alimento (OSA)	11
1.4.1 La actividad de anticipación al alimento: un primer reporte	11
1.4.2 La sincronización por alimento de parámetros fisiológicos y metabólicos	12
1.5 Estructuras centrales determinantes en el control del balance energético y la sincronización por alimento	12
1.6 Estructuras y mecanismos centrales determinantes en los procesos de motivación y reforzamiento de la ingestión de alimento	14
1.7 Sincronización por alimento, reforzamiento y motivación	16
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
3. HIPÓTESIS	18
3.1 Hipótesis generales	18
4. OBJETIVOS	18
4.1 Objetivos generales	18

5. MATERIALES Y MÉTODO	19
5.1 Animales y condiciones generales	19
5.2 Registro conductual	19
5.3 Inmunohistoquímica	19
5.4 Cuantificación celular	20
5.5 Cirugía y lesiones	21
5.6 Determinación de las concentraciones de las variables metabólicas	21
5.7 Análisis estadísticos	22
6. EXPERIMENTO 1	23
6.1 Participación del núcleo accumbens en la sincronización por alimento	23
6.1.1 Hipótesis específicas	23
6.1.2 Objetivos específicos	23
6.2 Diseño experimental	23
6.2.1 Expresión de la proteína c-Fos	23
6.2.2 Lesiones químicas Acc-Shell o Acc-Core	24
6.3 Resultados	24
6.3.1 Expresión de la proteína c-Fos en el núcleo accumbens de animales sincronizados a HRA	24
6.3.2 Efecto de la lesión de Acc-Shell vs Acc-Core en la sincronización	26
6.4 Discusión	30
6.4.1 Diferenciación funcional del núcleo accumbens durante la sincronización por alimento	30
7. EXPERIMENTO 2	33
7.1 Sincronización con un alimento apetitoso sin restricción de alimento	33
7.1.1 Hipótesis específicas	33
7.1.2 Objetivos específicos	33
7.2 Diseño experimental	34
7.2.1 Registro conductual	34
7.2.2 Análisis inmunohistoquímico y metabólico	34
7.3 Resultados	35
7.3.1 Sincronización de la actividad locomotora a un alimento apetitoso	35

7.3.2	Sincronización metabólica a un alimento apetitoso	36
7.3.3	Expresión de c-Fos durante la sincronización a HRA o a un alimento apetitoso	37
7.4	Discusión	41
7.4.1	Sincronización de la AA	41
7.4.2	Sincronización de la glucosa y AGL	41
7.4.3	Sincronización de la expresión de c-Fos en el hipotálamo y el sistema límbico	42
8.	EXPERIMENTO 3	44
8.1	Sincronización del NSQ por un alimento apetitoso sin restricción de alimento	44
8.1.1	Hipótesis específicas	44
8.1.2	Objetivos específicos	44
8.2	Diseño experimental	44
8.2.1	Sincronización conductual	44
8.2.2	Sincronización metabólica y de la expresión de c-Fos y PER-1	45
8.3	Resultados	45
8.3.1	Sincronización de la actividad locomotora en oscuridad constante aun alimento apetitoso vs un horario restringido de alimento	45
8.3.2	Sincronización metabólica	48
8.3.3	Expresión de c-Fos y PER-1 en el NSQ	49
8.3.4	Expresión de c-Fos y PER-1 en el PVT y la HIL	50
8.4	Discusión	52
8.4.1	Un alimento apetitoso sincroniza al NSQ	52
8.4.2	Sincronización conductual	52
8.4.3	Sincronización metabólica	53
8.4.4	Sincronización de los patrones de actividad de c-Fos y PER-1	54
9.	DISCUSIÓN GENERAL	59
10.	CONCLUSIONES	61
11.	REFERENCIAS	62
12.	ANEXOS	74

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Ritmos circadianos

Una de las propiedades inherentes a la vida es la presencia de ritmicidad. La existencia de patrones rítmicos en las expresiones conductuales y fisiológicas de todos los organismos es una característica esencial, ya que les confiere temporalidad interna que los capacita para anticiparse y prepararse a demandas y cambios ambientales relevantes para su supervivencia. A pesar de que existen una serie de fluctuaciones ambientales con diferentes periodicidades, es evidente que los cambios geofísicos que suceden cada 24 horas, por la alternancia de día-noche debido a la rotación de la Tierra, tienen gran influencia sobre los procesos biológicos (Moore-Ede y col. 1982).

Los ritmos circadianos tanto conductuales como fisiológicos, que aunque son influenciados por el ambiente, se manifiestan de manera endógena gracias a la existencia de sistemas internos de medición temporal o relojes biológicos. Estos tienen la característica fundamental de generar oscilaciones cercanas (pero no iguales) a 24 horas (circa=cercano; diano=día). La expresión de tales ritmos continúa aún cuando los organismos son temporalmente aislados de información periódica del medio, fenómeno conocido como oscilación espontánea, que es una clara evidencia de un proceso autónomo de medición de tiempo circadiano. En humanos, un ritmo circadiano es el ciclo sueño-vigilia, junto con el cual se ven acompañados una serie de cambios fisiológicos también con características circadianas (Figura 1) como por ejemplo oscilaciones en la temperatura corporal, la cual disminuye durante la noche junto con un incremento en la liberación de la hormona melatonina (lo cual promueve el sueño), la liberación de hormona luteinizante, los niveles de cortisol plasmático, de leptina, de insulina y de glucosa por mencionar algunos (La Fleur y col. 1999; Buijs y col. 2001; Buijs y Kalsbeek, 2001; Kalsbeek y col. 2001; Perreau-Lenz y col. 2004).

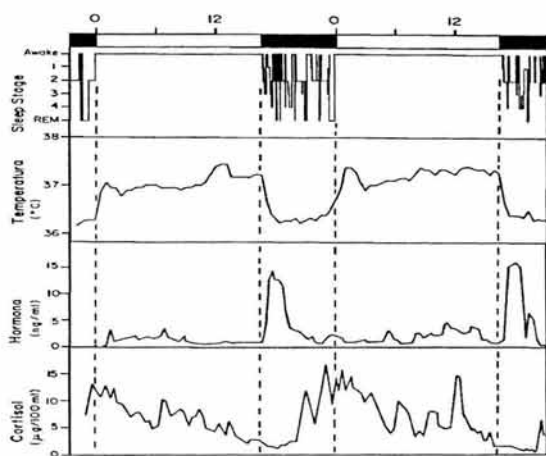


Figura 1. Variación circadiana en algunos parámetros fisiológicos en humanos bajo un ciclo luz-oscuridad representado por las barras blancas y oscuras superiores respectivamente. De arriba hacia abajo, ciclo sueño-vigilia, temperatura corporal, secreción de hormona de crecimiento y niveles de cortisol plasmático (Tomada de Moore-Ede y col. 1982)

En los mamíferos, incluido el hombre, hasta la fecha se ha podido identificar que una serie de estructuras en el sistema nervioso central (SNC) así como órganos de la periferia tienen la capacidad de ser osciladores circadianos, por lo que se ha propuesto que el sistema circadiano se conforma por diversos osciladores tanto a nivel central como periférico y que se encuentra organizado de una manera jerárquica, en donde un reloj central mantiene el control de todos los demás osciladores circadianos con el fin de proveer un control rítmico de todas las funciones del organismo (Reppert y Weaver, 2002). El control rítmico de todos estos osciladores depende del reloj circadiano central: el núcleo supraquiasmático (Figura 2). A pesar de que otras estructuras centrales han mostrado ser osciladores circadianos, el término de osciladores periféricos también se les ha adjudicado por estar fuera del núcleo supraquiasmático (Balsalobre, 2002).

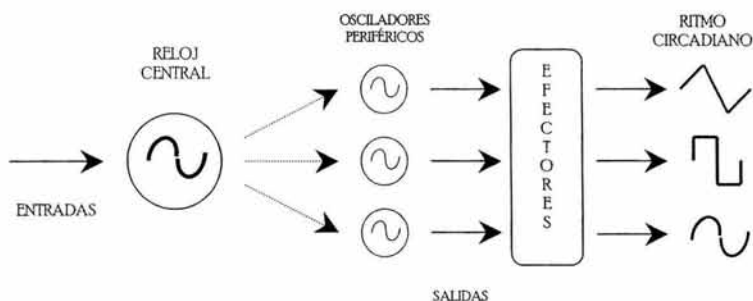


Figura 2. Un sistema circadiano en mamíferos en el que un reloj central, capaz de generar un tiempo circadiano autónomo en su actividad y recibir información ambiental de tiempo, promueve y mantiene la ritmicidad circadiana sobre una serie de osciladores periféricos para la expresión de los ritmos tanto conductuales como fisiológicos del organismo.

1.2 El núcleo supraquiasmático: reloj circadiano maestro

A pesar de que a principios del siglo 20 Cajal había demostrado la existencia de un tracto nervioso que conectaba a la retina con el hipotálamo, a nivel funcional no se había explicado la existencia de dicho tracto. Fue hasta el año de 1972 cuando dos grupos independientes demostraron la relación de tal sitio en el hipotálamo para la expresión de ritmos circadianos hormonales y conductuales. Las lesiones de esta zona anterior del hipotálamo denominado núcleo supraquiasmático (NSQ), y que se conectaba con la retina, eliminaban tanto el ritmo de corticosterona como el de la ingestión de agua en ratas, lo cual lo hacían una estructura determinante en la expresión de los ritmos circadianos (Moore y Eichler, 1972; Stephan y Zucker, 1972).

El NSQ, considerado como el principal reloj circadiano, se encuentra en el hipotálamo anterior justo por arriba del quiasma óptico. Cada núcleo se compone de aproximadamente 15,000 neuronas de las cuales, cada una es capaz de generar y mantener oscilaciones circadianas autosostenidas en su actividad eléctrica (Welsh y col. 1995), en la captura de glucosa (Schwartz y col. 1987) y en la expresión de genes (Yamaguchi y col. 2003), características que las define como células reloj.

1.2.1 Características anatómicas del NSQ

El NSQ se ha subdividido en dos regiones anatómicas, una dorsalmedial (shell), caracterizada por la secreción de vasopresina (VP), y una región ventrolateral (core) caracterizada por la expresión de péptido vasoactivo intestinal (VIP). Además de la secreción de estos péptidos, las células del NSQ también utilizan como neurotransmisor el ácido γ -amino butírico (GABA). Ambas divisiones del núcleo proyectan hacia una serie de estructuras dentro y fuera del hipotálamo para el control circadiano de diversas funciones en el organismo. A través del núcleo paraventricular hipotalámico (PVN) controla la ritmicidad circádica de la actividad del eje adrenocorticotrópico, así como el control del ritmo de la hormona melatonina en la glándula pineal y de ciertas funciones viscerales a través de ganglios autonómicos (Buijs y Kalsbeek, 2001). Por otro lado, a través del núcleo dorsomedial hipotalámico (DMH) mantiene el control circadiano del ciclo sueño vigilia por su acción en el sistema orexigénico en el hipotálamo lateral (Abrahamson y col. 2001; Chou y col. 2003). Sin embargo, una de las eferencias de mayor densidad es hacia la zona subparaventricular, así mismo hacia el área preóptica y el núcleo ventromedial (VMH) en el hipotálamo. Otras eferencias del NSQ hacia estructuras fuera del hipotálamo proyectan hacia núcleos como el paraventricular talámico (PVT) así como hacia el septum y el núcleo del lecho de la estría terminalis (BNST), sitios neuronales que son determinantes en el control circadiano principalmente del ciclo sueño-vigilia. (Figura 3; Moore y Leak, 2001).

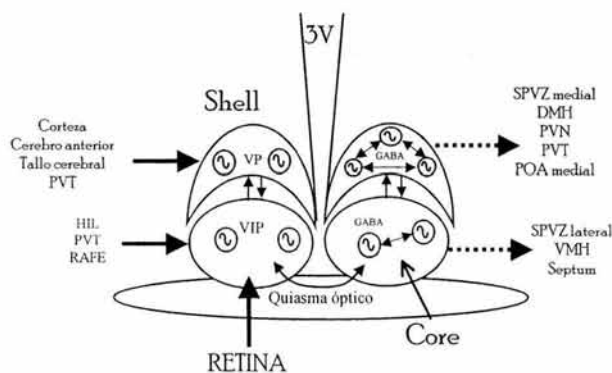


Figura 3. Representación esquemática de la organización anatómica del NSQ. Tanto la región dorsalmedial (shell) como la región ventrolateral (core) contienen un gran número de osciladores circadianos que son acoplados entre ellos a través de un mecanismo gabaérgico. Sin embargo, una diferencia específica entre los grupos celulares de cada región, es la expresión de neuropéptidos. Mientras que en la región shell expresan vasopresina (VP) como principal neuropéptido, en la región core es el péptido vasoactivo intestinal (VIP). Una de las aferencias más importantes para el NSQ es la proveniente de la retina, mientras que una de sus mayores eferencias es hacia la zona subparaventricular (SPVZ). Sin embargo, otras aferencias y eferencias son determinantes para el funcionamiento del NSQ. DMH, núcleo dorsomedial hipotalámico; HIL, hojaleta intergeniculada lateral del tálamo; POA, área preóptica; PVN, núcleo paraventricular hipotalámico; PVT, núcleo paraventricular talámico; VMH, núcleo ventromedial hipotalámico; 3V, tercer ventrículo.

Así como el NSQ envía información a ciertas estructuras para la transmisión de un ritmo biológico, también recibe aferencias de otras mediante lo cual puede procesar información temporal que lo sincronicen. La aferencia mejor caracterizada es una proyección directa de la retina a través del tracto retinohipotalámico. El NSQ también recibe una aferencia indirecta de la retina a través de la hojuela intergeniculada lateral del tálamo (HIL) por el tracto geniculoculohipotalámico. También inervan al NSQ el núcleo del ráfide en el mesencéfalo, el PVT y ciertas regiones de la corteza, (Figura 3; Moore y Leak, 2001).

Por otro lado, dentro del mismo núcleo la sincronización o acoplamiento entre sus neuronas depende del GABA, lo que indica que a pesar de la capacidad intrínseca de cada célula para expresar ritmicidad circadiana, es necesario un acoplamiento entre cada una de sus células para mantener una estabilidad del reloj (Lui y Reppert, 2000).

1.2.2 Mecanismos moleculares del NSQ

Pero, ¿cómo puede cada célula del NSQ mantener oscilaciones de manera autónoma? La identificación de genes específicos dentro del núcleo ha dado esta respuesta. La maquinaria molecular del NSQ depende de asas de retroalimentación autosostenidas en los procesos de transcripción-transducción, que se basan en la expresión rítmica del RNA mensajero y su producto final la proteína, de una serie de genes reloj bien identificados (Reppert y Weaver, 2001). Tres genes periodo (*per1*, *per2* y *per3*) muestran oscilaciones de su RNA mensajero con un pico máximo de actividad durante el día (Figura 4). La transcripción de estos genes depende de la dimerización de dos factores de transcripción, llamados CLOCK y BMAL1, los cuales activan dicha transcripción por unirse a la región promotora de *per*. Esto conforma el asa positiva del mecanismo circadiano. Por otro lado, la dimerización de CLOCK y BMAL1 también promueve la transcripción de dos genes cryptocromo (*cry1* y *cry2*), los cuales al traducirse en su proteína, forman el asa negativa inhibiendo la transcripción rítmica de *per* y *cy* por su unión a CLOCK y BMAL1 (Figura 4; Reppert y Weaver, 2001). Sin embargo, aunque parece que *per* y *cy* son los genes determinantes en el mecanismo molecular de oscilación del NSQ, existe otra serie de genes que también participan en el establecimiento de oscilación del reloj (Reppert y Weaver, 2001; Hastings y col. 2003).

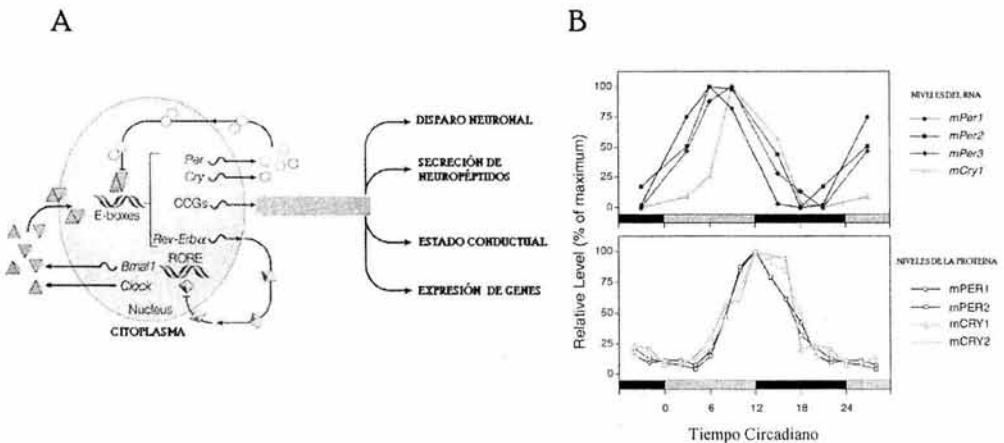


Figura 4. (A) Mecanismo molecular del NSQ, en el cual se involucran asas de retroalimentación positivas y negativas en la expresión de una serie de genes reloj para la manifestación rítmica de los procesos biológicos de un organismo. Los mecanismos de oscilación están mediados por la expresión de los genes *per* y *cry* a través de la dimerización de CLOCK Y BMAL1 y su adhesión en las E-box. Dicha dimerización es inhibida a su vez por las proteínas PER y CRY lo que cierra el proceso oscilatorio. Otros genes, como *Rev-Erba*, son determinantes en el sostenimiento de las oscilaciones, mientras que un tercer grupo de genes denominados dependientes de reloj (CCGs) se han asociado directamente con la expresión del ritmo circadiano (Hastings y col. 2003). (B) Expresión circadiana del RNA mensajero así como de su producto final la proteína de una serie de genes reloj en el núcleo supraquiasmático. El proceso de traducción entre el RNA y la proteína tarda aproximadamente 6 horas para los genes *per*, siendo el punto máximo de expresión del RNA a la hora circádica CT6 y para la proteína en CT12 (modificado de Reppert y Weaver, 2001).

1.2.3 Sincronización luminosa y no luminosa del NSQ

Otra de las características determinantes de los osciladores circadianos, a parte de la primordial que es presentar oscilaciones circadianas autosostenidas, es la de ser sincronizados por estímulos externos, lo cual permite al organismo estar en fase con las variaciones mediambientales a las cuales están expuestos. El NSQ se encuentra estratégicamente posicionado por arriba del quiasma óptico para recibir información luminosa del exterior a través de vías tanto directas como indirectas de la retina. Por tal motivo, el principal sincronizador (o señal ambiental) para el NSQ es el ciclo luz-oscuridad. La sincronización a la luz se lleva a cabo por un ajuste de la fase y periodo del reloj, y depende del momento del ciclo del día en el cual la luz es percibida por la retina.

La exposición a la luz durante la noche circadiana incrementa la tasa de disparo de las neuronas del NSQ, así como la expresión de genes reloj. A nivel conductual, la exposición a la luz genera un cambio de fase (un desplazamiento de una oscilación a lo largo del tiempo) en la actividad del animal, el cual puede ser un retraso (el animal inicia su actividad más tarde de lo esperado) o un adelanto (el inicio de la actividad es más tempranamente) dependiendo de si la luz se aplicó al inicio o al final de la noche circadiana respectivamente (Meijer, 2001; Daan y Aschoff, 2001).

Directamente, el NSQ recibe información nerviosa proveniente de las células ganglionares de la retina a través del tracto retino hipotalámico. La información luminosa estimula fotorreceptores de la retina los cuales liberan glutamato como principal neurotransmisor, éste a su vez activa receptores NMDA y no NMDA en el NSQ, lo cual lleva a una serie de eventos intracelulares (calcio/calmodilina, MAPquinasas) mediados por la liberación de calcio intracelular que llevan a la fosforilación de la proteína de adhesión a un elemento responsivo a AMP cíclico (cAMP), lo cual a su vez promueve la expresión nuclear de genes como *c-fos* y *per* a través de la adhesión a un elemento responsivo de cAMP localizado en los promotores de dichos genes (Figura 5).

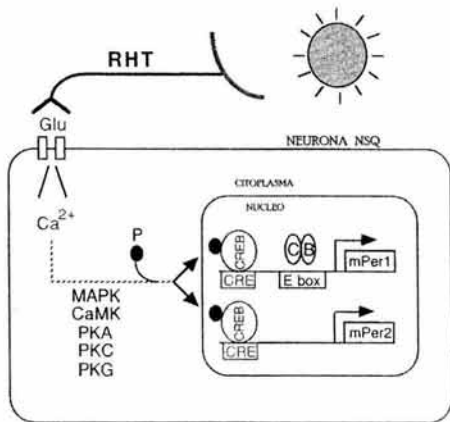


Figura 5. La estimulación luminosa activa células ganglionares de la retina las cuales a su vez liberan glutamato en la terminal sináptica del tracto retino hipotalámico (RHT) estimulando receptores de dicho neurotransmisor (NMDA) en las neuronas del NSQ. Esto promueve un incremento en las concentraciones de calcio intracelular (Ca^{2+}) y una activación de cascadas de ciertas moléculas (MAPK, CaMK, etc.) que posteriormente llevan a la expresión de genes como *per* (Modificada de Reppert y Weaver, 2001).

No solamente estímulos luminosos pueden tener un efecto sobre la sincronización del NSQ. Una serie de estímulos de carácter no luminoso han sido descritos como poderosos sincronizadores, entre ellos, principalmente la inducción de actividad locomotora, la administración de algunos fármacos, la privación de sueño y la exposición a intervalos de oscuridad, los cuales a diferencia de la luz tienen efectos opuestos en cuanto a la expresión de genes y los cambios de fase producidos (Hastings y col. 1992, 1998; Mead y col. 1992; Mrososvsky, 1995, 1996; Antle y Mistlberger, 2000; Mendoza y col. 2004)

A nivel conductual, los estímulos no luminosos, generan principalmente grandes avances de fase cuando se aplican durante el día circadiano, un tiempo en el cual el reloj no es sensible a la luz (Mrososvsky, 1995, 1996). Por otro lado, a nivel molecular existe una supresión de genes como *per*, en la hora en la cual los niveles de dicho gene son máximos, que como consecuencia trae el avance de fase del reloj (Maywood y col. 1999; Horikawa y col. 2000; Maywood y Mrososvsky, 2001).

Los mecanismos neuroanatómicos que subyacen a la sincronización no luminosa, no son del todo claros, sin embargo, existe gran evidencia de que son mediados por las proyecciones que llegan directamente al NSQ provenientes tanto de la HIL del tálamo, a través del tracto geniculohipotalámico utilizando como principal neurotransmisor el neuropéptido Y (NPY), como de los núcleos del rafe a través de una vía serotoninérgica y del PVT utilizando al glutamato como neurotransmisor (Figura 6; Meyer-Bernstein y Morin, 1996; Mrososvsky, 1996). Por ejemplo, la administración de serotonina o NPY in vivo generan cambios de fase y una supresión en la expresión de genes reloj similares por la exposición a ciertos estímulos no luminosos (Biello y col. 1994; Marchand y col. 1997; Horikawa y col. 2000; Maywood y col. 2002). Por otro lado, lesiones ya sea de la HIL o de las vías serotoninérgicas hacia el NSQ bloquean los cambios de fase por estímulos no luminosos (Biello y col. 1991; Wickland y Turek, 1994; Cutrera y col. 1994; Penev y col. 1995; Maywood y col. 1997).

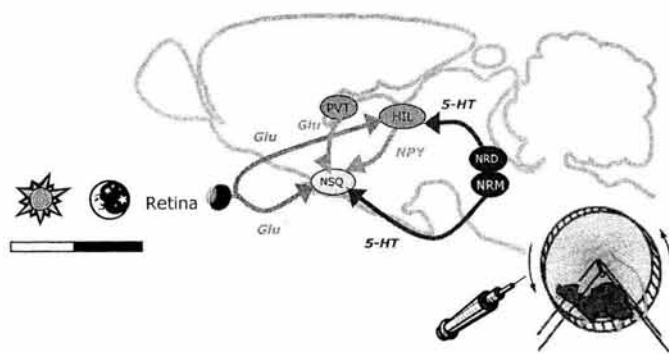


Figura 6. Corte sagital de un cerebro de rata en el cual se muestra la localización del NSQ, así como de sus aferencias por las que tanto estímulos luminosos y no luminosos pueden sincronizar al reloj. Glu, glutamato; HIL, hojaleta intergeniculada lateral; NPY, neuropéptido Y; NSQ, núcleo supraquiasmático; NRD, núcleo dorsal del rafe; NRM, núcleo medial del rafe; PVT, núcleo paraventricular talámico; 5-HT, serotonina.

1.2.4 Sincronización por alimento del NSQ

Además de la sincronización luminosa y no luminosa al NSQ, existe otro tipo de sincronización que por sus características debería de ser clasificada como no luminosa, sin embargo, los mecanismos tanto neuroanatómicos como fisiológicos y moleculares que subyacen a la sincronización no luminosa han mostrado no ser los mismos para la sincronización por alimento (Challet y col. 1998; Challet y col. 2000; Pitts y col. 2003). A pesar de que el alimento aparentemente no es un sincronizador potente para el NSQ, algunos experimentos han demostrado que bajo ciertas condiciones medioambientales y del propio alimento, el NSQ puede responder e incluso sincronizarse por el alimento (Challet y col. 2003).

En ratones expuestos a una oscuridad constante, la restricción de alimento no cambia la fase de expresión de genes reloj en el NSQ (Damiola y col. 2000; Hara y col. 2001; Wakamatsu y col. 2001). Sin embargo, cuando la restricción de alimento es con una dieta hipocalórica y en oscuridad constante, el alimento es un sincronizador potente, mostrando sincronización de los ritmos de actividad locomotora y de temperatura corporal (Challet y col. 1996a). Además, con la sincronización con una dieta hipocalórica en animales en oscuridad constante, la expresión de genes reloj en el NSQ muestra una relación de fase con el tiempo de acceso al alimento (Challet y col. 2003). Por otro lado, en ratas desnutridas, los cuales también se encuentran en una situación metabólica crítica, la restricción de alimento sincroniza el ritmo de ingestión de agua bajo condiciones de oscuridad constante (Salazar-Juárez y col. 2003).

Con estos datos se ha demostrado que la restricción temporal de alimento, cuando es de tipo hipocalórica o en animales bajo una situación metabólica crítica (animales desnutridos) y en oscuridad constante, tiene fuerza para sincronizar al NSQ, indicando que bajo un estado crítico de alimentación y con la ausencia del sincronizador principal (ciclo luz-oscuridad) se puede afectar al NSQ.

La competencia entre sincronizadores es un factor determinante para establecer sincronización sobre el NSQ (Challet y col. 1998). Bajo un ciclo luz-oscuridad la restricción de alimento no modifica los patrones rítmicos de expresión de los genes reloj en el NSQ (Damiola y col. 2000; Hara y col. 2001; Stokkan y col. 2001; Wakamatsu y col. 2001), ni de la expresión de la proteína

c-Fos (Angeles-Castellanos y col. 2004). A nivel conductual tampoco se ve un efecto claro por la restricción de alimento en animales bajo un ciclo luz-oscuridad, en algunos casos, se ha podido observar una reducción de la actividad nocturna durante la restricción de alimento (Mistlberger, 1994; Stephan, 2002). Sin embargo, nuevamente, cuando la restricción de alimento es hipocalórica puede generarse una alteración en el ángulo de fase de la sincronización al ciclo luz-oscuridad (Figura 7; Challet y col. 1997a,1998).

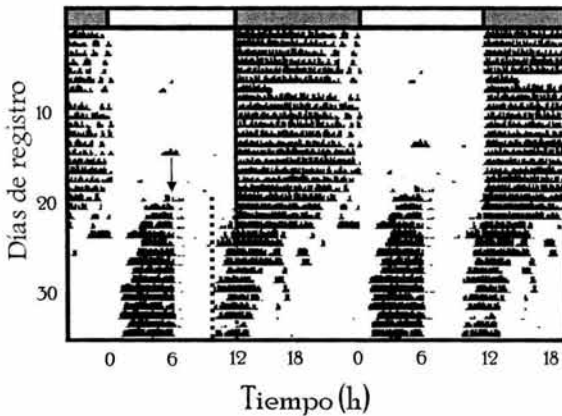


Figura 7. Actograma en representación doble de la actividad en rueda de ejercicio de un ratón bajo un ciclo luz-oscuridad 12-12, indicado por las barras superiores blancas y oscuras, y sincronizado a una dieta hipocalórica, indicado por la flecha vertical. Note como antes de la sincronización a la dieta hipocalórica existe un perfecto ajuste de fase del inicio de la actividad con el inicio de la fase de oscuridad (línea continua), mientras que durante la sincronización por alimento existe un inicio de la actividad fuera de fase (adelanto) con respecto al inicio de la oscuridad (línea punteada). Mendoza y col. datos no publicados

Aunado a esto, la respuesta tanto conductual como la expresión de genes reloj en el NSQ a un pulso de luz se ve alterada en ratones bajo condiciones de restricción a una dieta hipocalórica (Mendoza y col. datos no publicados).

Estos resultados demuestran que bajo ciertas condiciones específicas de restricción de alimento, como una dieta hipocalórica, el NSQ puede llegar a responder a este tipo de estímulos, y que además la respuesta dependerá de las condiciones de luz en la que se encuentren los animales; bajo un ciclo luz-oscuridad existe una alteración en ángulo de fase en la sincronización al ciclo, y una alteración en la respuesta a la luz tanto a nivel conductual como molecular, mientras que bajo condiciones de oscuridad constante el alimento tiene la fuerza para sincronizar al NSQ.

¿Por qué solamente bajo condiciones críticas de alimentación puede sincronizarse al NSQ? El mecanismo molecular del NSQ depende de dos factores de transcripción CLOCK y BMAL1 para la expresión de genes como *per* y *cry*, sin embargo, la unión de estos dos factores de transcripción depende del estado oxidado-reducción (REDOX) celular (Rutter y col. 2001). Esto sugiere que cuando la restricción de alimento es con una dieta hipocalórica, puede llegar a ser un potente sincronizador para el NSQ, alterando claramente el estado REDOX celular.

1.3 Los osciladores periféricos

Uno de los hallazgos más importantes e interesantes en el campo de la cronobiología ha sido la identificación de diversas estructuras fuera y dentro del SNC con características de osciladores circadianos, los cuales han sido denominados osciladores periféricos, por el hecho de encontrarse fuera del NSQ o del SNC (Figura 8).

La retina es uno de los primeros órganos que mostró oscilaciones circadianas autosostenidas *in vitro* (Tosini y Menaker, 1996). Sin embargo, la caracterización de genes reloj en el NSQ ayudó para poder identificar la expresión de estos genes en otros sitios dentro y fuera del SNC y así poder identificar otros osciladores circadianos. A nivel central, se ha podido observar la existencia de genes reloj en la corteza cerebral, el hipocampo, el estriado, el bulbo olfatorio y el núcleo lecho de la estra terminalis (Masubuchi y col. 2000; Wakamatsu y col. 2001; Granados-Fuentes y col. 2004; Amir y col. 2004), mientras que en la periferia, órganos como el hígado, el pulmón, el riñón, el corazón y el músculo (Figura 8), no solamente expresan genes, sino que además dicha expresión muestra oscilaciones circadianas (Sakamoto y col. 1998; Yamazaki y col. 2000). Más aún, se ha podido demostrar que una línea celular de fibroblastos *in vitro*, puede mostrar oscilaciones circadianas en la expresión de genes reloj inducidas por un shock de suero (Balsalobre y col. 1998).

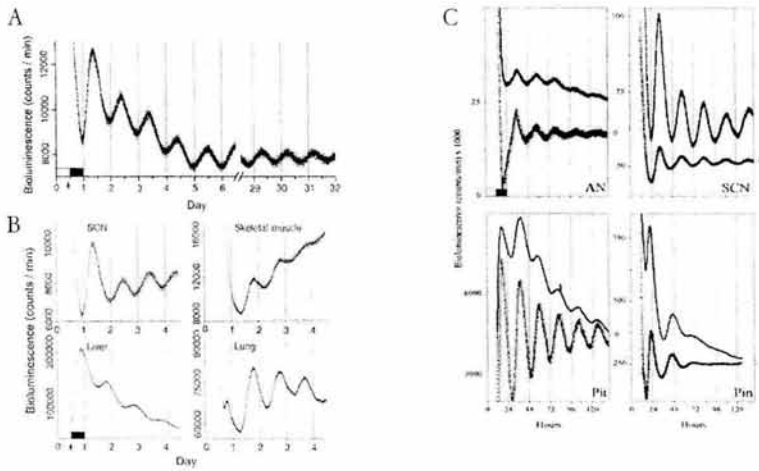


Figura 8. Ritmos de expresión de genes reloj en diversos tejidos de mamífero *in vitro*. La expresión circadiana de *perl* no solamente se ha podido demostrar en el NSQ (A), sino también en el músculo esquelético, el hígado y el pulmón (B), y a nivel del sistema nervioso central en diversas estructuras (C) como la hipófisis (PIT), el núcleo arqueado (AN) del hipotálamo y la glándula pineal (PIN) (Yamazaki y col. 2000; Abe y col. 2002).

El tiempo de oscilación de los genes reloj en tejidos periféricos parece ser similar entre estos, es decir hay una relación de fase entre sus patrones temporales de actividad (Damiola y col. 2000; Balsalobre, 2002), en contraste, en comparación con el NSQ, hay un retraso de 6 a 8 horas en el patrón temporal de expresión de genes reloj en los osciladores periféricos (Damiola y col. 2000; Wakamatsu y col. 2001; Balsalobre, 2002; Reppert y Weaver, 2002). El retraso entre el NSQ y los osciladores periféricos puede deberse al intervalo que necesita el reloj central para sincronizar, ya sea a través de señales nerviosas o humorales (Buijs y Kalsbeek, 2001), a los demás osciladores periféricos.

1.3.1 Mecanismos moleculares presentes en los osciladores periféricos

Se ha propuesto que en los mecanismos moleculares de los osciladores periféricos son los mismos genes responsables de la maquinaria molecular del NSQ. *per1* ha demostrado ser un componente esencial, ya que ratones con mutaciones de este gene, presentan retrasos de fase en las oscilaciones de los genes reloj de los tejidos periféricos (Cermakian y col. 2001). Por otro lado, además de los factores de transcripción CLOCK y BMAL1, otro factor de transcripción homólogo a CLOCK se ha identificado al menos en estructuras del cerebro anterior. NPAS2 es un factor de transcripción que sólo se encuentra en regiones como la corteza, el hipocampo y el estriado. Debido a que NPAS2 puede dimerizar con BMAL1, para la transcripción de genes como *per* y *cry*, ha sido considerado como un componente molecular determinante al menos para los osciladores circadianos en estructuras del cerebro anterior (Reick y col. 2001).

1.3.2 Sincronización de los osciladores periféricos

La sincronización del NSQ es principalmente de tipo luminoso, sin embargo, ¿cómo sincronizar a los osciladores periféricos? En algunas especies como el pez cebra, la luz puede actuar como sincronizador de los osciladores periféricos debido a la existencia de fotorreceptores locales en los tejidos periféricos (Whitmore y col. 2000). Sin embargo, en mamíferos la sincronización por luz de los tejidos periféricos se ha propuesto ser de manera indirecta, es decir a través del NSQ, el cual primeramente es sincronizado por la luz y éste a su vez sincroniza a todos los demás osciladores periféricos por medio de señales neurales y humorales (Yamazaki y col. 2000; Buijs y Kalsbeek, 2001).

Sin embargo, un sincronizador potente para los tejidos periféricos es el alimento. Cuando el alimento es restringido a unas horas al día, la expresión de genes reloj en diversos órganos como el hígado, el páncreas, el corazón y el riñón, así como en ciertas áreas del cerebro, tanto en condiciones de oscuridad continua como en un ciclo luz-oscuridad, se sincronizan a la hora del alimento (Damiola y col. 2000; Hara y col. 2001; Stokkan y col. 2001). Por otro lado, también se ha podido observar la sincronización de ciertas enzimas hepáticas a los horarios de alimento (Díaz-Muñoz y col. 2000). La sincronización de genes reloj por restricción de alimento en el hígado se presenta aún en animales con lesiones del NSQ (Hara y col. 2001), con lo que se demuestra que la sincronización al alimento de los tejidos periféricos puede presentarse independiente del NSQ.

Además de restricción de alimento, se ha propuesto que otras señales pueden ser sincronizadores de los osciladores periféricos, como por ejemplo los glucocorticoides (Balsalobre y col. 2000), los cambios de temperatura (Brown y col. 2002), las catecolaminas (Mendoza y col. 2003; Terazono y col. 2003) y la insulina (Kuriyama y col. 2004). Sin embargo, muchas de estas señales

internas que pueden sincronizar a los osciladores periféricos son señales que se desencadenan por la misma ingestión de alimento.

1.4 El oscilador sincronizado por alimento (OSA)

A pesar de que son bien claras las evidencias de que el NSQ es el reloj circadiano y que hay una serie de estructuras dentro y fuera del SNC como osciladores periféricos que responden a la sincronización por alimento, se ha propuesto la existencia de un oscilador sincronizado por alimento (OSA), y su identidad no ha quedado del todo clara.

1.4.1 La actividad de anticipación al alimento: un primer reporte

En la naturaleza la adquisición de alimento y la evitación de predadores son factores determinantes para la supervivencia de una especie. Sin embargo, muchas veces la disponibilidad del alimento, en la naturaleza, se restringe exclusivamente a unas horas a lo largo del día. Esto ha llevado al desarrollo de sistemas biológicos en las especies para anticipar la disponibilidad del alimento y poder obtener los mejores beneficios de éste. Los primeros reportes acerca de la existencia de mecanismos de medición del tiempo para la alimentación fueron descritos por el psiquiatra suizo Augusto Forel, quien observó que las abejas regresaban diariamente y la hora precisa al sitio donde él colocaba jalea para su desayuno. Forel sugirió, con estas observaciones, que las abejas poseían una especie de memoria temporal (*zeitgedächtnis*; en alemán) que les ayudaba a medir el tiempo y anticiparse al alimento (Moore-Ede y col. 1982).

Por otro lado, en mamíferos Curt Richter en 1922 observó que si una rata era alimentada a una hora regular cada día, ésta empezaba a correr en anticipación al alimento horas antes de la llegada del mismo, lo cual sugería la existencia de un sistema interno de medición del tiempo asociado al alimento en las ratas.

No fue sino hasta principios de los 60's que Robert Bolles comenzó a darle un mayor interés al fenómeno de la actividad de anticipación (AA). Bolles realizó una serie de experimentos, y en 1962 sugirió la participación de un reloj circadiano en el organismo que promueve la AA (Bolles y de Lorge, 1962).

El NSQ, como reloj circadiano bien caracterizado, era el principal candidato a ser el responsable de la AA. Sin embargo, Krieger y col. (1977) y Stephan y col. (1979) demostraron que su lesión no eliminaba el ritmo de corticosterona ni la AA asociados al alimento. Aunado a esto, la expresión de dos componentes de actividad, uno asociado al alimento y el otro en oscilación espontánea con un periodo menor de 24 horas indican la existencia de por lo menos dos osciladores desacoplados, uno en libre curso y otro sincronizado al alimento (Figura 9).

Stephan (1981) realizó una serie de experimentos en donde probó la sincronización por alimento con diferentes periodos de acceso a éste, y confirmó que existía un rango circadiano para la sincronización por alimento y que era de 22-31 horas, fortaleciendo aún más de la existencia de un oscilador sincronizado por alimento.

La existencia de los ciclos transitorios ante un cambio de fase (hora) del sincronizador, es una característica intrínseca de los osciladores circadianos. En la sincronización por alimento se ha observado que el cambio de la hora del sincronizador (alimento) genera ciclos transitorios en la AA (Stephan, 2001) y en el ritmo de corticosterona (Honma y col. 1984) hasta establecer una nueva fase.

Los límites de sincronización en un rango circadiano y la existencia de los ciclos transitorios surgieron como criterios para argumentar la existencia de un OSA (Stephan, 2001).

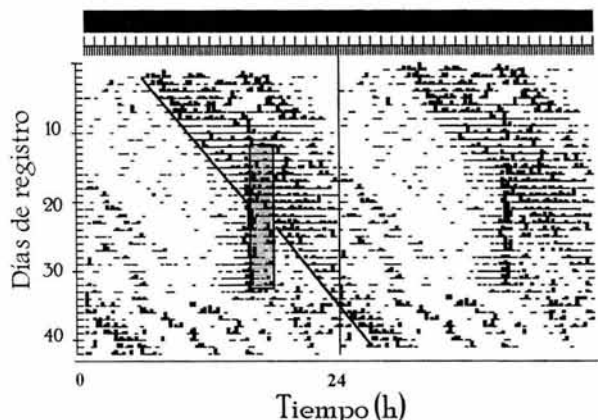


Figura 9. Actograma de la conducta de ingestión de agua en una rata en condiciones de oscuridad constante (barra negra superior) y bajo condiciones de restricción de alimento. Note como dos componentes independientes aparecen en el registro, uno en oscilación espontánea (línea inclinada) y otro anticipándose a la llegada de alimento (barra vertical sombreada). Tomada de Mendoza y col 2003.

1.4.2 La sincronización por alimento de parámetros fisiológicos y metabólicos

Por otro lado, se ha demostrado que diversos parámetros hormonales y metabólicos también se anticipan a la llegada del alimento. Krieger (1974) demostró que el ritmo de corticosterona y el de temperatura se sincronizan al alimento anticipándose a la llegada de éste. Escobar y col. (1998), demostraron que el alimento puede sincronizar las concentraciones de ciertos metabolitos como las de los ácidos grasos libres, los cuales aumentan considerablemente antes de la llegada del alimento, así mismo los triglicéridos pero con un efecto opuesto, disminuyen antes de la llegada del alimento y los cuerpos cetónicos los que también aumentan antes de la llegada del alimento. Además, algunos metabolitos, como los ácidos grasos y los triglicéridos, mostraron que el ritmo diurno persiste por varios ciclos en ayuno (Escobar y col. 1998).

1.5 Estructuras centrales determinantes en el control del balance energético y la sincronización por alimento

La identificación de un sustrato anatómico como posible oscilador circadiano sincronizado al alimento no ha sido exitosa hasta el momento. Lesiones de diversos núcleos dentro del hipotálamo como el ventromedial (VMH), lateral (LH), paraventricular (PVN) y el arqueado (ARC), así como en otras estructuras fuera del hipotálamo (sistema límbico, bulbo olfatorio, área postrema) no eliminan la AA generada por la restricción de alimento (Mistlberger, 1994; Stephan, 2002).

Aunado a esto, lesiones de tejidos periféricos como el hígado (bajo un modelo de toxicidad hepática crónica con tetracloruro de carbono, CCL₄) que ha mostrado ser un oscilador circadiano que se sincroniza al alimento, tampoco eliminan la AA (Escobar y col. 2002).

Por otro lado, Davidson y col (2000) demostraron que animales con lesiones del núcleo parabraquial (NPB) mostraban una atenuación y en algunos casos ausencia de la AA. Este núcleo se localiza en la parte dorsal del tallo cerebral y recibe aferencias del núcleo del tracto solitario (NTS; el cual a su vez recibe información visceral y de la lengua) y del área postrema (AP). Los autores concluyeron que el NPB es una estructura que sirve como una vía de relevo de la información visceral generada por el alimento (sincronizador) o como una vía de salida del oscilador, pero que no era el oscilador *per se* (Davidson y col. 2000).

Con la interpretación de estos resultados, las vías de entrada o de relevo de la información proveniente de la periferia hacia el SNC parecían ser determinantes en la expresión de la AA. El AP es una región carente de barrera hematoencefálica que permite la entrada de señales humorales de la circulación al SNC y además tiene eferencias hacia el NPB por lo cual podría ser un sitio importante para la señalización del sistema gastrointestinal hacia el cerebro. Davidson y col. (2001) mostraron que la lesión de AP no impedía la sincronización por alimento, por lo cual aunque la lesión del NPB atenuaba la AA, no era a través del AP por donde la información proveniente de la periferia pudiera tener acceso al NPB.

Otros estudios bajo el paradigma de restricción de alimento han mostrado que algunos sitios en el SNC se activan anticipando la llegada del alimento, por ejemplo el núcleo tuberomamilar (TB) en el hipotálamo, que incrementa la expresión de células inmunoreactivas a Fos (marcador de actividad neuronal) antes de la llegada del alimento, reflejando un alertamiento conductual por la expectación de alimento (Inzunza y col. 2000). Por otro lado, Angeles-Castellanos y col. (2004) mostraron la activación de Fos en otros núcleos en el hipotálamo asociados a la AA y la ingestión propia del alimento, en donde el DMH, y el área perifornical del hipotálamo (PeF) muestran un incremento en la expresión de Fos anticipando la llegada del alimento.

Por la importancia del hipotálamo en el control del metabolismo y de la ingestión de alimento, es claro el por qué diversos núcleos de esta región del cerebro, responden ante una situación de sincronización por alimento. Lo más interesante es que la respuesta de cada uno de estos núcleos es diferente desde el punto de vista temporal y así mismo en cuanto a la intensidad de su respuesta. Esto sugiere que dentro de un sistema de oscilación sincronizado por alimento cada uno de éstos tiene un papel específico, ya sea en las vías de sincronización, en la maquinaria circadiana del oscilador o en las salidas o expresión del oscilador (Angeles-Castellanos y col. 2004).

Sin embargo, el hecho de que lesiones específicas de diversos núcleos del hipotálamo no interfieran con la sincronización por alimento y que además no es un solo sitio del hipotálamo el cual responde a la sincronización, indica que son diversas las estructuras a nivel central las cuales subyacen a todo el proceso de sincronización por alimento, y que además por la variedad de funciones (cognitivas, motivacionales, emocionales, etc.) que se ven involucradas en la ingestión de alimento, muchas otras estructuras en el sistema nervioso central, fundamentales para toda esa serie de mecanismos presentes en la ingestión, pueden también ser relevantes durante la sincronización por alimento.

1.6 Estructuras y mecanismos centrales determinantes en los procesos de motivación y reforzamiento de la ingestión de alimento

A pesar de que muchos de los estudios acerca de los mecanismos de la motivación y reforzamiento se han hecho con modelos experimentales de adicciones a drogas, otros trabajos han demostrado que los mismos mecanismos a nivel central están participando durante la motivación y reforzamiento que generan conductas naturales como la ingestión de alimento.

A nivel central los mecanismos que subyacen la motivación son un tanto complejos, sin embargo, es bien establecido que uno de los mecanismos primordiales es el sistema dopaminérgico mesocorticolímbico, el cual se origina de neuronas dopaminérgicas en el área tegmental ventral (VTA) del mesencéfalo y su proyección hacia estructuras centrales como el núcleo accumbens, la amígdala y la corteza prefrontal. La evidencia es que este sistema es activado por una serie de eventos naturales y no naturales de carácter reforzante, y que su bloqueo impide el efecto conductual de tales reforzadores (Wise, 1985).

Diversas estructuras del sistema límbico han sido involucradas con las reacciones positivas hacia las propiedades hedónicas del alimento (Berridge, 2003). Por ejemplo, en monos se ha demostrado que la activación neuronal de la corteza prefrontal (PFC), la cual incluye el área prelímbica, infralímbica, cingulada anterior, insular agranular y áreas orbitofrontales (Paxinos, 1995), incrementa en respuesta al sabor favorito de una comida del animal o con el simple hecho de observarla, y además ante un estímulo condicionado a la presencia del alimento (Rolls, 2000). Por otro lado, en ratas se ha observado la misma respuesta de la PFC al valor hedónico del alimento (Bassaero y DiChiara, 1997).

La amígdala es una estructura que es considerada como clave en los procesos de las emociones y motivaciones. Se subdivide en el complejo basolateral de la amígdala (BLA), formado por varios núcleos (lateral, basal y accesorio), y el complejo centromedial (CeA), dividido en capsular, lateral y medial (Swanson y Petrovich, 1998). La amígdala es relevante en el control de la ingestión de alimento debido a la relación anatómica que tiene con el hipotálamo lateral (considerado el centro del hambre) y con el NTS principalmente el CeA, lo cual ha sido relacionado con la respuesta neuronal del CeA a las comidas apetitosas (Pomonis y col. 2000; Petrovich y col. 2002). La expresión de la proteína c-Fos, muestra un incremento principalmente en la CeA por la ingestión de una dieta apetitosa (Kim y col. 2001). Por otro lado, lesiones el CeA generan un decremento en la preferencia por soluciones apetitosas (sacarosa) en ratas (Touzani y col. 1997).

El núcleo accumbens es una estructura que se localiza en el cerebro anterior y que forma parte del estriado (en su región ventral) junto con el complejo caudado-putamen (región dorsal). Por las eferencias y aferencias que envía y recibe, este núcleo ha sido caracterizado como una vía de relevo o interfase entre la información de un estado motivacional y la expresión motora del mismo (Mogenson y col. 1980). Por lo cual, se considera como una estructura que regula las propiedades reforzantes del alimento durante la ingestión (Stratford y Kelley, 1999).

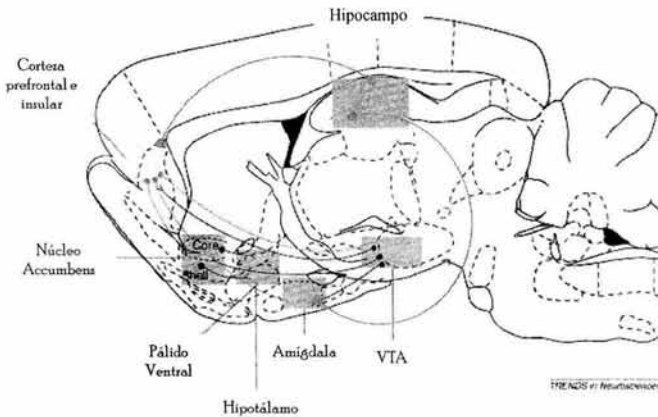


Figura 10. Representación esquemática de un corte sagital del cerebro de la rata mostrando las principales vías que se establecen entre estructuras del sistema límbico relevantes en los procesos de motivación y reforzamiento como en la conducta de ingestión de alimento. Modificado de Berridge y Robinson, 2003.

A nivel neuroquímico otros sistemas han tomado gran importancia en modular el impacto reforzante del alimento. Los péptidos opioides, como las endorfinas, actúan en el núcleo accumbens promoviendo un incremento en la ingestión de alimento apetitoso, como la sacarosa, lo cual indica que los cambios generados por un alimento reforzante no son exclusivos del sistema dopaminérgico, sino que además participan otros sistemas de neurotransmisión (Peciña y Berridge, 2000).

Debido a las características anatómicas, neuroquímicas y funcionales del núcleo accumbens, éste se ha subdividido en dos principales regiones, dorsolateral (Acc-Core) que representa a toda la región que rodea a la comisura anterior, y la región ventromedial (Acc-Shell) la cual se extiende medial, ventral y lateral a la región core (Heimer y col. 1991; Zahm y Brog, 1992). Además, en la ingestión de alimento se ha propuesto una participación diferencial de cada región. Mientras que la región shell ha sido involucrada con la fase consumatoria del alimento, la región core se ha involucrado con las conductas anticipatorias en la búsqueda y obtención del alimento (Kelley, 1999; Bassaero y Di Chiara, 1999a).

Por otro lado, algunos autores han utilizado los términos “liking” para referirse a todas aquellas reacciones a nivel conductual y fisiológico generadas por el impacto hedónico dado por el sabor de un alimento (conductas consumatorias) y “wanting” para referirse a todos los procesos de predicción de un reforzador (conductas anticipatorias). La propuesta va más allá de la diferencia de dos procesos involucrados en la motivación y reforzamiento, sino que además propone que tales procesos dependen de diferentes estructuras y sistemas neuroquímicos. Mientras que en el “liking” es el Acc-Shell y el sistema gabérgico y opioidérgico los principales responsables, para el “wanting” es el Acc-Core y el sistema dopaminérgico los que promueven la generación de todas las conductas de anticipación y predicción de un reforzador (Berridge y Robinson, 2003).

Los procesos a nivel cerebral que subyacen a la motivación y reforzamiento, sin embargo, no dependen de una estructura exclusivamente, sino de la dinámica de la comunicación entre diversas estructuras, siendo claves la PFC, el núcleo accumbens (shell y core) y la amígdala, además de su relación anatomofuncional no solamente entre éstas, sino también con otras estructuras como el hipotálamo y el tallo cerebral (Figura 10). Por ejemplo, la relación entre el Acc-Shell y el hipotálamo lateral (LH) es crucial en el control de la ingestión de alimento, en donde el Acc-Shell promueve la activación del LH utilizando GABA como principal neurotransmisor (Stratford y Kelley, 1999).

1.7 Sincronización por alimento, reforzamiento y motivación

Durante la sincronización por alimento existe un incremento en el estado de alertamiento y en los estados motivacionales que llevan a la presencia de conductas dirigidas hacia la búsqueda de alimento como la AA. Por otro lado, trabajos previos han demostrado que la sincronización con una dieta apetitosa, con altos contenidos en carbohidratos, genera AA en hamsters y ratas. Así mismo, breves accesos a sacarosa también pueden generar AA en ratas. Estos trabajos sugieren que además de los factores metabólicos o fisiológicos, propios de la ingestión de alimento, el valor reforzante del alimento es un factor determinante para la sincronización por alimento (Mistlberger y Rusak 1987; Abe y Rusak., 1992; Pecoraro y col. 2002).

Además de la presencia de una clara sincronización de la AA a una dieta apetitosa en hamsters intactos y con lesiones del NSQ (indicando la existencia de otros osciladores sincronizados), en algunos animales la conducta locomotora en oscilación espontánea (dependiente del NSQ) también muestra sincronización a la dieta apetitosa. Esto sugiere que el estado motivacional desencadenado por el alimento, no exclusivamente sincroniza al OSA, sino que además también en algunos casos sincroniza al NSQ. Este fenómeno se observa en la ausencia del sincronizador principal el ciclo luz-oscuridad (Abe y Rusak, 1992).

Por otro lado, Wakamatsu y col. (2001) demostraron que bajo restricción de alimento la expresión de genes como *per 1* y *per 2*, en la corteza y el hipocampo, ajustan su fase a la llegada del alimento, sugiriendo que la expresión de estos genes en dichas regiones del cerebro también está relacionados con los ritmos conductuales sincronizados por alimento. Cabe mencionar que tanto el hipocampo como la corteza, son estructuras claves en los mecanismos que subyacen a la motivación y reforzamiento, y a otros procesos cognitivos como el aprendizaje, lo cual sugiere que además de los procesos circadianos, homeostáticos, metabólicos, motivacionales y de reforzamiento, y por la complejidad de la conducta de ingesta de alimento, procesos cognitivos pueden estar involucrados en la sincronización por alimento.

Sin embargo, y a pesar de un claro papel de los estados motivacionales que se desencadenan durante la sincronización por alimento, los mecanismos a nivel central que subyacen dichos procesos y que pueden estar participando durante la sincronización por alimento, han sido pobremente explorados.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Estructuras en el SNC relevantes para el balance energético y control de la ingestión de alimento (hipotálamo, tallo cerebral) han mostrado tener un papel específico en la sincronización por alimento (Angeles-Castellanos y col. 2004). Sin embargo, a pesar de que existe un mecanismo homeostático y metabólico determinante durante la sincronización (Díaz-Muñoz y col. 2000), también se observa un cambio en el estado motivacional de los animales generado por la privación de alimento. Esto sugiere que estructuras del SNC, que subyacen los mecanismos motivacionales, pueden también ser determinantes para la sincronización.

A pesar de que se ha mostrado que en la corteza y el hipocampo, la expresión de genes reloj se sincroniza a los horarios de alimentación (Wakamatsu y col. 2001), estructuras de gran importancia motivacional, como el núcleo accumbens, no han sido estudiados detalladamente. Además, hasta el momento no se ha determinado cuanto contribuye el estado motivacional a la sincronización por alimento, vs. el estado metabólico de alternancia ayuno saciedad que establece este paradigma.

Por otro lado, el efecto de una sincronización por alimento en donde sólo exista una manipulación del estado motivacional de los animales, sin llevarlos a un estado catabólico por la privación de alimento, tampoco ha sido estudiado al momento y podría aportar información sobre las circunstancias particulares en que se logra modificar la actividad del NSQ o tal vez sincronizarlo por alimento.

En este estudio se abordan varios aspectos para determinar, además de los cambios metabólicos, la relevancia del valor hedónico del alimento en el paradigma de sincronización.

En una primera parte se exploró la participación del núcleo accumbens tanto en la expresión conductual como metabólica en la sincronización por alimento. Para ello se exploró la activación celular por medio de la detección de la proteína c-Fos, así como el efecto de lesiones localizadas en cada una de las subregiones del núcleo en la sincronización.

En una segunda parte se exploró la potencia de un alimento apetitoso como estímulo de sincronización y se determinó la actividad de estructuras límbicas e hipotalámicas involucradas en este mecanismo de sincronización.

Finalmente se exploró la influencia de la sincronización con un alimento apetitoso sobre el NSQ ante condiciones constantes de oscuridad. Situación en la cual disminuye la influencia competitiva de otros sincronizadores. Además, y por la importancia de estructuras talámicas en la sincronización no luminosa del NSQ, también se determinó la actividad de núcleos como el PVT y la HIL durante la sincronización.

3. HIPÓTESIS

3.1 Hipótesis Generales

1. Un cambio en el estado motivacional, desencadenado por periodos de restricción de alimento (hambre), es determinante en la sincronización de la AA por alimento, en donde estructuras en el SNC que subyacen los mecanismos que participan en la motivación y el reforzamiento tienen un papel específico. Por tal motivo, la lesión de alguna de dichas estructuras altera la sincronización de la AA.
2. El cambio en el estado motivacional de un animal por un alimento altamente apetitoso es suficiente para sincronizar parámetros conductuales y fisiológicos sin una privación de alimento, en donde estructuras del sistema límbico relevantes en los procesos de reforzamiento y motivación son determinantes en dicha sincronización.
3. El alimento es un sincronizador potente para los osciladores periféricos (dentro y fuera del SNC), pero no para el NSQ. Sin embargo, bajo ciertas condiciones en las que el alimento adquiere un valor altamente motivacional o reforzante, por un incremento en sus características gustativas y apetitosas, y en ausencia de un ciclo luz-oscuridad, el NSQ se sincroniza al alimento.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivos generales

1. Determinar el papel de estructuras en el SNC, como el núcleo accumbens, relevantes para la expresión de conductas motivadas (como la ingesta de alimento), en la sincronización por alimento, mediante la evaluación de su actividad celular, como la de un posible efecto por una lesión del núcleo sobre la sincronización por alimento.
2. Caracterizar la sincronización tanto conductual como fisiológica así como la respuesta celular de algunas estructuras del sistema límbico con un alimento de alto valor motivacional en animales sin privación de alimento regular.
3. Determinar si un alimento altamente apetitoso puede sincronizar al NSQ (a nivel conductual, fisiológico y celular) de animales sin privación de alimento y en condiciones de oscuridad constante.

5. MATERIALES Y MÉTODO

5.1 Animales y condiciones generales

Para todos los experimentos, se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso inicial de 220-250g obtenidas del bioterio de la facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Antes de cualquier manipulación experimental todos los animales se alojaron en cajas de acrílico (20 X 40 X 40cm) en grupos de 5 bajo un ciclo de luz-oscuridad (LO) 12-12 (las luces se encendían a las 7:00am), temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) y con agua y alimento (laboratory diet chow 5001) *ad libitum*.

5.2 Registro conductual

Para el registro conductual, se utilizaron cajas de acrílico individuales (30 X 45 X 20cm) en una habitación sonoamortiguada y bajo condiciones de temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$). Las condiciones de luminosidad durante el registro conductual (LO 12:12 u oscuridad constante) dependieron de los requerimientos en cada experimento. La actividad general de locomoción fue registrada de manera constante por medio de detectores infrarrojos localizados en la parte inferior de las paredes de la caja, por lo que cada movimiento del animal cerraba un circuito electrónico detectado por los sensores y la información se almacenaba en una computadora en intervalos de 15 minutos para su posterior análisis.

En el experimento 3, el registro conductual del grupo de animales control sincronizados a horarios restringidos de alimento (HRA) fue de la actividad de ingestión de agua y se realizó con el sistema DiSPAC (Digital Analysis System Applied to Chronobiology; Aguilar-Roblero y col. 1997).

Para cada animal se elaboraron actogramas en representación doble (double-plot) de la actividad locomotora y además para cada condición experimental se realizaron perfiles de actividad de un ciclo de 24 horas para los que se promediaba la actividad de todos los animales de cada condición o grupo experimental con un sistema de procesamiento y adquisición de datos (SPAD1, versión 1.1.1) diseñado en nuestro laboratorio.

5.3 Inmunohistoquímica

Para el análisis inmunohistoquímico, los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (2 ml Sedalphorte 0.063g/ml) y perfundidos a través del corazón (ventrículo izquierdo) con 250 ml de solución salina (0.9%), seguido por 250 ml de paraformaldehído al 4% en buffer fosfato al 0.1 M (PB; pH 7.2). Al finalizar la perfusión, se obtuvieron los cerebros y se fijaron nuevamente en paraformaldehído por 1 hora, y posteriormente se crioprotegieron en solución de sacarosa al 10, 20 y 30% en PB al 0.1 M sucesivamente por 24 horas en cada concentración.

Los cortes de cada cerebro (los cerebros se congelaron previamente) se hicieron en secciones coronales de 40 μm en un criostato a -18°C y se colectaron en series de 4. De estas series, se tomó una para teñirla con violeta de cresilo (Nissl), con el fin de poder identificar los núcleos de interés. Otra serie de cortes se incubó por 72 horas a 4°C en un anticuerpo primario para la proteína c-Fos hecho en conejo (Santa Cruz Biotechnology, USA) diluido 1:2500 en una solución de PB salina

(PBS) más suero de cabra y tritón (PBSGT; PBS, 1% suero de cabra, 0.3% Triton X-100), y una tercer serie de cortes se incubó en un anticuerpo para la proteína PER-1 hecho en cabra (Santa Cruz Biotechnology, USA) diluido en PBS más suero de conejo y tritón (PBSRI) a la misma concentración que el anticuerpo para c-Fos. La cuarta serie se guardó para un futuro análisis.

Al finalizar las 72 horas de incubación, los cortes fueron lavados 3 veces por 10 minutos en PBS, y posteriormente incubados en un anticuerpo secundario biotinilado (IgG hecho en cabra, anti-conejo para c-Fos; hecho en conejo, anti-cabra para PER-1; Vector laboratories) en una concentración 1:200 en PBSGT (PBS más suero de cabra y tritón) por 2 horas. Finalizando el tiempo de incubación, los cortes fueron nuevamente lavados en PBS e incubados en una solución avidina-biotina peroxidasa (Vectastain Elite ABC Kit; Vector Labs) por 2 horas y lavados nuevamente 3 veces por 10 minutos en PBS. Al finalizar el último lavado, los cortes se llevaron a una reacción con diaminobenzidina (0.5 mg/ml, en buffer de trizma 7.2), níquel, cobalto (200 µl de cada uno en 250 ml de diaminobenzidina, 10%) y peróxido de hidrógeno (35 µl, 30% H₂O₂). Cada corte fue montado en láminas (porta-objetos) gelatinizadas y deshidratadas en una serie de alcoholes y xilol para posteriormente ser cubiertas con cubreobjetos y permount (Fisher Chemicals).

5.4 Cuantificación celular

Para identificar el área total de cada núcleo, se utilizaron las imágenes teñidas con violeta de cresilo, de acuerdo al atlas estereotáxico Paxinos y Watson (1998; Tabla 1), las cuales fueron examinadas bajo el microscopio (Nikon Eclipse E600) y capturadas con un objetivo de 10X con un sistema de análisis de imagen (Meta Vue serie 4.5, Universal imagen corporation). Las células positivas a las proteínas c-Fos y PER-1, incluidas en el área seleccionada, fueron contadas manualmente en un lado de cada sección. Para evitar el contar células positivas falsas, primero se estableció un valor de densidad óptica (fondo) en una región alrededor del núcleo sin expresión de la proteína c-Fos o PER-1. Las células teñidas que sobrepasaran tres veces el valor del fondo establecido previamente se consideraron como positivas, mientras que las células que mostraban valores por debajo del fondo fueron descartadas. El número de células se transformó en células por milímetro cuadrado en el experimento 1 y 2 (mm²).

Tabla 1. localización de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson (1998) de los núcleos considerados para el conteo celular.

NÚCLEO	LOCALIZACIÓN INTERAURAL
Corteza prefrontal (PFC)	11.70mm
Accumbens shell (Acc-Shell)	10.20mm
Accumbens core (Acc-Core)	
Núcleo supraquiasmático (NSQ)	7.70mm
Núcleo paraventricular del tálamo (PVT)	
Núcleo lateral del hipotálamo (LH)	7.12mm
Núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN)	
Núcleo central de la amígdala (CeA)	
Núcleo ventromedial del hipotálamo (VMH)	5.86mm
Núcleo dorsomedial del hipotálamo (DMH)	
Hojuela intergeniculada lateral del tálamo (HIL)	-4.30mm

5.5 Cirugía y lesiones

En el experimento 1 para evaluar el efecto de una lesión en cada subterritorio del núcleo accumbens, los animales fueron anestesiados con hidrato de cloral (400mg/kg peso corporal), posteriormente se colocaron en un aparato estereotáxico a un nivel de la barra para incisivos -3.3mm. Se realizó un corte medio sagital para exponer el cráneo del animal, se identificó bregma y, de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson (1998), las coordenadas de cada uno de los núcleos de interés (Acc-Core, AP +1.2, L \pm 1.8, DV -7.2; Acc-Shell, AP +1.6, L \pm 0.4, DV -7.0). Se realizaron trepanaciones bilaterales de aproximadamente 0.3mm para la entrada de una micro-jeringa (2 μ l, Hamilton Co.).

Las lesiones se indujeron por la infusión de 0.4 μ l de NMDA en cada lado (N-methyl-D-aspartate; Sigma Co. 10mg/ml en PB 0.1M, Ph 7.4), a una velocidad de 0.2 μ l/min. Al finalizar la infusión la jeringa permaneció por un minuto más para permitir la difusión total del tóxico.

El grupo control recibió lesiones falsas (sham) en las que se realizaron todos los procedimientos quirúrgicos que el grupo experimental, pero en lugar del tóxico se infundió 0.4 μ l de PB como vehículo (0.1M, pH 7.4).

Para evaluar el efecto de la lesión sobre otros parámetros fisiológicos, el peso corporal de todos los animales se evaluó cada semana a lo largo de todo el experimento y la ingestión de alimento a lo largo de las 24 horas bajo condiciones *ad libitum*.

5.6 Determinación de las concentraciones de las variables metabólicas

Para la obtención de muestras de sangre para el análisis metabólico se utilizaron dos métodos: para el experimento 1, en el día 15 de sincronización, los animales se anestesiaron con hidrato de cloral (400mg/kg peso corporal), se expuso el área yugular del animal y se realizó un corte parasagital de aproximadamente 3cm, se disecó la región y se expuso la vena yugular interna, en la cual se realizó un corte y se insertó una cánula de silicón (0.64mm diámetro interno, 1.19mm diámetro externo) la cual previamente se llenó con heparina (500U/ml) como anticoagulante. La permeabilidad de las cánulas se mantuvo por más de 15 días.

En los experimentos 2 y 3, la obtención de las muestras fue durante el momento de la perfusión para la obtención de los cerebros de cada animal a través de un pinchazo en la vena cava.

Las muestras de sangre (600 μ l) se colectaron en tubos *ependorff* (1.8 ml), los cuales contenían un gel separador de suero. Durante la colección los tubos se mantuvieron a 4°C. Los tubos se centrifugaron a 2500 rpm durante 15 min. Las alícuotas de suero obtenidas (100 μ l) se congelaron a -45°C para su posterior análisis.

La determinación de ácidos grasos libres (AGL) se llevó a cabo por el método de Novák (1965), en el cual se realizó una curva de referencia utilizando como estándar el ácido palmítico (Sigma Co. 0, 2.78, 6.95, 13.9, 20.9, 27.8 mg/dl). La absorbancia de las muestras se determinó a 500 nm en un espectrofotómetro (Pharmacia Biotech) y se convirtieron a medidas de concentración (mg/dl) utilizando la curva estándar.

Las concentraciones de glucosa fueron determinadas por el método de Glucosa Oxidasa-Peroxidasa, con una muestra de 10 µl de suero, utilizando un kit comercial de colorimetría (Hycel No 70408). La absorbancia de las muestras se determinó a 520 nm y se convirtieron a medidas de concentración (mg/dl) utilizando la curva estándar.

5.7 Análisis estadísticos

Todos los datos se clasificaron por grupos y se representan como medias \pm errores estándar (SEM). En el experimento 1, para los análisis de la expresión de c-Fos se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías para medidas independientes de los factores grupo y tiempo. La intensidad de la AA y la sincronización metabólica se determinó con un ANOVA de dos vías mixto, para medidas repetidas del factor tiempo y medidas independientes para el factor grupo. El peso corporal y la ingestión de alimento se compararon entre grupos (control vs lesión) con un ANOVA de una vía para medidas independientes.

En el experimento 2, la intensidad de la AA se determinó con un ANOVA de una vía para muestras repetidas del factor tiempo. La expresión de c-Fos, así como las concentraciones de las variables metabólicas (glucosa, ácidos grasos) se analizaron con un ANOVA de dos vías mixto para medidas independientes del factor grupo y medidas repetidas del factor tiempo.

En el experimento 3, se utilizaron ANOVA's de una vía para muestras independientes para el análisis de los periodogramas, de la determinación metabólica (glucosa, ácidos grasos) y de la expresión celular de las proteínas c-Fos y PER-1, para el factor tiempo. Además se utilizó un análisis de regresión lineal y una prueba *t-test* de student para evaluar la relación entre el periodo endógeno de actividad y la velocidad de sincronización a la dieta apetitosa.

A todos los análisis estadísticos se les aplicó una prueba *post-hoc* de Tukey de múltiples comparaciones con un alfa de $p < 0.05$. Para todos los análisis se utilizó el paquete estadístico para Windows Statistica versión 4.5 (StatSoft, 1993).

6 EXPERIMENTO 1

6.1 Participación del núcleo accumbens en la sincronización por alimento

Con la idea de poder determinar el papel del núcleo accumbens, como una estructura del SNC relevante para la conducta de alimentación, y de acuerdo a la primera propuesta de este trabajo acerca de la importancia de las características reforzantes del alimento durante la sincronización a horarios restringidos de alimento, se plantearon las siguientes hipótesis y objetivos:

6.1.1 Hipótesis específicas

-La activación celular de las dos regiones del núcleo accumbens es determinante durante la sincronización por alimento. Además, por la diferencia funcional entre de cada subregión del núcleo (core y shell) la respuesta de la región core es durante la AA y en shell durante la ingestión de alimento.

-La lesión específica de cada región, core o shell, alterará diferencialmente la AA y la ingestión de alimento, así como la sincronización de ácidos grasos libres durante un paradigma de sincronización a horarios restringidos de alimento (HRA).

6.1.2 Objetivos específicos

-Evaluar la respuesta diferencial de las 2 regiones del núcleo accumbens (shell y core) en animales sincronizados por alimento por medio de la expresión de la proteína c-Fos.

-Determinar el efecto de una lesión excitotóxica específica en cada una de las regiones del núcleo accumbens sobre la sincronización tanto conductual como metabólica (ácidos grasos) al alimento.

6.2 Diseño experimental

6.2.1 Expresión de la proteína c-Fos

Para evaluar la expresión de la proteína c-Fos durante la sincronización por alimento en ambas regiones del núcleo accumbens (Acc-Shell y Acc-Core), los animales fueron expuestos a un ciclo luz-oscuridad 12:12, en el que el encendido de la luz era a las 0700 am (hora del sincronizador 0 = zeitgeber time ZT-0) y el apagado de la luz a las 1900 pm (zeitgeber time ZT-12). Se designaron dos grupos de manera aleatoria:

Grupo *ad libitum* (AL): con libre acceso al alimento como grupo control.

Grupo sincronizado a horarios restringidos de alimento (HRA): con acceso al alimento sólo por 2 horas al día a la mitad de la fase de luz, de ZT-6 a ZT-8 (1300-1500h) por 3 semanas.

En el último día de la manipulación experimental, todos los animales fueron sacrificados en diferentes puntos temporales: ZT-4, ZT-5, ZT-6, ZT-8, ZT-12 y ZT-14 (n=5 por grupo y punto temporal). Se determinaron estos puntos temporales debido a que el objetivo era evaluar la respuesta celular durante la AA (ZT-4, ZT-5, y ZT-6), durante la ingestión de alimento (ZT-8) y posterior a la ingestión (ZT-12, ZT-14).

Para evaluar la persistencia del patrón de expresión de la proteína c-Fos sincronizado al alimento, otro grupo de animales fue asignado a uno de dos grupos:

Grupo de persistencia (**HRA-A**): el cual fue sincronizado a HRA por 3 semanas, posteriormente se mantuvo en condiciones *ad libitum* por 5 días y finalmente por 3 días en condiciones de ayuno.

Grupo control (**AL-A**): animales que estuvieron en condiciones *ad libitum* por 3 semanas, seguido de un periodo de 3 días en ayuno.

En ambos grupos, los animales se sacrificaron en el último día de ayuno en los mismos puntos temporales que los animales de la fase de sincronización ZT-4, ZT-5, ZT-6, ZT-8, ZT-12 y ZT-14 (n=5 por grupo y punto temporal).

6.2.2 Lesiones químicas Acc-Shell o Acc-Core

Para el segundo objetivo otro grupo de ratas fue asignado aleatoriamente a uno de 4 grupos: con lesiones en Acc-Shell (Lesión-Sh; n=8), con lesiones en Acc-Core (Lesión-Co; n=8), con lesión falsa en Acc-Shell (Sham-Sh; n=8) y con lesión falsa en Acc-Core (Sham-Co; n=8). Los animales se mantuvieron bajo un ciclo luz-oscuridad 12:12 (700 am encendido de la luz; ZT-0) a lo largo de todo el experimento. Antes de iniciar las manipulaciones experimentales los animales permanecieron 10 días en recuperación a la lesión.

Para el análisis metabólico, los animales fueron sincronizados durante 17 días a HRA con acceso al alimento sólo por dos horas al día a la mitad de la fase de luz (ZT-6 a ZT-8). En los días 16 y 17 de sincronización se obtuvieron las muestras de sangre por cada animal en diferentes puntos temporales: ZT-3, ZT-4, ZT-5, ZT-6, ZT-8 y ZT-9. Estos puntos temporales fueron seleccionados para evaluar un efecto de la lesión sobre el incremento anticipatorio de las concentraciones de AGL.

Al finalizar la toma de muestras para el análisis metabólico, las cánulas fueron bloqueadas y se inició el registro conductual. Los cuatro grupos de animales tuvieron libre acceso al alimento por 15 días, en el día 16 fueron sincronizados a HRA por tres semanas con acceso al alimento de ZT-6 a ZT-8. Al finalizar la sincronización, los animales se sometieron a un periodo de 3 días en ayuno para evaluar persistencia de la AA. Finalmente, se mantuvieron en condiciones *ad libitum* por 15 días.

6.3 Resultados

6.3.1 Expresión de c-Fos en el núcleo accumbens de animales sincronizados a HRA

El número de células inmunoreactivas a c-Fos incrementó en ambas regiones del núcleo accumbens (shell y core) de los animales sincronizados a HRA. En Acc-Shell las ratas sincronizadas mostraron mayor número de células activas (c-Fos) con respecto al grupo control (*ad libitum*) en ZT-6 (durante la ingestión) y en ZT-12 (6 horas después de la ingestión), y aunque no hubo un efecto significativo, también se observó un incremento en ZT-8 (Figuras 11A y 12). Por otro lado, en Acc-Core se observó un incremento de c-Fos estadísticamente significativo en ZT-6. (Figuras 11B y 12). Debido a que las ratas en el punto ZT-6 del grupo HRA permanecieron sin alimento hasta el sacrificio, la expresión de c-Fos en este punto temporal está relacionado con la AA.

El análisis estadístico indicó una clara diferencia entre el grupo AL y el grupo HRA en el Acc-Shell ($F(1,42)=25.78;p<0.001$) y en el Acc-Core ($F(1,41)=21.04;p<0.001$). Para el factor tiempo, no se encontró un efecto significativo (Acc-Shell, $F(5,41)=1.081;NS$; Acc-Core, $F(5,42)=2.06;NS$). Además, hubo un efecto significativo en el análisis de la interacción del factor tiempo y grupo en el Acc-Shell ($F(5,42)=4.76;p<0.001$), pero no en Acc-Core ($F(5,41)=1.52;NS$).

En ambos grupos ayunados (HRA-A y AL-A) se observó una disminución en el número de células inmunoreactivas a c-Fos. No hubo una clara persistencia en el patrón de c-Fos de los animales sincronizados (Figuras 11C-11D). Sin embargo, el análisis de varianza indicó una diferencia significativa, durante el periodo de ayuno, entre los animales que fueron previamente sincronizados con respecto a los control, tanto en Acc-Shell como en Acc-Core (Acc-Shell, $F(1,40)=9.335;p<0.003$; Acc-Core, $F(1,40)=9.781;p<0.003$).

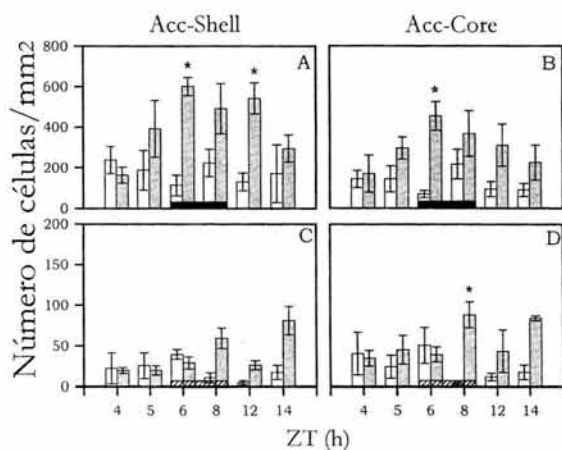


Figura 11. Número de células inmunoreactivas a c-Fos (medias \pm SEM) en Acc-Shell (A) y Acc-Core (B) en animales sincronizados a HRA (barras grises) y en condiciones AL (barras blancas). C y D representan el número de células inmunoreactivas a c-Fos en Acc-Sh y Acc-Co respectivamente durante el periodo de ayuno en ratas previamente sincronizadas a HRA (barras grises) y en condiciones ad libitum (barras blancas). Las barras negras horizontales representan el momento de la llegada del alimento y las barras rayadas la hora esperada de alimentación durante el ayuno. * $p<0.05$ *post-hoc* sincronización vs *ad libitum*.

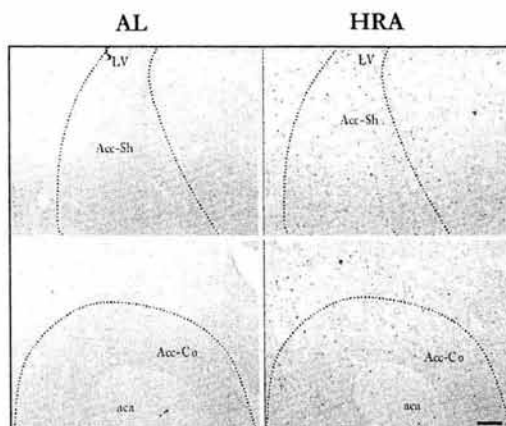


Figura 12. Microfotografías de la expresión de c-Fos en el Acc-Shell y en Acc-Core de ratas en condiciones de alimentación *ad libitum* (izquierda) y sincronizados a HRA (derecha) en ZT6. LV, ventrículo lateral; aca, comisura anterior. Las líneas punteadas representan el área cuantificada. La barra horizontal representa una escala de 120 μ m.

6.3.2 Efecto de la lesión de Acc-Shell vs Acc-Co en la sincronización

Histología

En los animales con lesiones falsas, no se observaron señales de algún daño ya sea pérdida celular o gliosis. Los animales con lesiones en el Acc-Shell presentaron una lesión en las regiones ventral y medial del núcleo. En algunos animales se observó lesión en la región medial del séptum probablemente debido al daño mecánico por la inserción de la jeringa. En los animales con lesiones en Acc-Core se observó una marcada pérdida celular en toda el área alrededor de la comisura anterior (Figura 13).

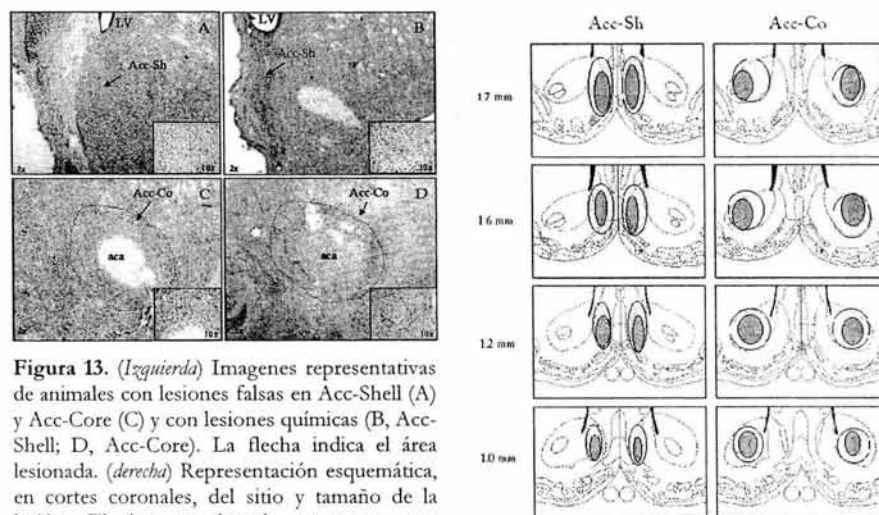


Figura 13. (Izquierda) Imágenes representativas de animales con lesiones falsas en Acc-Shell (A) y Acc-Core (C) y con lesiones químicas (B, Acc-Shell; D, Acc-Core). La flecha indica el área lesionada. (derecha) Representación esquemática, en cortes coronales, del sitio y tamaño de la lesión. El área sombreada representa una mínima lesión y el área blanca representa el área máxima lesionada. (basado en el atlas de Paxinos y Watson, 1998).

Peso corporal e ingestión de alimento

Tanto los animales con lesiones falsas y lesiones con NMDA en Acc-Shell mostraron un incremento del peso corporal a lo largo de todo el experimento. Sin embargo, los animales lesionados mostraron mayor ganancia de peso que los animales control bajo condiciones *ad libitum* ($F(1,15)=4.51; p<0.05$; Tabla 2). Los animales con lesiones falsas en Acc-Core mostraron una ganancia de peso similar a la de los grupos previos, sin embargo, los animales con lesiones NMDA en Acc-Core ganaron peso en una menor proporción ($F(1,12)=11.70; p<0.005$; Tabla 2).

El efecto de la lesión sobre la ingestión de alimento fue también diferente entre los grupos con lesión en Acc-Shell vs Acc-Core. Mientras que para los animales lesionados en Acc-Shell la ingestión aumentó con respecto a su control ($F(1,14)=9.60; p<0.0078$), en los animales con lesiones en Acc-Core se observó un crítico decremento de la ingestión comparado con su control ($F(1,12)=122.11; p<0.0001$; Tabla 2).

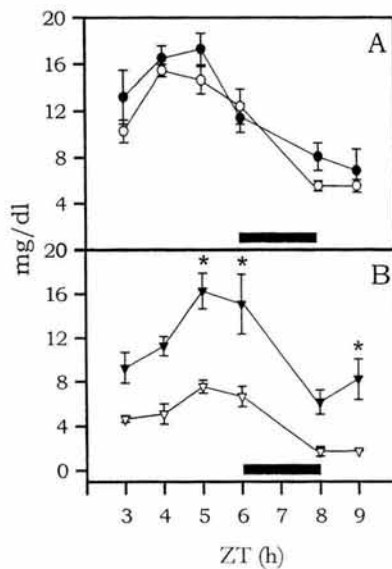
Tabla 2. Peso corporal (antes de iniciar la sincronización) e ingestión de alimento (durante 24h antes de la restricción de alimento) en animales con lesiones falsas y lesiones con NMDA. Los valores se representan como medias \pm SEM. * diferencia entre los animales con lesiones NMDA y sus respectivos controles.

	Shell-sham (n=8)	Shell-lesion (n=9)	Core-sham (n=7)	Core-lesion (n=7)
Peso corporal (g)	280.12 \pm 5.02	293.66 \pm 3.24*	281.28 \pm 4.13	252.28 \pm 4.42*
Ingestión de alimento (g)	23.68 \pm 0.86	27.00 \pm 0.62*	24.85 \pm 1.03	12.00 \pm 0.53*

Concentraciones de ácidos grasos libres (AGL)

El ritmo diurno de AGL fue sincronizado por el HRA. Los niveles séricos de AGL incrementaron antes del acceso al alimento y decrecieron después de la alimentación tanto en animales con lesiones falsas y NMDA en Acc-Shell (Figura 14A). El análisis de varianza indicó una diferencia significativa en el factor tiempo ($F(5,50)=47.15; p<0.0001$), pero no en el factor grupos ($F(1,10)=1.24; NS$). La misma dinámica temporal se observó en ratas con lesiones falsas y NMDA en Acc-Core anticipando al alimento, aunque los niveles de AGL en los animales lesionados fueron menores con respecto a los controles ($F(1,10)=123.26; p<0.0001$; Figura 14B).

Figura 14. Perfil temporal (medias \pm SEM) de las concentraciones de AGL de ratas sincronizadas a HRA (A) con lesiones NMDA en Acc-Shell (círculos blancos; n=8) y sus respectivos controles (círculos negros; n=8) y de ratas (B) con lesiones en Acc-Core (triángulos blancos; n=8) y sus respectivos controles (triángulos negros; n=8). La barra negra horizontal indica el momento de acceso al alimento. *post hoc* * $p<0.05$ lesión vs control.



Actividad de anticipación al alimento

Durante los primeros 15 días en condiciones *ad libitum*, todos los grupos mostraron un claro ritmo diurno de actividad locomotora. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas en cuanto a la intensidad de la actividad entre los animales con lesiones falsas y con lesiones NMDA en Acc-Shell ($F(1,17)=1.06$;NS). Sin embargo, se observó una diferencia significativa en el factor tiempo, indicando un claro ritmo circadiano sincronizado al ciclo luz-oscuridad ($F(23,391)=23.40$; $p<0.0001$) (Figuras 15A, 15C y 16A). En los animales con lesiones en Acc-Core y en sus controles también se observó un ritmo diurno de la actividad locomotora ($F(23,368)=15.85$; $p<0.00001$) y no hubo diferencias significativas en la intensidad de la actividad entre grupos ($F(1,16)=.0001$;NS) (Figuras 15B, 15D y 16D).

Durante la sincronización a HRA, los animales con lesiones en Acc-Shell y sus controles mostraron una clara AA. Sin embargo, en el grupo lesionado, la AA inició dos horas antes con respecto a la AA del grupo control. En este grupo, el nivel general de actividad incrementó durante la fase nocturna así como durante la AA de los animales lesionados. (Figuras 15C y 16B). El análisis estadístico mostró una diferencia significativa en la AA entre ambos grupos ($F(1,16)=6.93$; $p<0.018$). Por otro lado, en los animales con lesiones en Acc-Core la AA fue casi nula, sólo se observó un pequeño incremento de la actividad después de la ingestión, pero no una clara AA como en los controles (Figuras 15B, 15D y 16E). Esta diferencia entre grupos en la intensidad de la AA fue estadísticamente significativa ($F(1,17)=5.70$; $p<0.02$). La actividad locomotora nocturna de estos animales no se alteró por la lesión.

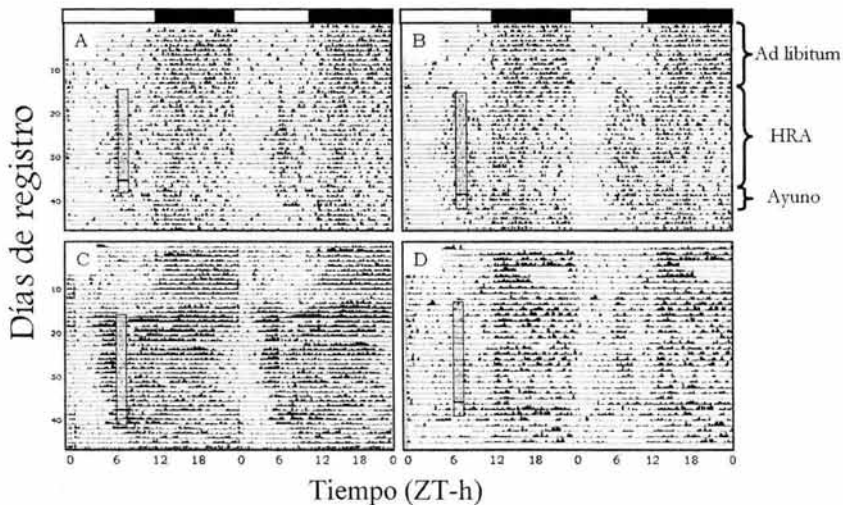


Figura 15. Actogramas representativos de la actividad general de ratas bajo un ciclo luz-oscuridad 12-12h. Durante los primeros 15 días los animales tuvieron acceso libre al alimento (*ad libitum*). Posteriormente fueron sincronizados a HRA (barra gris vertical) durante 3 semanas, seguido por 3 días en condiciones de ayuno (barra blanca vertical). A-B, muestran ejemplos representativos de animales con lesiones falsas en Acc-Shell y Acc-Core respectivamente. C-D representan la actividad de dos animales con lesiones NMDA en Acc-Shell y Acc-Core respectivamente.

Durante el periodo de ayuno, la persistencia del patrón sincronizado de actividad se presentó en todos los animales. Los animales con lesiones en Acc-Shell exhibieron una actividad locomotora mucho más intensa que sus controles ($F(1,16)=12.52; p<0.002$; Figura 16C). Entre el grupo con lesiones en Acc-Core y sus controles no hubo una diferencia significativa de la actividad locomotora durante el periodo de ayuno ($F(1,15)=.6804; NS$; Figura 16F).

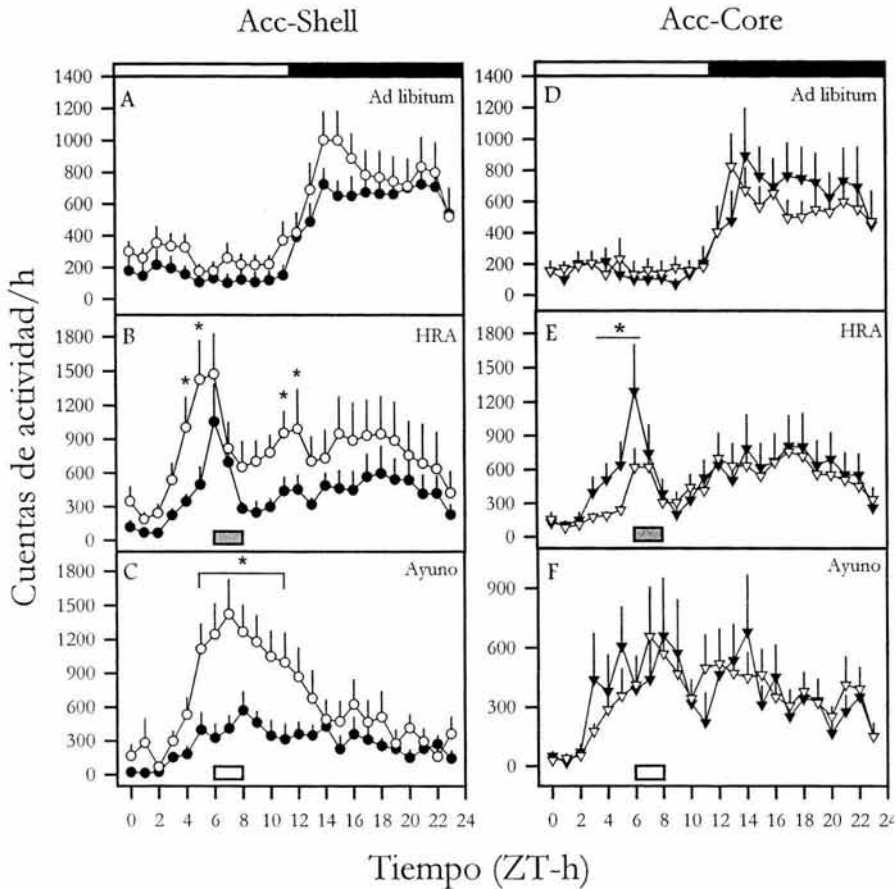


Figura 16. Perfiles de actividad locomotora promedio (\pm SEM) de ratas con lesiones falsas (símbolos negros) y con lesiones NMDA (símbolos blancos) en Acc-Shell (izquierda) y Acc-Core (derecha) bajo condiciones *ad libitum* de alimentación (A-D), sincronizados a HRA (B-E) y durante 3 días en condiciones de ayuno (C-F). Las barras blancas y negras superiores indican el momento de la llegada del alimento, mientras que las barras grises horizontales en las gráficas de sincronización a HRA indican el momento de la llegada del alimento, mientras que las barras blancas horizontales en las gráficas de ayuno indican el momento del alimento esperado. * $p<0.05$ *post hoc* Tukey lesión vs control.

6.4 Discusión

6.4.1 **Diferenciación funcional del núcleo accumbens durante la sincronización por alimento**

De acuerdo con la hipótesis inicial de este trabajo, la respuesta que se observó con la expresión de c-Fos indica que ambos territorios del núcleo accumbens (shell y core) están involucrados en la AA y la ingestión de alimento, y que además existe una diferencia entre estos durante la sincronización, sugiriendo que el núcleo accumbens, por su importancia en los procesos de reforzamiento y motivación, es determinante para la sincronización por alimento.

En Acc-Core hubo un incremento de la expresión de c-Fos iniciando en ZT-5, seguido por un incremento significativo en ZT-6, lo que sugiere que esta región es relevante en la expresión de la AA. En Acc-Shell la expresión de c-Fos incrementó durante la ingestión en ZT-6, y fue mayor en las horas posteriores a la ingestión, indicando una mayor relación de esta región con la conducta consumatoria, y posiblemente con algunos aspectos metabólicos posteriores a la ingestión. Estas diferencias entre ambas regiones han sido reportadas en estudios de microdiálisis, en donde se muestra que los niveles de dopamina extracelular incrementan en Acc-Core durante las conductas que llevan a la obtención del alimento, mientras que en Acc-Shell los niveles de dopamina extracelular incrementan al momento de la ingestión propiamente (Bassaero y Di Chiara, 1999a). Estas observaciones y las del presente estudio, señalan la relación diferencial de ambas regiones durante la ingestión de alimento, indicando un mayor papel del Acc-Core con la anticipación, la búsqueda y obtención de alimento y una mayor relación del Acc-Shell posiblemente con la respuesta reforzante del alimento posterior a la ingestión. Además, durante las condiciones de ayuno solamente se observó una persistencia del patrón sincronizado de c-Fos en Acc-Core, indicando una relación de esta región con el oscilador sincronizado por alimento. Debido a la relación del Acc-Core con el sistema motor y por su importancia en la conducta de búsqueda de alimento (Bassaero y Di Chiara, 1999a), estos resultados apoyan la hipótesis de que el Acc-Core puede ser una estructura relevante para la expresión de la AA.

En la segunda parte de este experimento, las lesiones con NMDA de Acc-Shell y Acc-Core, también mostraron efectos diferenciales. Bajo condiciones *ad libitum*, las ratas con lesiones en Acc-Shell incrementaron la ingestión de alimento y el peso corporal en comparación con sus controles. Por otro lado, los animales con lesiones en Acc-Core mostraron una disminución en el peso corporal a lo largo de todo el estudio, así como un crítico decremento en la ingestión de alimento. Sin embargo, la actividad locomotora no se vió alterada durante estos primeros 15 días de línea base, por lo cual asumimos que el decremento en la ingestión de alimento no fue debido a un deterioro en la actividad locomotora.

Todos los animales mostraron sincronización de las concentraciones de AGL, aunque en los animales con lesiones en Acc-Core el nivel basal de este metabolito decremó significativamente. Los bajos niveles de AGL pueden deberse al decremento en la ingestión de alimento y al decremento en la ganancia de peso en estos animales.

Así mismo, todos los animales mostraron AA, sin embargo, en las ratas con lesiones en Acc-Shell, el inicio de la AA fue más tempranamente y hubo un incremento significativo, mientras que en los animales con lesiones en Acc-Core se observó una AA disminuida y en algunos casos casi nula.

Las diferencias de los efectos de las lesiones, en cada región del núcleo accumbens, pueden deberse a las relaciones anatómicas específicas de cada una de estas regiones. Mientras que el Acc-Core establece referencias con el sistema motor, las referencias del Acc-Shell son hacia regiones límbicas como la amígdala y el LH. Un papel diferencial entre el Acc-Shell y el Acc-Core en la ingestión de alimento ha sido evidenciado por experimentos en los que se induce un bloqueo de las entradas excitatorias hacia el Acc-Shell lo que resulta en una estimulación de la ingestión de alimento, mientras que si el bloqueo es directamente hacia la región Core, se deteriora la respuesta conductual hacia el alimento (Baldo y col. 2002; Hanlon y col. 2004).

La relación anatómica entre el Acc-Shell y el LH, mediante una vía gabaérgica, tiene un papel relevante para el control de la alimentación. (Stratford y Kelley, 1997, 1999). La administración de un agonista gabaérgico en Acc-Shell incrementa la ingestión de alimento y la expresión de c-Fos en LH (Stratford y Kelley, 1999). Por lo tanto la lesión del Acc-Shell puede generar una desinhibición del LH debido a la ausencia de las proyecciones gabaérgicas de Acc-Shell, y así un incremento de la ingestión de alimento, de la AA y la persistencia de ésta durante el periodo de ayuno.

La reducción en la amplitud e intensidad de la AA en animales con lesiones de Acc-Core, sugiere que esta región tiene mayor relación con las salidas del OSA en la expresión de la AA. El Acc-Core es relacionado a un sistema diferente que el Acc-Shell, debido a que el Acc-Core está mayormente vinculado con el complejo caudado-putamen. Estudios previos han descrito que una destrucción específica de las terminales dopaminérgicas en el complejo caudado-putamen inhibe la ingestión de alimento pero no la locomoción en ratas (Salamone y col. 1993). A nivel molecular, ratones deficientes de la síntesis de dopamina se vuelven hipofágicos y mueren por inanición a las 4 semanas de edad, lo que sugiere que la liberación de dopamina hacia el estriado es indispensable para la integración de estímulos relevantes para la alimentación (Szczytko y col. 2001).

El hecho de que la ingestión de alimento decreció significativamente en las ratas con lesiones del Acc-Core sugiere que para estos animales el alimento no tiene potencia como sincronizador. Estudios previos reportaron que el valor nutricional y la cantidad del alimento son características relevantes que le dan las propiedades de sincronizador (Mistlberger y Rusak, 1987). Cuando se reduce la cantidad del alimento durante la sincronización no se observa AA. Por otro lado, un estudio previo mostró un decremento de la AA por lesiones del núcleo parabraquial (NPB) en el tallo cerebral (Davidson y col. 2000). La interpretación de estos resultados sugeriría que el NPB es una vía de relevo de las señales de sincronización generadas por el alimento en el sistema digestivo, por lo que la lesión del NPB puede decrementar la intensidad de las señales generadas por el alimento y por lo tanto decrementarse la AA. Interesantemente, el NPB tiene una vía neuronal indirecta hacia el Acc-Core y Acc-Shell (Heimer y col. 1991). Esta relación anatómica y funcional entre el Acc-Core y el NPB pueden explicar porqué ambas lesiones producen un decremento similar en la AA. Por todo esto sugerimos que en ratas con lesiones de Acc-Core la cantidad de alimento ingerido durante la sincronización no fue suficiente para producir AA.

Es importante mencionar que a pesar del claro decremento de la AA en los animales con lesiones en Acc-Core, no hubo un decremento de la actividad nocturna, la cual mostró valores similares al grupo control. Este efecto específico sobre la AA confirma que el resultado de la lesión no fue debido a un deterioro en general de la locomoción, y sugiere un papel específico del Acc-Core como una región de salida para la expresión de la AA. La corteza prefrontal, incluyendo la corteza cingulada anterior y la prelímbica, proyecta hacia el Acc-Core, pero no hacia el Acc-Shell (Heimer y col. 1991). Recientes evidencias han descrito la expresión de genes reloj en una manera circadiana en

la corteza prefrontal, y además que esta expresión puede sincronizarse al alimento (Wakamatsu y col. 2001). De acuerdo a estos resultados, y la propuesta de que la corteza prefrontal es un oscilador circadiano, el Acc-Core puede ser parte de una vía de salida hacia estructuras motoras principales para la expresión de los ritmos conductuales sincronizados por alimento. Además, la corteza prefrontal y el Acc-Core están funcionalmente relacionados a través de una vía glutamatérgica, circuito que ha sido propuesto como determinante en la adquisición de conductas instrumentales (Kelley, 1999). Un reporte previo describió que la administración intraperitoneal de un antagonista de los receptores NMDA (MK-801) interfiere con la AA en ratas (Ono y col. 1996). Nuestros resultados indican de la misma manera un deterioro en la AA en los animales con lesiones en Acc-Core, que de acuerdo con el estudio citado previamente, sugiere que la expresión de la AA requiere de la integridad de esta vía corticoestriatal.

Esta posibilidad encuentra apoyo en un estudio en el cual se describió la expresión del factor de transcripción NPAS2 en una manera circadiana tanto en el estriado como en la corteza, y que en ratones knock out del gene NPAS2, la AA es deficiente (Dudley y col. 2003). Interesantemente, el núcleo accumbens es parte del estriado ventral, lo que sugiere a nivel fisiológico y molecular que las manipulaciones de esta región pueden ser críticas para la sincronización por alimento.

Previamente se reportó que largas lesiones del núcleo accumbens en ratas no eliminan la AA (Mistlberger y Mumby, 1992). En este estudio, los autores reportaron un decremento de la actividad general de los animales por lesiones “completas” del núcleo accumbens incluyendo otras estructuras lesionadas como el septum, el pálido ventral, la banda diagonal de Broca, el núcleo del lecho de la estría terminalis, el complejo caudado-putamen y el PVT. La leve disminución en la AA fue atribuida al estado general de hipoactividad de los animales y la conclusión de los autores fue que el núcleo accumbens no era relevante para la sincronización por alimento.

Nuestros resultados están parcialmente en acuerdo con este estudio, ya que aquí mostramos que la AA no es abolida por la lesión. Sin embargo, se observaron efectos diferenciales en el inicio y la intensidad de la AA dependiendo del daño de cada región, lo cual indica que el núcleo accumbens está involucrado con la expresión de la AA, aunque éste puede no ser parte del mecanismo de oscilación del OSA.

Al momento no existe una clara evidencia de un sustrato anatómico como OSA. Este primer experimento aporta información acerca del papel diferencial de las dos regiones del núcleo accumbens como dos componentes de un sistema distribuido: mientras que el Acc-Shell puede estar involucrado con los aspectos consumatorios y motivacionales de la ingestión, como una entrada al OSA, el Acc-Core puede estar involucrado con la expresión de la AA y tal vez como una salida del OSA.

7 EXPERIMENTO 2

7.1 Sincronización con un alimento apetitoso sin restricción de alimento

En el segundo experimento, continuando con la hipótesis de la importancia de los aspectos reforzantes del alimento en la sincronización, se determinó si un alimento apetitoso, sin una privación de alimento como en la sincronización a HRA, puede sincronizar la AA, las concentraciones de glucosa y AGL, y además que posibles estructuras están participando con este paradigma de sincronización, y si estas estructuras o sus respuestas son diferentes a la de un paradigma de sincronización a HRA. Para esto se plantearon las siguientes hipótesis y objetivos:

7.1.1 Hipótesis específicas

- La sincronización con un alimento altamente apetitoso es suficiente para generar AA en ratas sin privación de alimento regular.
- Por la ausencia de un estado catabólico, en los animales sincronizados a un alimento apetitoso, las concentraciones de glucosa así como de ácidos grasos libres no muestran sincronización. Sin embargo, por el alto contenido calórico del alimento, ambos metabolitos muestran diferencia en cuanto las concentraciones con respecto a las que se observan en animales sincronizados a HRA.
- La actividad celular de estructuras centrales de relevancia motivacional, como el núcleo accumbens, la corteza prefrontal y la amígdala se sincronizan a la hora de acceso al alimento apetitoso.
- La persistencia del patrón de actividad celular (c-Fos) sincronizado, después de interrumpir la sincronización, indica el papel de dicha estructura (ya sea a las estructuras del sistema límbico o del hipotálamo) como posible oscilador circadiano.
- Por la ausencia de un estado catabólico, bajo la sincronización por un alimento apetitoso, los núcleos del hipotálamo (lateral, ventromedial, dorsomedial, paraventricular) muestran patrones temporales distintos a los observados en la sincronización a HRA.

7.1.2 Objetivos específicos

- Evaluar si la sincronización con un alimento apetitoso (chocolate) en animales sin privación de alimento puede generar AA.
- Evaluar la sincronización de los niveles de glucosa y ácidos grasos libres en plasma con un alimento apetitoso y si esos difieren de las concentraciones de animales sincronizados a HRA.
- Determinar por medio de la expresión de la proteína c-Fos, si estructuras principalmente del sistema límbico como el núcleo accumbens, la amígdala y la corteza prefrontal se sincronizan al alimento apetitoso.
- Determinar si existe una persistencia del patrón de actividad celular (c-Fos) después de interrumpir la sincronización en alguna de las estructuras centrales evaluadas.
- Determinar la respuesta celular (c-Fos) de núcleos del hipotálamo (núcleo lateral, ventromedial, dorsomedial y paraventricular) por la sincronización con un alimento apetitoso.

7.2 Diseño experimental

7.2.1 Registro conductual

Grupos: se utilizaron 16 ratas, las cuales fueron divididas en dos grupos: uno sincronizado a horarios restringidos de alimento (HRA; n=8) y el otro sincronizado a un alimento apetitoso sin restricción de alimento regular (SAA; n=8).

Todos los animales fueron puestos en cajas individuales de registro conductual. Los primeros 15 días, como línea base, los animales estuvieron en un ciclo luz-oscuridad 12-12 (700 am encendido de la luz; ZT0) y con libre acceso al alimento. Al final del día 15, ambos grupos fueron expuestos respectivamente a su condición experimental: para el grupo HRA, el acceso al alimento solamente fue de ZT-6 a ZT-8, mientras que en el grupo SAA, los animales recibieron a la mitad de su fase de luz (ZT-6) 5 g de un alimento altamente apetitoso (barra de chocolate; 10% proteínas, 51% carbohidratos, 34% grasa. Valor calórico total 550 kcal/100g), sin privación de alimento regular (Rodent laboratory chow 5001). La sincronización de ambos grupos fue por 3 semanas, y al finalizar la intensidad de la AA fue evaluada.

Para evaluar la persistencia de la AA, el grupo sincronizado a HRA permaneció por 3 días en condiciones de ayuno, mientras que el grupo SAA permaneció por 4 días en condiciones *ad libitum* de alimento regular. Después de la fase de evaluación de la persistencia, todos los animales estuvieron con libre acceso al alimento y permanecieron en registro conductual por 3 semanas más.

7.2.2 Análisis inmuohistoquímico y metabólico

Otro grupo de animales fue asignado a un grupo sincronizado a HRA (n=15) y otro SAA (n=15) para el análisis celular y de las variables metabólicas.

En el último día de sincronización, los animales fueron sacrificados en tres puntos temporales relacionados al acceso al alimento regular o apetitoso: antes de la AA (ZT-4), al momento de acceso del alimento y durante la AA (ZT-6) y después de la hora del alimento (ZT-8; n=5 animales por grupo y punto temporal).

Para evaluar la persistencia de los patrones metabólicos y de expresión de c-Fos sincronizados al alimento apetitoso, otro grupo de ratas fue sacrificado 4 días después de la interrupción de la sincronización (P-SAA; n=12) en los mismos puntos temporales que el grupo sincronizado (ZT-4, ZT-6 y ZT-8). Para este grupo, se utilizó como control un grupo de animales mantenido bajo condiciones *ad libitum* (AL; n=12) sin una previa sincronización al alimento apetitoso (n=4 por grupo y punto temporal).

7.3 Resultados

7.3.1 Sincronización de la actividad locomotora a un alimento apetitoso

En los primeros 20 días bajo condiciones *ad libitum*, todos los animales mostraron un claro ritmo diurno de su actividad (Figuras 17 A, B y 18 A, D). Durante la sincronización a HRA (Figura 17 A) o a una dieta apetitosa (Figura 17 B), todos los animales presentaron AA (Figuras 18 B, E). El análisis estadístico confirmó un efecto significativo de ambos protocolos de sincronización en la actividad locomotora (HRA, $F(47,329)=3.693;p<0.0001$; Dieta apetitosa, $F(47,329)=15.56;p<0.001$), y el análisis *post-hoc* indicó que la AA fue significativamente más intensa que la actividad diurna esperada. La locomoción durante la AA fue más intensa en los animales sincronizados a HRA que la de animales sincronizados al alimento apetitoso.

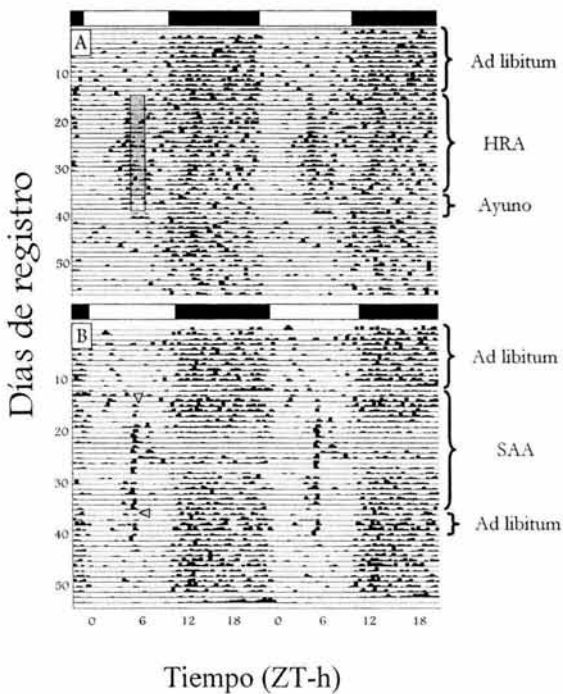


Figura 17. Actogramas representativos de la actividad locomotora de ratas sincronizadas a HRA (A) y a una dieta apetitosa (B). En los actogramas cada línea representa un día de registro. Las barras superiores representan el ciclo luz-oscuridad. La barra vertical en A indica el tiempo de acceso al alimento durante la sincronización a HRA (gris) y los días de ayuno (blanca). Los triángulos grises en B indican el comienzo y final de la sincronización al alimento apetitoso. Note la persistencia de la AA después de la interrupción del acceso a la dieta apetitosa por al menos 4 ciclos.

Durante los 3 días de ayuno, la persistencia de la AA en los animales sincronizados a HRA fue evidente ($F(47,329)=1.712;p<0.003$; Figuras 17A, 18C). Para los animales sincronizados a una dieta apetitosa la persistencia de la AA fue evidente en condiciones *ad libitum* por al menos 4 ciclos (Figura 8F; $F(47,329)=11.619;p<0.001$).

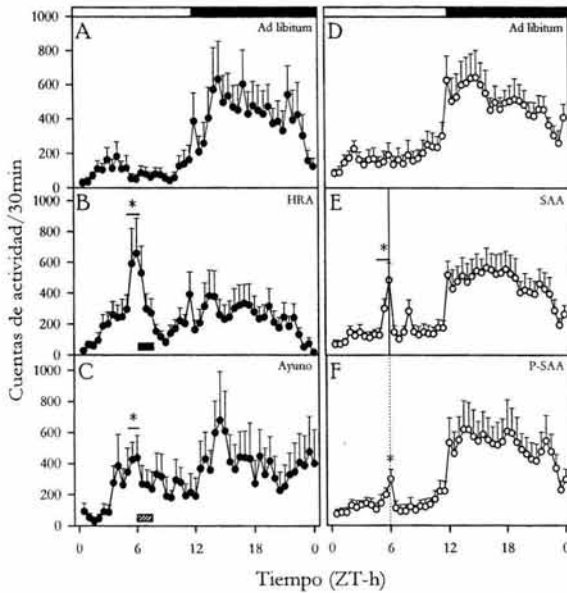


Figura 18. Perfiles de la actividad promedio (\pm SEM) de la locomoción de ratas sincronizadas a HRA (círculos blancos) y a un alimento apetitoso (SAA; círculos negros) durante condiciones *ad libitum* (A, D), durante la sincronización (B, E) y durante los 3 días en ayuno (C) o 4 días después de la interrupción de la SAA (P-SAA; F). La barra horizontal negra indica el intervalo de acceso al alimento y la línea vertical el tiempo de acceso al alimento apetitoso (B, E). La barra horizontal rayada y la línea punteada indican el momento en que se esperaba el alimento (C, F). * *post-hoc* Tukey $p < 0.05$.

7.3.2 Sincronización metabólica a un alimento apetitoso

En el grupo de animales sincronizados a HRA se observó una clara sincronización de las variables metabólicas. La glucosa mostró un incremento después de la ingestión de alimento, mientras que los AGL mostraron un incremento anticipando la llegada del alimento, como previamente ha sido descrito (Escobar y col. 1998; Martínez-Merlos y col. 2004). Por otro lado, en los animales SAA no se observó un patrón de sincronización ni de la glucosa ni de los AGL (Figura 19), sin embargo, se observó un incremento en las concentraciones de glucosa en los 3 puntos temporales. El ANOVA mostró una diferencia significativa entre el grupo sincronizado a HRA y el SAA ($F(1,27)=24.93; p < 0.0001$, glucosa; $F(1,27)=9.814; p < 0.0001$, AGL), así también para el factor tiempo ($F(2,27)=5.727; p < 0.0001$, glucosa; $F(2,27)=3.35; p < 0.05$, AGL).

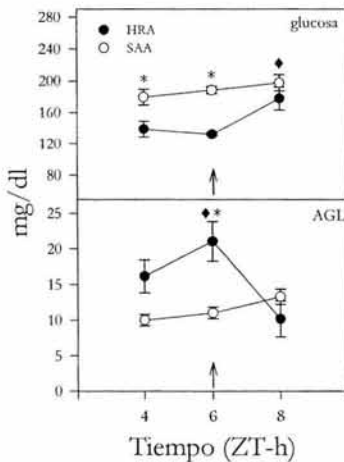


Figura 19. Concentraciones plasmáticas de glucosa y ácidos grasos libres (AGL) durante la sincronización a HRA (círculos negros) o SAA (círculos blancos). Las flechas indican el momento de acceso al alimento. * *post-hoc* Tukey $p < 0.05$ entre grupos, ♦ *post-hoc* Tukey $p < 0.05$ entre puntos temporales para el grupo de animales sincronizados a HRA.

7.3.3 Expresión de c-Fos durante la sincronización a HRA o a un alimento apetitoso

Hipotálamo

En los núcleos DMH, LH y PVN del hipotálamo, los animales sincronizados a HRA mostraron un mayor incremento en la expresión de c-Fos en comparación con los animales sincronizados a una dieta apetitosa (Figura 20). El incremento se presentó en el núcleo DMH y LH en las 3 fases evaluadas, mientras que en los animales con un alimento apetitoso no se observó ningún cambio temporal asociado a la hora del alimento. Para el grupo sincronizado por HRA en PVN el incremento en c-Fos fue después de la alimentación, en ZT-8, pero no para el grupo SAA (Figura 20).

Por el contrario, en VMH no se observaron fluctuaciones en la expresión de c-Fos asociadas al alimento en el grupo sincronizado por HRA, como ya se ha descrito previamente (Angeles-Castellanos y col. 2004), mientras que en los animales sincronizados a la comida apetitosa se observó un incremento de c-Fos anticipando la hora de llegada del alimento (Figura 20). Para los datos observados en DMH y PVN, el análisis estadístico indicó diferencias significativas en los factores grupos, tiempo y la interacción de estos. Para el LH hubo una diferencia en el factor grupo, mientras que para el VMH se observó una diferencia significativa en el factor tiempo y la interacción de los factores tiempo y grupo (Tabla 3).

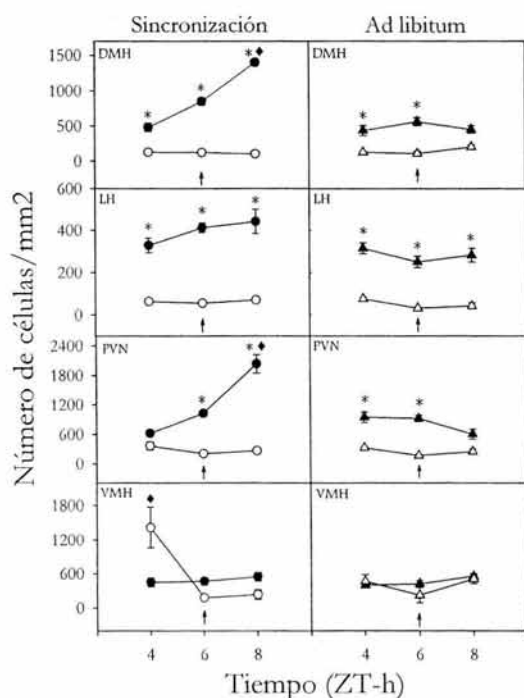


Figura 20. Las gráficas del panel izquierdo muestran el número de células inmunopositivas a c-Fos en el núcleo dorsomedial (DMH), lateral (LH), paraventricular (PVN) y ventromedial (VMH) del hipotálamo de animales sincronizados a HRA (●) y a un alimento apetitoso (○). El panel de la derecha muestra la expresión de c-Fos en animales en condiciones *ad libitum* posterior a la sincronización con un alimento apetitoso (▲) y *ad libitum* posterior a la sincronización con un alimento apetitoso (△). Las flechas indican el tiempo de acceso al alimento. * *post-hoc* Tukey $p < 0.05$ entre grupos, ♦ *post-hoc* Tukey $p < 0.05$ entre puntos temporales para el grupo sincronizado a HRA en DMH Y PVN y para el sincronizado a una dieta apetitosa en VMH.

Después de interrumpir la sincronización con la dieta apetitosa, se observó un decremento del número de células inmunopositivas a c-Fos en estos animales en comparación con animales control bajo condiciones *ad libitum* (Figura 20). El ANOVA mostró diferencias significativas en el factor grupo para el DMH, LH y PVN, y en el factor tiempo para el VMH (Tabla 3).

En el NSQ no se observó una sincronización de la expresión de c-Fos ni en los animales sincronizados a HRA ni sincronizados por una dieta apetitosa, sin embargo, se observaron valores altos en las tres fases temporales de este último grupo. Una diferencia significativa entre grupos fue observada. Al finalizar la sincronización de la dieta apetitosa, no se observaron cambios en este grupo ni en su grupo control (*ad libitum*; Figura 21; Tabla 3).

Tabla 3. Valores de F y P obtenidos con un ANOVA de dos vías para medidas independientes para el número de células inmunoreactivas a c-Fos en el hipotálamo entre los animales sincronizados a HRA vs SAA y entre animales en condiciones *ad libitum* (AL) vs *ad libitum* después de interrumpir la sincronización con alimento apetitoso (P-SAA).

NÚCLEO/CONDICIÓN	GRUPO		TIEMPO		GRUPO X TIEMPO	
	F(1,27)	P<	F(2,27)	P<	F(2,27)	P<
HRA vs SAA						
DMH	240.11	0.0001	26.73	0.0001	29.74	0.0001
LH	150.57	0.0001	1.94	NS	1.64	NS
PVN	128.59	0.0001	21.22	0.0001	25.00	0.0001
VMH	1.02	NS	11.23	0.0002	11.76	0.0002
SCN	19.10	0.0002	3.10	NS	1.14	NS
AL vs P-SAA	F(1,23)	P<	F(2,23)	P<	F(2,23)	P<
DMH	42.28	0.0001	.182	NS	1.56	NS
LH	93.52	0.0001	1.266	NS	.10	NS
PVN	65.43	0.0001	2.398	NS	2.50	NS
VMH	1.04	NS	3.469	0.04	1.76	NS
SCN	4.67	0.04	7.452	0.003	.94	NS

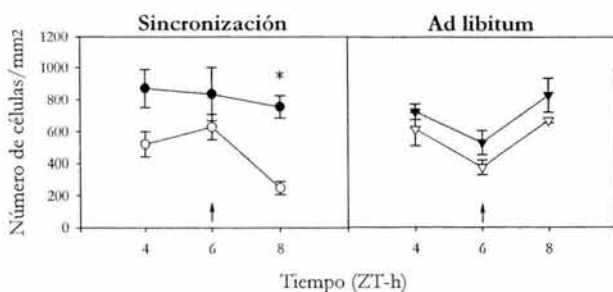


Figura 21. (Panel izquierdo) Número de células expresando c-Fos en el NSQ de ratas sincronizadas a HRA (●) y SAA (○). (Panel derecho) expresión de la proteína c-Fos en animales bajo condiciones *ad libitum* (▼) y *ad libitum* después de la sincronización a un alimento apetitoso (▽). Las flechas indican el momento de acceso al alimento.* *post-hoc* Tukey $p < 0.05$ entre grupos.

En las estructuras del sistema límbico (Acc-Core, Acc-Shell, Amígdala y corteza prefrontal), el número de células inmunoreactivas a c-Fos fue mayor en el grupo de animales SAA que en el grupo sincronizado a HRA. En el grupo SAA se observó una expresión máxima de c-Fos anticipando la llegada del alimento en ZT-4 y ZT-6 (Figuras 22-23).

Durante el periodo de persistencia, después de la interrupción de la sincronización, se observó un patrón diferente de expresión de c-Fos entre el grupo SAA y el grupo sincronizado a HRA (Figura 22). En todos los núcleos evaluados (Acc-Core, Acc-Shell, CeA y PFC) en ZT-4 se observó un incremento significativo de la expresión de c-Fos en el grupo de animales SAA anticipando la llegada subjetiva del alimento apetitoso. El ANOVA indicó efectos significativos en el factor grupo, tiempo y la interacción de ambos factores (Tabla 4).

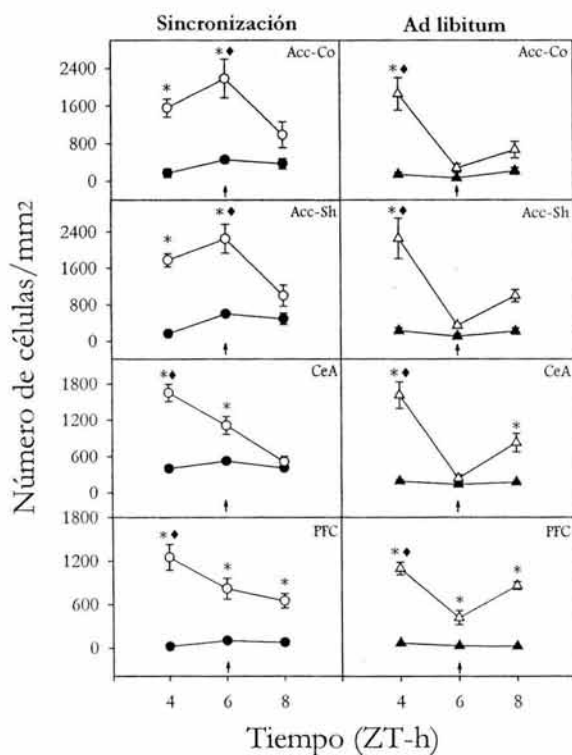


Figura 22. Las gráficas del panel izquierdo muestran el número de células inmunopositivas a c-Fos en el núcleo accumbens shell (Acc-Shell), core (Acc-Core), central de la amígdala (CeA) y corteza prefrontal (PFC) de animales sincronizados a HRA (●) y SAA (○). El panel de la derecha muestra el grupo de animales *ad libitum* (▲) y *ad libitum* con una sincronización previa a un alimento apetitoso (△). Las flechas indican el tiempo de acceso al alimento o esperado (derecha). * *post-hoc* Tukey $p < 0.05$ entre grupos, ♦ *post-hoc* Tukey $p < 0.05$ entre puntos temporales.

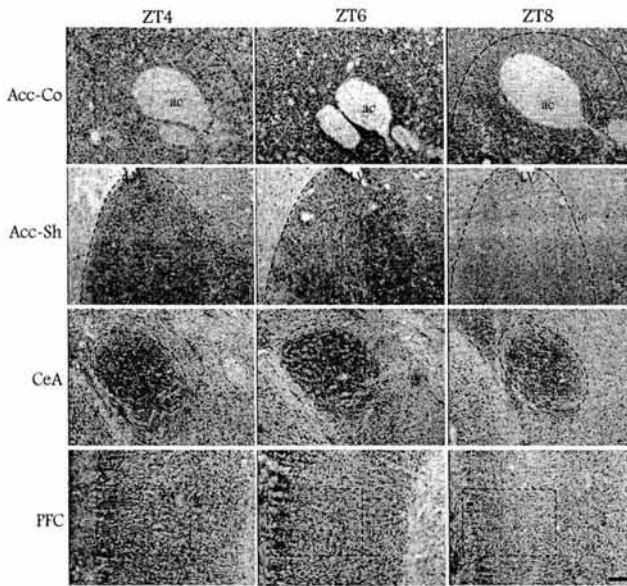


Figura 23. Microfotografías representativas de la expresión de la proteína c-Fos en Acc-Core, Acc-Shell, CeA y PFC de animales sincronizados a un alimento apetitoso en los 3 puntos temporales evaluados. Las líneas punteadas definen el área correspondiente. La barra horizontal representa una escala de 120 μm . ac; comisura anterior, LV; ventrículo lateral.

Tabla 4. Valores de F y P obtenidos con un ANOVA de dos vías para medidas independientes para el número de células inmunoreactivas a c-Fos en el sistema límbico entre los animales sincronizados a HRA vs SAA y entre animales en condiciones *ad libitum* (AL) vs *ad libitum* con una previa sincronización con alimento apetitoso (P-SAA).

NÚCLEO/CONDICIÓN	GRUPO		TIEMPO		GRUPO X TIEMPO	
	F(1,27)	P<	F(2,27)	P<	F(2,27)	P<
HRA vs SAA						
Acc-Co	42.15	0.0001	4.09	0.03	3.03	NS
Acc-Sh	69.57	0.0001	2.84	NS	10.88	0.0004
CeA	72.87	0.0001	18.87	0.0001	19.27	0.0001
PFC	125.30	0.0001	4.14	0.02	7.34	0.002
AL vs P-SAA						
Acc-Co	37.18	0.0001	14.42	0.001	13.04	0.0002
Acc-Sh	46.48	0.0001	16.93	0.0001	13.35	0.0002
CeA	79.59	0.0001	27.61	0.0001	23.58	0.0001
PFC	381.52	0.0001	29.36	0.0001	27.02	0.0001

7.4 Discusión

7.4.1 Sincronización de la AA

En el segundo experimento, observamos que la SAA puede generar AA y que además ésta persiste en la ausencia del alimento apetitoso al menos por 4 ciclos, sugiriendo que está implicado un mecanismo de oscilación circadiano. Las concentraciones de glucosa y AGL no se sincronizaron por el alimento apetitoso como sucede por la sincronización a HRA. Además, durante la SAA, estructuras del sistema límbico, pero no del hipotálamo, mostraron un evidente incremento en la expresión de la proteína c-Fos anticipando el acceso al alimento. También se observó persistencia de esta activación celular después de la interrupción de la sincronización, indicando que estas estructuras límbicas están involucradas con este proceso de sincronización.

Nuestros resultados, como en previos estudios (Mistlberger y Rusak, 1987, Abe y Rusak, 1992), muestran que un alimento apetitoso, sin restricción de alimento regular, es capaz de producir AA en ratas. Sin embargo, la intensidad de la AA es menor que la que se observa en animales sincronizados a HRA. Esta diferencia sugiere que la intensidad de la AA en ratas sincronizadas a HRA se debe, además del estado motivacional, a las condiciones metabólicas críticas generadas por la alternancia de largos intervalos de ayuno y cortos intervalos de alimentación en los que se encuentran los animales, que generan diversos cambios metabólicos y fisiológicos y que, aunados a los motivacionales, incrementan la intensidad de la AA (Escobar y col. 1998; Mendoza y col. 2003; Martínez-Merlos y col. 2004).

A pesar de que se observó sincronización de la actividad locomotora, las concentraciones de glucosa y AGL no mostraron sincronización al alimento apetitoso, lo que sugiere que un estado catabólico por la privación de alimento no es necesario para generar AA, y que las propiedades reforzantes del alimento pueden ser suficientes como señal sincronizadora en la expresión de la AA. Estos resultados se apoyan de estudios previos en los cuales se demuestra que el valor nutricional y reforzante del alimento son factores determinantes para la sincronización de la AA (Abe y Rusak, 1992). Sin embargo, en los estudios previos cuando la cantidad del alimento disminuía a solo 4 gramos, no todos los animales mostraban AA, lo que llevó a los autores a sugerir que tanto lo apetitoso del alimento como el tamaño del mismo son relevantes para la sincronización (Mistlberger y Rusak, 1987). En nuestro estudio utilizamos 5 gramos de chocolate como alimento apetitoso y observamos AA y persistencia en todos los animales evaluados. Esto indica que además del valor calórico, el valor reforzante del alimento apetitoso es también determinante para la sincronización.

7.4.2 Sincronización de la glucosa y AGL

Por otro lado, debido a que la AA se sincronizó por al alimento apetitoso, como sucede por los HRA, pero no se sincronizaron las variables metabólicas, sugerimos que los mecanismos que subyacen la sincronización por HRA y la sincronización con una dieta apetitosa son diferentes, ya que en ratas con HRA hay una sincronización conductual y metabólica, pero en los animales SAA solamente se presenta una sincronización conductual. Estos datos apoyan estudios previos que muestran diferentes respuestas en parámetros metabólicos y en la expresión de genes reloj en el sistema digestivo con respecto a las respuestas conductuales de animales sometidos a HRA, sugiriendo que en la sincronización por alimento están implicados dos procesos: un proceso central (sincronización conductual) y un proceso periférico (sincronización metabólica) (Davidson y col.

2003; Martínez-Merlos y col. 2004). Para la sincronización con un alimento apetitoso posiblemente se encuentra principalmente involucrado el mecanismo central.

7.4.3 Sincronización de la expresión de c-Fos en el hipotálamo y el sistema límbico

En la segunda fase de este experimento, se observó la sincronización por el alimento apetitoso de c-Fos en estructuras específicas. En un estudio previo de nuestro grupo, bajo condiciones de ayuno en animales previamente sincronizados a HRA, núcleos del hipotálamo como el DMH y el LH mostraron una clara persistencia de la expresión de c-Fos a la misma hora que durante la sincronización, indicando que estos núcleos pueden ser parte del maquinaria del OSA. Además, el incremento de c-Fos se presentó también en el PVN después de la alimentación, indicando que éste puede ser una vía de entrada a nivel central hacia el OSA (Angeles-Castellanos y col. 2004). En el presente estudio, encontramos resultados similares en el hipotálamo de animales sincronizados a HRA, lo que apoya la idea de que por la relevancia del hipotálamo en la ingestión de alimento, la inmunoreactividad de c-Fos en esta estructura es determinante para la sincronización (Angeles-Castellanos y col. 2004).

Por otro lado, en este estudio la expresión de c-Fos en el hipotálamo no mostró cambios en animales SAA y sin privación de alimento regular. Esto sugiere que bajo condiciones de HRA la alternancia catabolismo/anabolismo involucra núcleos hipotalámicos determinantes en el balance energético. Debido a que los animales SAA no se encontraban en un estado catabólico, el patrón de expresión de c-Fos no cambió en el hipotálamo como en los animales sincronizados a HRA.

En el NSQ tampoco se mostró un cambio en la expresión de c-Fos asociado a la hora de acceso al alimento tanto en animales sincronizados a HRA como en animales SAA. Estos resultados son consistentes con resultados previos de nuestro grupo y de otros grupos que muestran que no hay sincronización por alimento de la expresión de c-Fos ni de genes reloj en el NSQ de animales bajo un ciclo luz-oscuridad (Damiola y col. 2000; Hara y col. 2001; Wakamatsu y col. 2001; Angeles-Castellanos y col. 2004). Debido a que la competencia entre sincronizadores (ciclo luz-oscuridad vs. restricción de alimento) y la fuerza del ciclo luz-oscuridad como principal sincronizador del NSQ son características relevantes para la sincronización bajo este paradigma (Challet y col. 1998), los HRA o la sincronización con un alimento apetitoso no generan un efecto sobre la expresión de c-Fos en el NSQ.

Como pudimos observar en el primer experimento de este estudio, la expresión de c-Fos muestra un incremento en ambas regiones del núcleo accumbens en los animales sincronizados a HRA, además, un estudio previo mostró que la máxima expresión de genes reloj en la corteza y el hipocampo está en fase con la AA de ratones sincronizados a HRA (Wakamatsu y col. 2001), sugiriendo que estas estructuras (por la relevancia reforzante del alimento) también pueden estar implicadas en la sincronización a HRA.

Interesantemente la expresión de c-Fos fue mayor en estructuras del sistema límbico de los animales SAA. Esta respuesta fue mayor que la de los animales sincronizados a HRA. La activación en el Acc-Shell, Acc-Core, CeA y PFC fue evidente antes y en el momento de acceso al alimento apetitoso (ZT-4, ZT-6), indicando que estos núcleos subyacen la manifestación de la AA.

La activación celular en el núcleo accumbens y la corteza puede ser asociada con los estados positivos de reforzamiento generados por el alimento apetitoso, posiblemente debido a los cambios en la liberación de dopamina (Bassaero y Di Chiara, 1999b). Debido a que en la corteza la expresión circadiana de genes reloj cambia por la sincronización a HRA, no podemos descartar el papel de un mecanismo motivacional generado por la restricción de alimento, sin embargo, debido a que la expresión de c-Fos en la corteza de animales SAA fue mayor que la de los animales sincronizados a HRA, sugerimos que ante un alimento apetitoso está principalmente implicado un mecanismo de reforzamiento o que subyace el aspecto hedónico del alimento. Por otro lado, si la corteza es un oscilador circadiano (Wakamatsu y col. 2001), entonces éste puede ser sincronizado por dos paradigmas diferentes de alimentación, con HRA y con alimento apetitoso, en ambos está implicado un mecanismo motivacional.

En la CeA, se observó también un incremento de c-Fos por la sincronización al alimento apetitoso, diferente al que se presenta por la sincronización a HRA. La CeA es una estructura relevante para los procesos reforzantes y motivacionales generados por el alimento (Giraudo y col. 1998; Berridge, 2003). Así mismo, la CeA es considerada como parte de las estructuras relacionadas con los aspectos límbicos del sabor y por la relación anatómica-funcional con el hipotálamo, determinante para el control de la ingestión de alimento (Petrovich y col. 2002). En este estudio las ratas SAA mostraron una elevada activación de c-Fos en la CeA, lo cual sugiere que está implicada una respuesta generada por el sabor reforzante del chocolate. En otros estudios, se ha demostrado que el alimento genera una activación de c-Fos en la CeA, y que además la lesión de esta región produce una disminución en la preferencia por soluciones de sacarosa en ratas (Touzani y col. 1997; Kim y col. 2001).

Observamos una persistencia, (al menos en ZT-4) de oscilaciones autosostenidas en la expresión de c-Fos en ambas regiones del núcleo accumbens (shell y core), en la PFC y en la CeA en el día 4 después de suspender la sincronización con el alimento apetitoso, la cual se presentó en fase con la persistencia conductual de los animales en la primera fase de este experimento, indicando una posible relación entre la persistencia de la AA y la activación celular de estos núcleos.

Todos estos resultados sugieren que algunos núcleos del sistema límbico tienen la capacidad de expresar oscilaciones circadianas y persistencia de estas oscilaciones por una sincronización con un alimento apetitoso sin restricción de alimento regular, y que la AA puede ser una de las salidas de estos osciladores.

Con estos datos, sugerimos que el papel del sistema límbico es determinante para la activación conductual durante la SAA o inclusive a HRA. Debido a que previos trabajos sugieren la existencia de diversas estructuras en el SNC que tienen características funcionales de osciladores circadianos (Masubuchi y col. 2000; Amir y col. 2004), los presentes resultados indican que las estructuras del sistema límbico evaluadas en este estudio, como posibles osciladores circadianos, pueden ser sincronizados por un alimento apetitoso. Además, otros estudios han reportado que el significado motivacional de otro tipo de estímulos, como la estimulación cerebral o la preferencia de un lugar, son sincronizadores potentes que pueden producir AA en hamsters (Cain y col. 2004a, 2004b). Nuestros experimentos presentan nuevos datos que apoyan la hipótesis de que la conducta y la actividad de ciertas estructuras del sistema límbico pueden ser sincronizadas con un alimento apetitoso, sin restricción de alimento regular, y que este mecanismo es diferente del mecanismo que subyace la sincronización a HRA.

Ya que no existe una evidencia clara de la localización anatómica de un OSA (Mistlberger 1994; Stephan, 2002), y debido a que en la sincronización a HRA y a un alimento apetitoso no está involucrada sólo una estructura en el sistema nervioso central, sugerimos que en la sincronización por alimento se encuentra implicado un sistema multioscilariorio.

En conclusión, el presente estudio muestra que, contrario a los HRA, un alimento apetitoso puede sincronizar la AA, pero no sincroniza algunos parámetros metabólicos, y que esta sincronización puede depender de estructuras específicas a nivel central, como el núcleo accumbens, la amígdala y la corteza prefrontal.

8 EXPERIMENTO 3

8.1 Sincronización del NSQ por un alimento apetitoso sin restricción de alimento

En el tercer experimento, bajo el mismo paradigma de SAA, se determinó si un alimento apetitoso, a diferencia de la sincronización a HRA, en animales bajo condiciones de oscuridad constante, puede sincronizar al NSQ. Para esto se plantearon las siguientes hipótesis y objetivos:

8.1.1 Hipótesis específicas

-Un alimento apetitoso es un sincronizador potente para el NSQ en ausencia de un ciclo luz-oscuridad y sin privación de alimento. Dicha sincronización se puede observar tanto en salidas conductuales (actividad locomotora) y fisiológicas (glucosa) del reloj, como en la actividad celular del núcleo (c-Fos, PER-1) como parte de la maquinaria endógena del reloj.

-Por la relevancia de estructuras talámicas, como el PVT y la HIL, en la sincronización no luminosa del NSQ y por su relación con estructuras del sistema límbico, la actividad de dichas estructuras muestra un patrón sincronizado a la hora de acceso al alimento apetitoso.

8.1.2 Objetivos específicos

-Determinar si un alimento apetitoso puede sincronizar el ritmo circadiano de actividad locomotora, de glucosa y ácidos grasos en plasma, así como el ritmo de expresión de las proteínas c-Fos y PER-1 en el núcleo supraquiasmático en animales bajo condiciones de oscuridad constante (sin competencia entre sincronizadores) y sin privación de alimento.

-Evaluar si la actividad celular (c-Fos, PER-1) del núcleo paraventricular (PVT) y la hoja lateral intergeniculada lateral (HIL) del tálamo se sincroniza a la hora de acceso al alimento apetitoso.

8.2 Diseño experimental

8.2.1 Sincronización conductual

Grupos: 24 ratas fueron asignadas aleatoriamente a uno de tres grupos; un grupo control, el cual fue sincronizado a HRA (n=8) por 3 semanas; otro sincronizado a un alimento apetitoso (SAA) por 5 semanas (n=8), y un tercer grupo como control para evaluar un posible efecto de estrés o

alertamiento en los animales, por la manipulación de las cajas al momento de dar el alimento regular o el apetitoso, en el que la manipulación consistió solamente en mover la tapa de la caja simulando la llegada del alimento ($n=8$), esta manipulación fue por 5 semanas. La sincronización a HRA y SAA, así como la manipulación conductual, se realizaron a las 1400 horas geográficas.

Todos los animales fueron expuestos 20 días como línea base (previo a la sincronización) en condiciones de oscuridad constante y bajo condiciones *ad libitum*. Durante todo el experimento los animales permanecieron en oscuridad constante con el fin de evitar una competencia de sincronizadores, entre el ciclo-luz oscuridad y el alimento (Challet, y col. 1998).

Al finalizar la sincronización, todos los animales continuaron en registro conductual, en condiciones de alimentación *ad libitum*, sin ningún tipo de manipulación y bajo condiciones de oscuridad constante por 3 semanas más.

8.2.2 Sincronización metabólica y de la expresión de c-Fos y PER-1

Para el análisis celular y metabólico, y por los resultados conductuales previamente obtenidos, solamente se utilizó un grupo sincronizado al alimento apetitoso (SAA). Los animales permanecieron en oscuridad constante por 20 días como línea base antes de iniciar la sincronización. Posteriormente los animales fueron sincronizados por 45 días (al igual que los animales en el análisis conductual) a 5 g del alimento apetitoso (chocolate; 10% proteínas, 51% carbohidratos, 34% grasa. Valor calórico total 550 kcal/100g).

En el último día de la sincronización, los animales fueron sacrificados en uno de 6 puntos temporales a lo largo de un ciclo de 24 horas ($n=4$ por punto temporal): ZT-0, ZT-4, ZT-8, ZT-12, ZT-16 y ZT-20. En este experimento debido a que los animales se encontraban en condiciones de oscuridad constante, ZT-0 fue designado como el momento de la llegada del alimento apetitoso. Se obtuvieron los cerebros para el análisis celular de c-Fos y PER-1, y las muestras de sangre para determinar las concentraciones de ácidos grasos libres y glucosa.

8.3 Resultados

8.3.1 Sincronización de la actividad locomotora en oscuridad constante a un alimento apetitoso vs un horario restringido de alimento

Los animales sincronizados a HRA mostraron un incremento de la actividad locomotora previo al acceso del alimento (AA). Además, fue evidente un claro patrón de actividad locomotora en libre corrimiento independientemente de si la sincronización por alimento coincidía con la fase de actividad o de reposo del animal, indicando que la actividad locomotora dependiente del NSQ no se sincronizó a los HRA. Esto coincide con resultados previos que han reportado que los HRA no sincronizan la actividad locomotora dependiente del NSQ (Mistlberger, 1994; Figura 24).

Por otro lado, en el grupo control, la simulación de sincronización por la manipulación de la tapa de la caja de registro tampoco mostró sincronización de la actividad locomotora, indicando que un posible efecto de estrés, o por la activación conductual del animal, no fue suficiente para sincronizar la conducta de los animales (Figura 25).

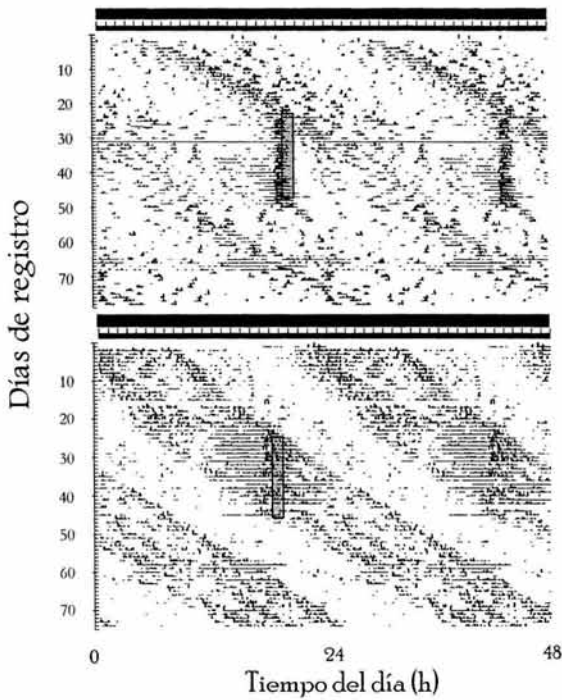


Figura 24. Actogramas representativos de la conducta de ingestión de agua de dos animales control sincronizados a HRA. La barra vertical gris, indica el tiempo y los días de sincronización. En el actograma superior, la sincronización coincidió con la fase de reposo del animal, mientras que en el actograma inferior la sincronización coincidió con la fase de actividad. Para ambos actogramas, existe una clara actividad de anticipación al alimento. Sin embargo, además de la AA, es evidente el componente de actividad en libre corrimiento, indicando que no existió sincronización del NSQ por los HRA.

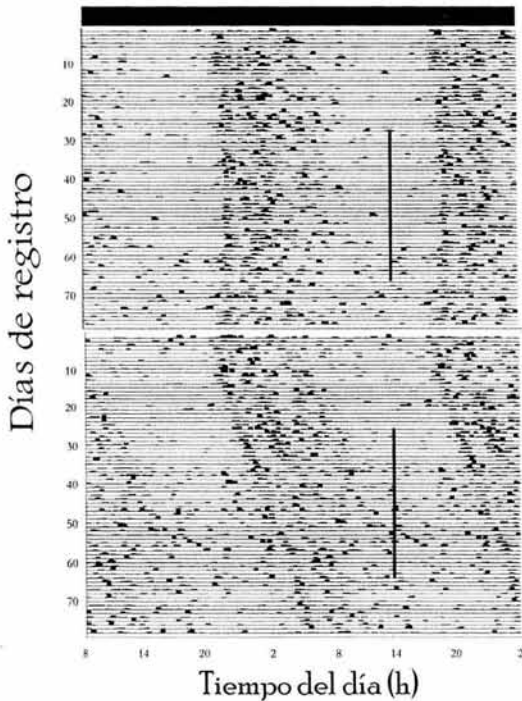


Figura 25. Actogramas representativos de la actividad locomotora de dos animales control en los que se simuló una sincronización con una simple manipulación de la tapa de la caja de registro. La hora y el número de días de dicha manipulación es indicado por la línea vertical negra. La presencia de los ritmos de actividad locomotora en libre corrimiento indican que la conducta no se modificó por la manipulación. La barra superior negra indica las condiciones de oscuridad constante en que se encontraban los animales.

Las ratas del grupo SAA mostraron muy pobre expresión de actividad de anticipación, pero en contraste mostraron una clara sincronización del componente de actividad en oscilación espontánea, ajustando el final de su fase de actividad con la llegada del alimento (Figura 26).

Dependiendo del periodo endógeno en libre corrimiento de cada rata, la sincronización se estableció en un corto plazo (periodos largos) o tardó más días (periodos cortos), por lo cual se observó una correlación entre el periodo endógeno y la velocidad de sincronización al alimento apetitoso ($t=4.73$, $p<0.003$; Figura 27). Una vez establecida dicha sincronización, el componente de actividad, dependiente del NSQ, se mantuvo con un periodo de 24 h (Figura 29). Después de finalizar la sincronización, se observó una persistencia de fase y periodo por más de 20 días, sugiriendo que el alimento apetitoso es un sincronizador potente para el NSQ (Figura 26).

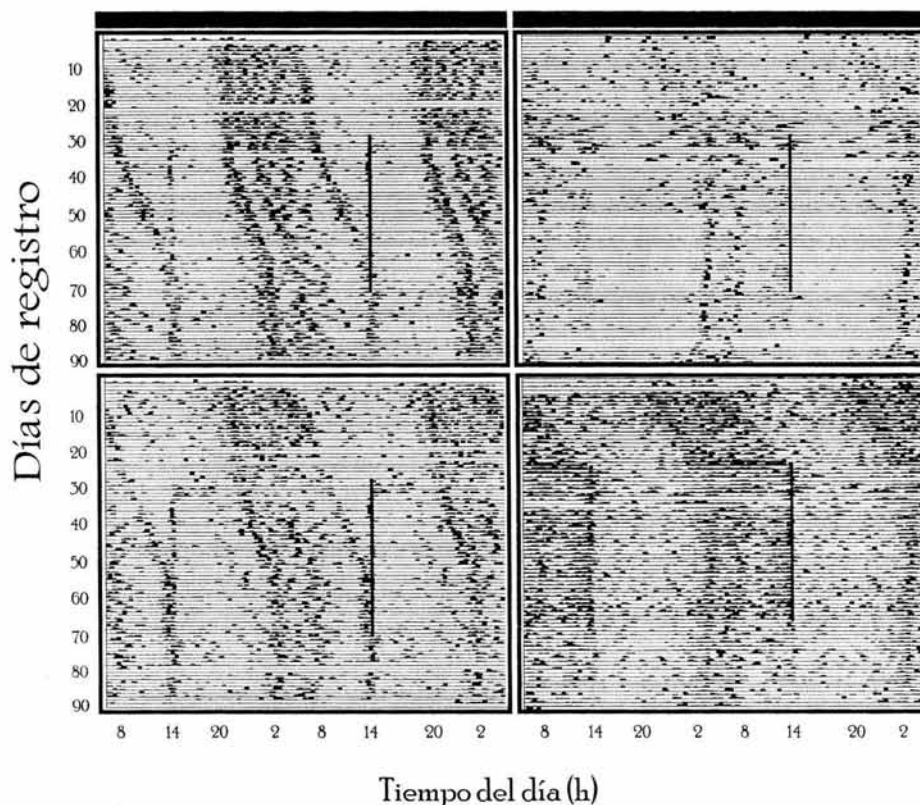


Figura 26. Actogramas representativos de la actividad locomotora de cuatro animales sincronizados a un alimento apetitoso. La hora y el número de días de sincronización del alimento apetitoso (SAA) es indicado por la línea vertical negra. En el panel de la izquierda se observan 2 animales que tardaron más días para establecer una relación de fase entre la actividad locomotora y la hora de llegada del alimento, mientras que en el panel derecho se muestran 2 animales que necesitaron menor número de días para sincronizarse.

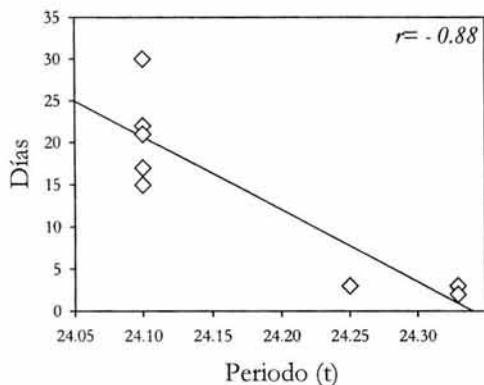


Figura 27. Correlación del periodo endógeno y el número de días para establecer una relación de fase entre la actividad locomotora y la llegada del alimento de las ratas sincronizadas a un alimento apetitoso. Cada rombo representa un animal. $t=4.73$, $p<0.003$.

Se determinó el periodograma por un método de χ^2 de las tres fases experimentales del registro conductual: antes de la sincronización, durante la sincronización y después de la sincronización. Los resultados indicaron que previo a la sincronización, los animales mostraban un periodo endógeno de 24.17 ± 0.03 , durante la sincronización el periodo fue 24.01 ± 0.01 , y al finalizar la sincronización de 23.97 ± 0.01 (Figura 28). El análisis estadístico indicó una diferencia significativa entre la fase *ad libitum* previa a la sincronización y la fase de sincronización y *ad libitum* posterior a la sincronización ($F(2,19)=16.127$; $p<0.0001$).

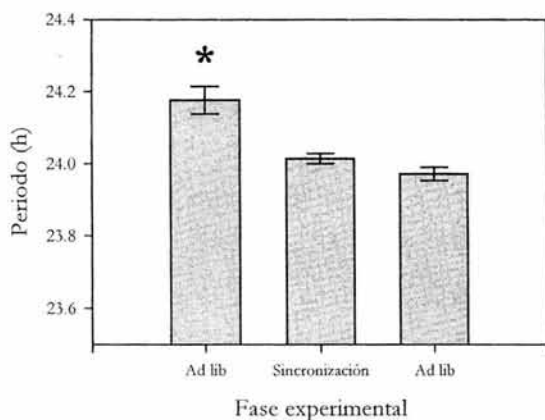


Figura 28. Periodo promedio de la actividad locomotora antes, durante y después de la sincronización a un alimento apetitoso (medias \pm SEM). **post-hoc* Tukey $p<0.05$.

8.3.2 Sincronización metabólica

En el análisis de la sincronización metabólica, se observó que las concentraciones de glucosa reflejaron un patrón diurno correspondiente al patrón de actividad-reposo observado, con un primer incremento antes del inicio de la noche subjetiva. Otro incremento se observó como respuesta a la ingestión de chocolate al inicio del día subjetivo (ZT-0) (Figura 29). El ANOVA mostró diferencias significativas entre los puntos temporales ($F(5,17)=9.069$; $p<0.0002$).

Por otro lado, las concentraciones de AGL mostraron un incremento máximo en ZT-4, 4 horas después de que los animales habían ingerido el alimento apetitoso (Figura 29), el cual fue estadísticamente significativo ($F(5,15)=4.204;p<0.013$). Sin embargo, las concentraciones de AGL se observaron después de la ingesta, y no anticipando la llegada del alimento como sucede en los animales sincronizados a HRA (Escobar y col. 1998), posiblemente debido a la ingestión del alimento apetitoso (con altos niveles de grasa).

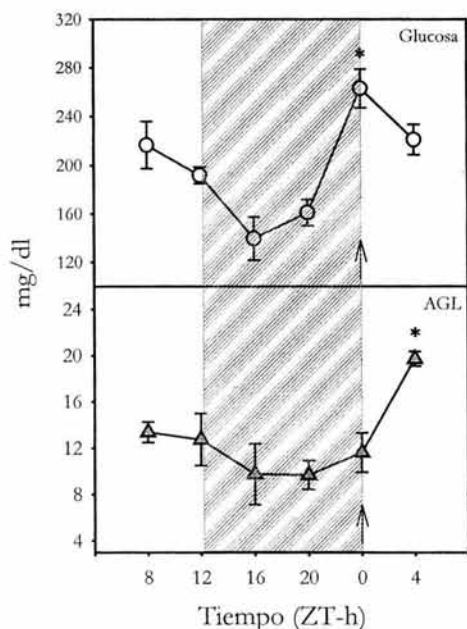


Figura 29. Concentraciones de glucosa (gráfica superior) y AGL (gráfica inferior) a lo largo de un ciclo de 24h de los animales sincronizados a un alimento apetitoso (medias \pm SEM). La flecha indica la llegada del alimento (ZT-0), y el área rayada representa el periodo de actividad de los animales, el cual fue determinado por los registros de actividad obtenidos de cada animal en los actogramas). **post-hoc* Tukey $p<0.05$.

8.3.3 Expresión de c-Fos y PER-1 en el NSQ

La expresión de c-Fos en el NSQ de las ratas sincronizadas al alimento apetitoso, mostró en ZT-0 un punto de mayor expresión de la proteína estadísticamente significativo ($F(5,18)=4.679;p<0.006$), anticipando el momento en que los animales recibían el alimento (Figura 30).

Por otro lado, en la expresión de la proteína PER-1 se observó un claro ritmo circadiano, en donde el mayor número de células expresando la proteína fue en ZT-8 y ZT-12, al inicio de la actividad del animal ($F(5,18)=17.511;p<0.00001$), mientras que en ZT-0, hora en que los animales recibían el alimento apetitoso, se observaron niveles bajos de la expresión de PER-1 (Figura 30).

La expresión máxima de la proteína PER-1 en animales sincronizados a un ciclo luz-oscuridad 12:12 es entre ZT-10 y ZT-12 al inicio de la fase de actividad y ésta decae al final de actividad (Reppert y Weaver, 2001; Hastings y col. 2003). El patrón temporal observado en el grupo sincronizado con alimento apetitoso coincide con esta dinámica previamente reportada.

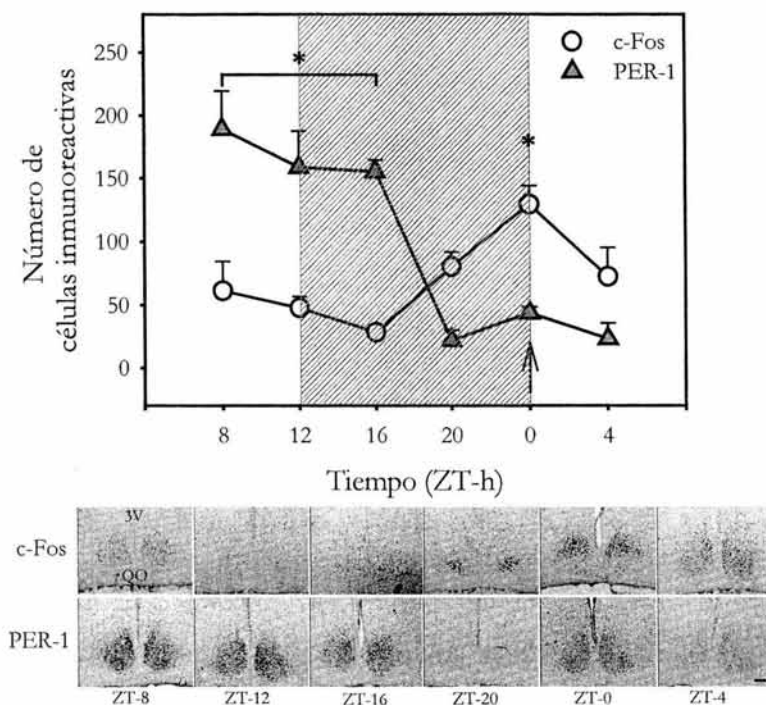


Figura 30. Número de células (*Superior*) y microfotografías (*Inferior*) representativas de la expresión de la proteína c-Fos y PER-1 en el NSQ de animales sincronizados al alimento apetitoso. En la gráfica, la flecha indica la hora de llegada del alimento (ZT-0= hora de acceso al alimento apetitoso). La barra horizontal en las fotografías representa una escala de 120 μ m. El área rayada en la gráfica representa el periodo de actividad de los animales. 3V, tercer ventrículo; QO, quiasma óptico. *post-hoc Tukey $p < 0.05$.

8.3.4 Expresión de c-Fos y PER-1 en el PVT y HIL

El análisis de la expresión de c-Fos y PER-1 en el PVT y la HIL, como posibles estructuras involucradas con la vía anatómica por la cual el alimento apetitoso tuviera acceso al NSQ, mostró que en PVT la expresión máxima de c-Fos y PER-1 fue en ZT-0, justo en el momento previo a que el animal recibiera el alimento apetitoso (Figura 31). El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre los diferentes puntos temporales (c-Fos, $F(5,18)=3.492; p < 0.022$; PER-1, $F(5,18)=4.758; p < 0.006$).

En la HIL se mostró un incremento en ZT-16, el patrón de c-Fos observado indica que la actividad de este núcleo no coincide con el patrón temporal de la sincronización por el alimento apetitoso el cual pudiera deberse al periodo de actividad en el que se encontraba el animal, sin embargo, al momento de la llegada del alimento y desde 4 horas antes (ZT-20) se observó una disminución del número de células positivas a c-Fos (Figura 32). A pesar del claro incremento en el número de células expresando c-Fos en ZT-20, el ANOVA no mostró diferencias significativas entre los puntos temporales evaluados ($F(5,16)=2.583; NS$). Debido a que los cortes procesados con el anticuerpo PER-1 no mostraron inmunoreactividad en la HIL, sólo se realizó el conteo para c-Fos.

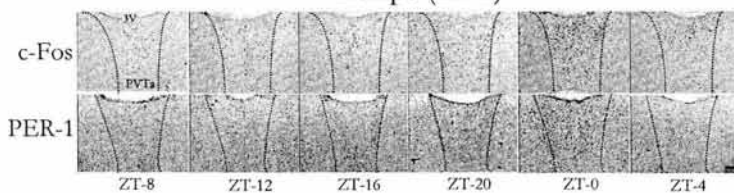
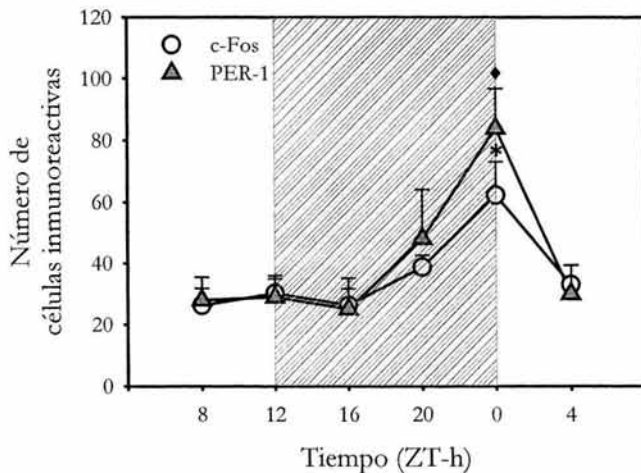


Figura 31. Número de células (*Superior*) y microfotografías (*Inferior*) representativas de la expresión de la proteína c-Fos y PER-1 en el PVT de animales sincronizados a la dieta apetitosa. En la gráfica, la flecha indica la hora de llegada del alimento (ZT-0). Las líneas punteadas delimitan el área anterior del núcleo PVT (PVTa). Ver detalles figura 30. ♦ **post-hoc* Tukey $p < 0.05$ Fos y PER-1 respectivamente.

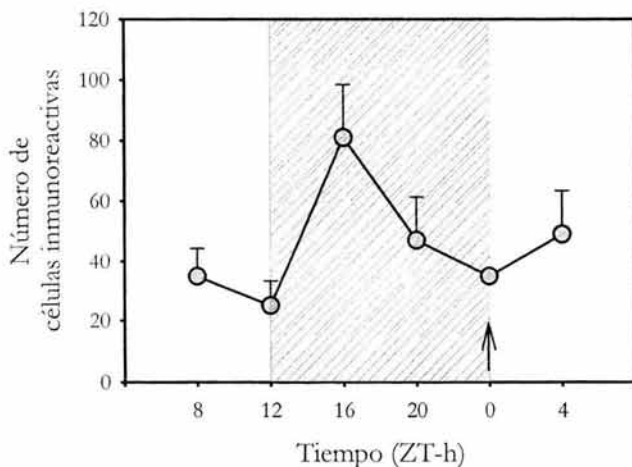
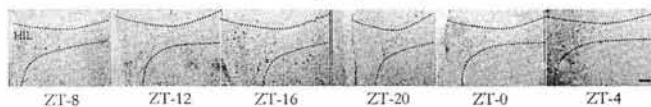


Figura 32. Número de células y microfotografías representativas de la expresión de la proteína c-Fos en la HIL de animales sincronizados al alimento apetitivo. Ver detalles figura 30.



8.4 DISCUSIÓN

8.4.1 Un alimento apetitoso sincroniza al NSQ

En el tercer y último experimento se pudo observar que un alimento apetitoso, sin privación de alimento, puede sincronizar la actividad celular del NSQ (c-Fos y PER-1) así como dos de sus principales salidas, la actividad locomotora y las concentraciones de glucosa. Además de que la potencia del alimento apetitoso se mostró al finalizar la sincronización con un control de periodo y fase de la actividad locomotora. Por otro lado, por los resultados celulares de la actividad de c-Fos principalmente en el PVT, una de las principales aferencias hacia el NSQ, dicha estructura puede ser la vía por la cual el alimento apetitoso tenga acceso como sincronizador hacia el NSQ.

Bajo condiciones de oscuridad constante, el ritmo de actividad locomotora, en oscilación espontánea, se sincronizó a la ingesta diaria de un alimento apetitoso, dicha sincronización se estableció cuando la hora de acceso al alimento coincidió con el final de actividad de los animales, indicando una relación de fase entre el sincronizador (alimento apetitoso) y una fase específica (final de la actividad) del ciclo circadiano de actividad locomotora.

8.4.2 Sincronización conductual

Nuestros resultados son apoyados por un trabajo previo en el que la actividad locomotora en hamsters se sincronizó con la combinación de un alimento apetitoso y restricción de alimento (Abe y Rusak, 1992). La sincronización de la actividad locomotora tanto del trabajo previo como en este estudio se observó en animales bajo condiciones de oscuridad constante, lo que sugiere que el eliminar la competencia entre sincronizadores, que se puede dar si los animales se encuentran sincronizados a un ciclo luz-oscuridad y a horarios de alimentación, es determinante para que el alimento pueda ejercer una potencia como sincronizador (Challet y col. 1998).

Esto se ha demostrado en otros estudios en los que animales sincronizados a un ciclo luz oscuridad y bajo condiciones de restricción de alimento, la actividad locomotora no se sincroniza al alimento, solamente se observa una alteración en el ángulo de fase de la actividad locomotora con el ciclo luz-oscuridad y un alteración en la expresión de genes reloj, así como su respuesta tanto conductual como molecular a un pulso de luz (Challet y col. 1998, 2003; Mendoza y col. datos no publicados).

Estos resultados apoyan otro tipo de estudios de sincronización no luminosa, en los cuales se ha observado la sincronización de la actividad locomotora cuando se establece una relación de fase entre la administración diaria de melatonina y el acceso a 3 horas a una rueda de actividad con el final de actividad en roedores diurnos y en primates (Hut y col. 1999; Glass y col. 2001; Slotten y col. 2002).

Otro estudio previo mostró que ratones sincronizados a 6 horas de libre acceso al alimento y bajo condiciones de oscuridad constante muestran sincronización del ritmo de actividad locomotora y de la expresión de la proteína PER-2 (Castillo y col. 2004). En este estudio, como otros (Challet y col. 1998), se sugiere que en ausencia de un ciclo luz-oscuridad, los HRA o la sincronización a una dieta hipocalórica son potentes sincronizadores para el NSQ.

Debido a que el periodo endógeno (τ) del ritmo de actividad locomotora se ajustó al periodo del sincronizador (T; chocolate), y por el establecimiento de una relación de fase entre estos (estado estable), podemos afirmar que hubo una sincronización del ritmo de actividad locomotora. Por otro lado, la velocidad de sincronización mostró ser dependiente del τ del ritmo de actividad locomotora. Los animales que mostraban un ritmo cercano a 24 h tardaron más días en establecer una relación de fase con el sincronizador (aproximadamente 25 días), mientras que los animales que mostraban un τ mayor de 24 h establecían una relación de fase en menos días (5 días aproximadamente). Esto se ha demostrado en otros trabajos, y de hecho ha sido establecido como un criterio para establecer la sincronización. La velocidad angular de un oscilador (dado por τ) determina el número de ciclos necesarios (ciclos transitorios) para establecer una relación de fase estable entre el ritmo endógeno y el sincronizador (Aschoff, 1984; Pittendrigh, 1984; Daan y Aschoff, 2001; Roenneberg y col. 2003).

8.4.3 Sincronización metabólica

El pico máximo de las concentraciones de glucosa se observó exactamente a la hora en que los animales tenían acceso al alimento apetitoso (ZT-0), al igual que en la conducta, al final del periodo de actividad de los animales. Estos datos indican una clara respuesta de la glucosa al alimento apetitoso, mostrando un pico ajustado a la hora de acceso al alimento. Sin embargo, y debido a que las muestras de plasma obtenidas en ZT-0 fueron de animales que no habían recibido aún el alimento, el incremento de las concentraciones de glucosa en este punto temporal podría explicarse por una activación autónoma (simpática), controlada por el NSQ para la homeostasis de la glucosa, que promueva la producción hepática de glucosa por gluconeogénesis (Buijs y Kalsbeek, 2001).

Durante la sincronización a HRA existe un incremento de las concentraciones de corticosterona anticipando la llegada del alimento (Krieger, 1974; Díaz-Muñoz y col. 2000; Martínez-Merlos y col. 2004). La corticosterona promueve la producción de glucosa en el hígado por gluconeogénesis; aunque en este estudio no se evaluaron las concentraciones de corticosterona, el incremento de la actividad de los animales por la llegada del alimento apetitoso, sugiere un incremento también en las concentraciones de corticosterona, el cual promueve el aumento de las concentraciones de glucosa que se observó en ZT-0, antes de la llegada del alimento apetitoso.

Por otro lado, a pesar de que en ZT-4 (4 horas después de haber ingerido el alimento apetitoso) se observó una disminución de las concentraciones plasmáticas de glucosa, los valores obtenidos en este punto y en ZT-8 mostraron ser significativamente más altos que los valores en ZT-16 y ZT-20, como resultado de la ingestión del alimento apetitoso con altos contenidos en carbohidratos (chocolate; 51% carbohidratos).

Debido a que la actividad locomotora de los animales se sincronizó al alimento apetitoso indicando un efecto directo del alimento sobre el NSQ, y de acuerdo a todos los estudios que han demostrado la existencia de un ritmo circadiano de las concentraciones de glucosa dependiente del NSQ, era lógico pensar que el ritmo de glucosa, en estos animales, también se sincronizaría a la dieta apetitosa. Los datos de este estudio mostraron otro pico de glucosa en la transición del día subjetivo a la fase de actividad. Estos datos son congruentes con una sincronización del NSQ.

Estudios previos han mostrado que las concentraciones plasmáticas de glucosa tienen un ritmo circadiano con un pico máximo al inicio del periodo de actividad, independiente del ritmo de

ingestión de alimento y dependiente del NSQ. Además, bajo condiciones de ayuno o en animales bajo regímenes temporales de alimentación, el ritmo circadiano de glucosa persiste, y éste se pierde en animales con lesiones del NSQ (La Fleur y col. 1999). Este pico de glucosa al inicio del periodo de actividad tanto en ratas como en humanos, se ve acompañado por el pico máximo de las concentraciones de corticosterona y cortisol respectivamente, sugiriendo que el ritmo de glucosa posiblemente esté mediado por el ritmo de corticosterona.

Las concentraciones de AGL han mostrado sincronizarse a HRA, mostrando un pico máximo de expresión anticipando la llegada del alimento (Escobar y col. 1998; Díaz-Muñoz y col. 2000; Martínez-Merlos y col. 2004), mientras que en animales en condiciones de alimentación *ad libitum*, no se observa un patrón rítmico de las concentraciones de AGL, lo cual sugiere que el ritmo inducido por los HRA es debido a la condición metabólica (estado catabólico) en que se encuentran los animales (Escobar y col. 1998). Sin embargo, y a pesar de que los animales sincronizados al alimento apetitoso no se encontraban en un estado catabólico, se observó una respuesta asociada a la sincronización por la dieta, que al contrario de lo que se observa en animales sincronizados a HRA, el pico máximo de las concentraciones de AGL se observó 4 horas después de la ingestión del alimento apetitoso, lo cual puede relacionarse al alto contenido de grasas del alimento apetitoso utilizado en este estudio (chocolate 34% grasa).

8.4.4 Sincronización de los patrones de actividad de c-Fos y PER-1

Además de que pudimos observar que dos de las principales salidas del NSQ (locomoción, glucosa) se sincronizaban al alimento apetitoso, la actividad celular del NSQ, por la expresión de c-Fos y PER-1, también mostró sincronización en los animales por el alimento. El pico máximo de expresión de c-Fos se observó en ZT-0, justo en el momento en que los animales recibían el alimento apetitoso, mientras que el ritmo de expresión de la proteína PER-1 mostró un pico máximo entre ZT-8 y ZT-12, al finalizar la fase de reposo, y la expresión mínima de la proteína se observó en ZT-0 (al momento de la llegada del alimento apetitoso).

El ritmo de expresión de PER-1 en el presente estudio es similar al que se observa en animales sincronizados a un ciclo luz oscuridad (Reppert y Weaver, 2001; Hastings y col. 2003), en donde el pico máximo de expresión se observa al inicio del periodo de actividad de los animales y este decae al finalizar dicho periodo. Con esto podemos afirmar que el ritmo de PER-1 en el NSQ de las ratas SAA mostró una dinámica esperada para el patrón de actividad reposo impuesto por el chocolate. Por otro lado, un estudio previo mostró sincronización del patrón de actividad de la proteína PER-2 en ratones sincronizados a restricción de alimento con una mayor expresión en ZT-12 y una menor expresión en ZT-0 (Castillo y col. 2004), similar al patrón temporal de PER-1 en los animales sincronizados al alimento apetitoso en el presente estudio.

Los mecanismos de acción de la sincronización por alimento del NSQ, no son del todo claros. Diversos estudios han mostrado que el alimento solamente es un sincronizador potente para los osciladores periféricos pero no para el NSQ (Schibler y col. 2003). Sin embargo, cuando los paradigmas de sincronización por alimento tienen ciertas características específicas ya sea en cuanto a la cantidad o calidad del alimento, una sincronización o alteración del NSQ puede presentarse.

En animales sincronizados con una dieta hipocalórica, a diferencia de una sincronización a HRA, se observa una sincronización de los ritmos circadianos de la actividad locomotora y de temperatura corporal (Challet y col. 1996a).

Estudios previos han demostrado que la transcripción de genes reloj en el NSQ, depende del estado óxido-reducción celular (REDOX) y que además también es determinante para la sincronización de ciertas enzimas hepáticas a HRA (Díaz-Muñoz y col. 2000; Rutter y col. 2001). Por tal motivo, una sincronización con una dieta hipocalórica altera el estado REDOX y sincroniza la actividad celular del NSQ.

Sin embargo, un estudio previo y en el presente trabajó se mostró que ratones sincronizados a 6 horas de libre acceso al alimento (sin una dieta hipocalórica) y ratas sincronizadas a un alimento apetitoso bajo condiciones de oscuridad constante muestran sincronización del ritmo de actividad locomotora y de la expresión de la proteína PER-2 y PER-1 respectivamente (Castillo y col. 2004).

En estos estudios, como otros (Challet y col. 1998), nuevamente se sugiere que en ausencia de un ciclo luz-oscuridad, los HRA o la sincronización a una dieta hipocalórica son sincronizadores potentes para el NSQ. Pero ¿cómo es el mecanismo de sincronización por alimento y más específico por un alimento apetitoso?

La estimulación luminosa del NSQ induce la expresión de genes de expresión inmediata como c-Fos (Rusak y col. 1990), y de genes reloj como *per1* (Albrecht y col. 1997), lo cual promueve el ajuste de fase del reloj ya sea adelantando o retrasando su fase de acuerdo a la hora en la que se haya aplicado el estímulo. En consecuencia, la sincronización no luminosa, ya sea con la inducción de actividad locomotora o por la administración de algunos fármacos, induce largos avances de fase en el ritmo de actividad locomotora (Mrososvsky, 1995, 1996). Sin embargo, no induce la expresión de c-Fos, y en algunos casos inhibe la inmureactividad de esta proteína (Mead y col. 1992; Biello y col. 1994; Mikkelsen y col. 1998; Antle y Mistlberger, 2000). Así mismo, la inducción de actividad tiene un efecto inhibitorio de la expresión de *per1* y *per2*, (Maywood y col. 1999; Horikawa y col. 2000; Maywood y Mrososvsky, 2001). sugiriendo que la disminución en la expresión de c-Fos y *per* es el mecanismo molecular por el cual las manipulaciones conductuales producen cambios de fase (Maywood y col. 1999).

En el presente estudio, la sincronización a un alimento apetitoso, como un estímulo no luminoso, mostró un efecto opuesto a lo que normalmente se observa con otro tipo de estímulos no luminosos, es decir un aumento en la expresión de c-Fos en el NSQ al momento de la llegada del alimento (ZT-0) y la sincronización de PER-1. Debido a que la inducción de actividad locomotora, que promueve cambios de fase, se asocia a una inhibición de la expresión de c-Fos y de genes reloj como *per1* (Mead y col. 1992; Maywood y col. 1999; Antle y Mistlberger, 2000), el aumento de actividad en los animales sincronizados anticipando el alimento apetitoso no puede ser lo que haya causado el incremento en la expresión de c-Fos y la sincronización de la proteína PER-1 en el NSQ. Por ello, la sincronización por alimento puede estar mediada por otra vía que involucra mecanismos distintos a los no luminosos.

El NSQ recibe inervación de diversas estructuras tanto corticales como subcorticales, sin embargo, algunas de las principales aferencias, además de la retina, provienen de núcleos como el PVT, la HIL y los núcleos del Rafe (Moore y Leak, 2001), las cuales han sido involucradas con la

sincronización no luminosa y la modulación de la sincronización luminosa (Mrosovsky, 1991; Mistlberger y col. 2003; Edelstein y col. 2003).

La HIL recibe una densa proyección bilateral de la retina de las mismas células ganglionares que inervan al NSQ a través del tracto retinohipotalámico (Pickard, 1985). El tracto geniculohipotalámico, se considera una proyección visual secundaria hacia el NSQ. La inducción de c-Fos en la HIL se da por pulsos prolongados de luz, y en animales sincronizados a un ciclo luz-oscuridad existe un patrón rítmico de c-Fos con un pico de mayor expresión en la fase de luz (Edelstein y Amir, 1996; Challet y col. 1997b).

La inducción de actividad locomotora, como estímulo no luminoso, genera la expresión de c-Fos en células que sintetizan NPY en la HIL (Janik y col. 1995; Mrosovsky y col. 1996). Además, la estimulación eléctrica de la HIL, o química con NPY, como principal neurotransmisor de la HIL hacia el NSQ, induce cambios de fase similares a los que se presentan por estímulos no luminosos exclusivamente (Rusak y col. 1989; Yanielli y Harrington, 2001).

Por otro lado, en animales con lesiones de la HIL se observa una atenuación y en algunos casos una ausencia de los cambios de fase de la actividad locomotora y temperatura corporal por la sincronización a una dieta hipocalórica (Challet y col. 1996b), lo cual indica un papel importante de la HIL en la sincronización por alimento.

La mayor expresión de c-Fos en la HIL de ratas sincronizadas al alimento apetitoso (presente estudio) se observó en ZT-16, a la mitad de la fase de actividad, y la menor actividad se observó en ZT-0, al momento del acceso al alimento apetitoso, lo cual coincidió con la menor (ZT-16) y la mayor (ZT-0) expresión de c-Fos en el NSQ respectivamente, lo que sugiere que la activación de esta región talámica está involucrada principalmente en la actividad locomotora de los animales pero no en la vía por la cual el alimento apetitoso pueda sincronizar al NSQ. Esto coincide con estudios previos de sincronización no luminosa, en donde el incremento de la actividad celular de la HIL, genera una inhibición de la actividad celular del NSQ y por consecuencia una sincronización del mismo (Mrosovsky, 1995, 1996), sugiriendo nuevamente que debido a la disminución de la actividad en la HIL y el aumento de c-Fos en el NSQ al momento de acceso al alimento apetitoso, ésta no es la vía por la cual el NSQ se sincronizó al alimento apetitoso.

Sin embargo, de acuerdo a que se ha demostrado un ritmo en la expresión de c-Fos en la HIL que se presenta en la fase de luz de animales sincronizados a un ciclo luz-oscuridad (Challet y col. 1997b), y debido a que el pico de expresión máxima de c-Fos en el presente estudio se observó a la mitad del periodo de actividad, sugiere que la HIL respondió a la sincronización por el alimento apetitoso.

El PVT es otra de las principales eferencias hacia el NSQ, y por el papel que tiene en la sincronización o la modulación de la misma, éste ha sido propuesto como una vía de entrada o sincronización al NSQ (Moga y col. 1995). La relación anatómica y funcional del PVT y el NSQ, ha sido también propuesta como una vía para la sincronización no luminosa (Moga y col. 1995; Mrosovsky, 1996; Amir y Steward, 1996;).

La estimulación luminosa induce la expresión de c-Fos en el PVT principalmente al inicio de la fase de oscuridad en ratas (Challet y col. 1997b). Además, la estimulación eléctrica o química del PVT produce cambios de fase a nivel conductual similares a los que se presentan por pulsos de luz,

Igualmente el PVT utiliza glutamato como principal neurotransmisor inervando al NSQ (Moga y Moore, 1996). Esto sugiere que el papel del PVT tanto en la sincronización no luminosa como en la luminosa es por una vía glutamatérgica, la cual activa las células del NSQ.

Estudios previos han mostrado un patrón circadiano en la expresión de c-Fos en el PVT asociado a la fase de actividad tanto de animales diurnos como nocturnos, sugiriendo la importancia de este núcleo en el mantenimiento de la vigilia (Novak y Núñez, 1998; Novak y col. 2000). Dicha función ha propuesto que el PVT recibe aferencias de sistemas relacionados con la vigilia como el noradrenérgico y serotoninérgico provenientes del locus coeruleus y de los núcleos dorsal y medial del Rafe respectivamente (Jones y Yang, 1985; Vertes y Martín, 1988).

El incremento en el estado motivacional de los animales sincronizados al alimento apetitoso, indica que los animales se encontraban en un estado de vigilia alto, el cual puede ser generado por la activación de los núcleos que regulan el ciclo sueño-vigilia, y de su inervación a otros como el caso del PVT, en el que la expresión de c-Fos y de PER-1 incrementó por la alimento apetitoso. A pesar de que existe un claro ritmo circadiano de la expresión de c-Fos en el PVT (Novak y Núñez, 1998), así como la expresión de PER-1 (presente estudio), al momento no es claro si éste puede ser un oscilador circadiano, y si sus oscilaciones dependen del NSQ. Sin embargo, debido a que los patrones circadianos de c-Fos y PER-1 en el PVT mostraron su pico máximo de expresión justo al momento en el que los animales recibieron el alimento apetitoso, sugerimos que el PVT, como un posible oscilador circadiano, se sincronizó al alimento apetitoso.

Por otro lado, el PVT tiene proyecciones recíprocas con estructuras de carácter límbico como el núcleo cama de la estria terminalis, el septum, la amígdala, la corteza infralímbica, el estriado, el hipocampo y VTA del mesencéfalo (Su y Bentiboglio, 1990; Moga y col. 1995). Todos estos núcleos tienen una relevancia en el control del alertamiento, la activación conductual y los procesos de reforzamiento, lo cual sugiere que el valor reforzante del alimento apetitoso es un factor clave en la activación de tales núcleos y del PVT. Además, la activación neuronal del PVT se ha asociado con conductas consumatorias (Robinson y Mishkin, 1968) y con un incremento de la utilización de dopamina en el núcleo accumbens (estriado ventral) ante un estímulo reforzante (Jones y col. 1989).

El PVT también recibe proyecciones de núcleos del tallo cerebral como el NTS y el NPB (Saper y Loewy, 1980; Herbert y col. 1990). Estas estructuras son relevantes en los procesos gustativos del alimento. La alta estimulación gustativa promovida por el alimento apetitoso (chocolate) sugiere que la activación del NTS, en su porción rostral y el NPB, el cual inerva hacia el PVT, puede ser otra vía por la cual el alimento apetitoso, por su alto valor gustativo (Saper y Loewy, 1980; Herbert y col. 1990), sincronice la actividad del PVT y por consecuencia la del NSQ.

Otra posibilidad de sincronización del NSQ al alimento apetitoso, podría ser que diversas estructuras a nivel central que han mostrado ser osciladores circadianos como el núcleo lecho de la estria terminalis (Amir y col. 2004), el bulbo olfatorio (Granados-Fuentes y col. 2004), la PFC y el hipocampo (Wakamatsu y col. 2001), el caudado-putamen y la corteza parietal (Masubichi y col. 2001) se sincronicen al alimento apetitoso y esto promueva un acoplamiento entre estos, y con el NSQ.

Por otro lado, a pesar de un evidente estado motivacional alto en los animales por el alimento apetitoso, no podemos descartar el cambio a nivel metabólico que experimentan los animales al ser expuestos a la ingestión de un alimento apetitoso con altos contenidos en carbohidratos y grasas, por

lo que otra posibilidad es que la sincronización del NSQ pueda deberse también a dicho cambio metabólico (diferente al que se presenta por la restricción de alimento). Las altas concentraciones de glucosa (presentes por la ingestión del chocolate), pueden ser sensadas en el sistema nervioso central, posiblemente a través del núcleo arqueado del hipotálamo (ARQ), dicho núcleo es considerado como un órgano circunventricular y presenta una gran cantidad de receptores a hormonas como la insulina y la leptina, así como neuronas sensitivas a glucosa (Elmqvist y col. 1999; Seeley y Woods, 2003), por lo que cambios en las concentraciones de glucosa, insulina y la leptina, que suceden durante la ingestión de alimento, ya sea regular o con altos contenidos en carbohidratos, son señales a las que el núcleo ARQ responde y por las aferencias, directa o indirecta (a través del núcleo dorsomedial) que tiene hacia el NSQ (Moga y Moore, 1997; Leak y col. 1999; Moore y Leak, 2001), sugiere que ésta podría ser otra vía por la que el NSQ se sincronice al alimento apetitoso.

Estos resultados demuestran que un alimento apetitoso sincroniza ritmos conductuales (actividad locomotora) y metabólicos (glucosa), y también el ritmo de actividad celular (c-Fos, PER-1) del NSQ, indicando que las propiedades reforzantes del alimento, que promueven un cambio en el estado motivacional de los animales, es un factor clave del alimento para ser un sincronizador potente para el NSQ.

9 DISCUSIÓN GENERAL

La hipótesis acerca de la existencia de un OSA proponía que dicho oscilador podría residir en una estructura específica dentro del SNC y que no se trataba del reloj circadiano principal, el NSQ (Mistlberger, 1994; Stephan, 2001). Se ha propuesto que un posible OSA esté compuesto de la interacción entre el SNC y la periferia (Escobar y col. 1998; Díaz-Muñoz y col. 2000; Davidson y col. 2003; Martínez-Merlos y col. 2004; Angeles-Castellanos y col. 2004). Con la identificación de la expresión de genes reloj, tanto en estructuras centrales como en tejidos periféricos, y la sincronización por alimento de estas estructuras (Yamazaki y col. 2000; Wakamatsu, 2001; Hara y col. 2001; Masubuchi y col. 2002; Balsalobre, 2002; Schibler y col. 2003), esta propuesta se ha fortalecido.

Los resultados obtenidos en los tres experimentos del presente trabajo apoyan la hipótesis de que la sincronización por alimento depende de diversas estructuras, a nivel central, relevantes en procesos metabólicos, motivacionales, homeostáticos, circadianos y cognitivos. Se evidenció, la importancia de los aspectos reforzantes del alimento y de los estados motivacionales que éste genera para la sincronización. Además, demostraron que en este proceso participan estructuras límbicas como el núcleo accumbens, la amígdala y la corteza, y que en condiciones específicas el NSQ, indicando que el aspecto motivacional y reforzante es una característica principal del alimento como sincronizador aún para el NSQ.

Estudios previos de nuestro laboratorio y de otros grupos han demostrado que los HRA sincronizan la actividad celular de estructuras centrales como el estriado (Masubuchi y col. 2002), el hipocampo y la PFC (Wakamatsu, 2001), el LH y DMH (Angeles-Castellanos y col. 2004), pero no el NSQ cuando los animales son expuestos a un ciclo luz-oscuridad (Hara y col. 2001; Damiola y col. 2000; Balsalobre y col. 2000). Estos resultados han propuesto que los aspectos metabólicos, generados por la restricción de alimento, son determinantes para la sincronización. Sin embargo, a diferencia de estos experimentos, los presentes resultados demostraron que son determinantes los aspectos reforzantes del alimento y las estructuras a nivel central (accumbens, amígdala, corteza) que subyacen a estos durante la sincronización por alimento también.

En un estudio previo se descartaba el aspecto reforzante del alimento como parte clave para la sincronización, ya que se mostraba que lesiones del sistema límbico (incluido el accumbens y la amígdala) no eliminaban la AA (Mumby y Mistlberger, 1992). Sin embargo, el mismo grupo demostró previamente que la sincronización con una dieta apetitosa genera AA en ratas por el aspecto reforzante de la dieta (Mistlberger y Rusak, 1987), lo cual contradice sus datos. En el presente estudio, se observó que la lesión específica de una estructura del sistema límbico (núcleo accumbens) no eliminaba la AA, pero sí disminuía considerablemente la expresión de ésta, y que la sincronización con una dieta apetitosa genera AA y sincroniza la actividad celular de estructuras límbicas (accumbens, amígdala, corteza), demostrando que el aspecto motivacional del alimento apetitoso sí es determinante para la sincronización.

Durante muchos años se ha mantenido la idea de que en la sincronización por alimento no están implícitos procesos de aprendizaje. Los datos de la presente tesis comprueban que durante este proceso hay involucrados mecanismos de reforzamiento por la activación de estructuras límbicas. Aunque el proceso no cubre los requisitos estrictos del condicionamiento, es evidente que involucra procesos de reforzamiento.

Debido a que la sincronización con un alimento apetitoso no mostró sincronización de núcleos hipotálamicos, como se observa por sincronización a HRA, al menos dos procesos están involucrados en la sincronización por alimento, uno metabólico y otro motivacional. Mientras que en la sincronización a HRA, ambos procesos están implicados, con la alternancia de estados prolongados de ayuno y breves de alimentación, en la sincronización con un alimento apetitoso, sin restricción de alimento regular, los procesos motivacionales están mayormente involucrados, mostrando una disociación de dos mecanismos diferentes durante la sincronización por alimento. Sin embargo, en la sincronización con un alimento apetitoso la influencia de un cambio metabólico (altas concentraciones de glucosa por el alimento) es inevitable, aunque el cambio que enfrentan los animales no es el mismo que cuando se sincronizan a un horario de restricción de alimento.

La sincronización por alimento del NSQ también se ha observado con un paradigma en el que se utiliza una dieta hipocalórica (en la cual los animales reciben solamente el 66% de alimento que ingieren en 24 horas; Challet y col. 2003). La similitud entre estos resultados y los encontrados en el presente estudio, muestran la presencia de un estado motivacional alto en los animales, ya sea por la privación prolongada de alimento o por la exposición a un alimento altamente apetitoso.

Estos datos abren una perspectiva diferente a los estudios que hasta ahora habían asociado al alimento con la sincronización del NSQ, ya que hasta el momento se había propuesto que este efecto se lograba únicamente con dietas hipocalóricas y por lo tanto con un estado catabólico. El presente estudio muestra que el fenómeno está mediado por un elevado estado motivacional. De ello se abren nuevas perspectivas. Por un lado, la de explorar la relación entre el sistema límbico y el NSQ. Por otro lado, el explorar el papel que juega el estado motivacional en el proceso de sincronización por alimento.

El ciclo luz-oscuridad es el sincronizador más importante para el NSQ, sin embargo, en la ausencia de un ciclo luz-oscuridad, el NSQ puede responder a otro tipo de sincronizadores como la restricción con una dieta hipocalórica (Challet y col. 2003) o a un alimento apetitoso (presente estudio). Esto sugiere que a pesar de que el alimento es un sincronizador para el NSQ cuando adquiere propiedades específicas, éste nunca va a tener la fuerza para sincronizar al NSQ si un ciclo luz-oscuridad está presente.

En resumen los diferentes resultados obtenidos en el presente trabajo confirman la hipótesis de que en un sistema circadiano sincronizado por alimento, son diversas las estructuras a nivel central que responden a dicha sincronización. Por otro lado, se demuestra la importancia del valor reforzante que tiene el alimento como sincronizador, por la ingestión de un alimento apetitoso, y de la relevancia de estructuras a nivel central de carácter límbico durante la sincronización. Además, dicha sincronización no se limita a estructuras límbicas, sino que el NSQ también se sincroniza al alimento apetitoso, indicando que, en ausencia de su principal sincronizador el ciclo luz-oscuridad, el NSQ es sensible a las características reforzantes del alimento y a los estados motivacionales que éste genera.

10 CONCLUSIONES

- El núcleo accumbens es una estructura importante en la sincronización por alimento participando principalmente en la AA. La lesión específica de la región core del núcleo interfiere con la AA, indicando su relación con la expresión conductual del OSA.
- La sincronización con un alimento apetitoso, sin restricción de alimento, es suficiente para generar AA, pero no la sincronización de glucosa ni ácidos grasos libres, indicando que este paradigma de sincronización difiere del de sincronización a HRA.
- La AA persiste al menos por 4 ciclos después de interrumpir la sincronización, indicando la presencia de un mecanismo de oscilación circadiano.
- La respuesta celular de estructuras exclusivamente del sistema límbico, pero no del hipotálamo, a la sincronización por el alimento apetitoso, a diferencia de la respuesta hipotalámica por una sincronización a HRA, apoya la idea de la presencia de mecanismos diferentes a nivel central durante la sincronización dependiendo de los estados de alimentación en que se encuentren los animales.
- Un alimento apetitoso es un sincronizador potente para el NSQ, a nivel conductual (actividad locomotora), fisiológico (glucosa) y celular (c-Fos y PER-1).
- Para establecer una sincronización por el alimento apetitoso es determinante la ausencia del ciclo luz-oscuridad, como principal sincronizador del NSQ, evitando la competencia entre sincronizadores.
- La sincronización del NSQ por un alimento apetitoso no requiere de estados catabólicos en los animales por una restricción calórica, indicando que para la sincronización el aspecto motivacional del alimento y un aspecto metabólico diferente al que se presenta por la restricción de alimento son claves para establecer la sincronización.
- El PVT, como una de las principales proyecciones al NSQ, puede ser una de las vías de sincronización por alimento apetitoso al NSQ.

11 REFERENCIAS

- Abe H, Rusak B (1992) Anticipatory activity and entrainment of circadian rhythms in Syrian hamsters exposed to restricted palatable diets. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 263: R116-R124.
- Abe M, Herzog ED, Yamazaki S, Straume M, Tei H, Sakaki Y, Menaker M, Block GD (2002) Circadian rhythms in isolated brain regions. *J Neurosci* 22: 350-356.
- Abrahamson EE, Leak RK, Moore RY (2001) The suprachiasmatic nucleus projects to posterior hypothalamic arousal systems. *Neuroreport* 12(2): 435-440.
- Aguilar-Roblero R, Salazar-Juárez A, Rojas-Castañeda J, Escobar C, Cintra L (1997) Organization of circadian rhythmicity and suprachiasmatic nuclei in malnourished rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 273: R1321-R1331.
- Albrecht U, Zheng B, Larkin D, Sun ZS, Lee CC (1997) A differential response of two putative mammalian circadian regulators, *mper1* and *mper2*, to light. *Cell* 91: 1055-1064.
- Amir S, Steward J (1996) Resetting of the circadian clock by a conditioned stimulus. *Nature* 379: 542-545.
- Amir S, Waddington-Lamont E, Robinson B, Stewart J (2004) A circadian rhythm in the expression of PERIOD 2 protein reveals a novel SCN-controlled oscillator in the oval nucleus of the bed nucleus of the stria terminalis. *J Neurosci* 24(4): 781-790.
- Angeles-Castellanos M, Aguilar-Roblero R, Escobar C (2004) c-Fos expression in the hypothalamic nuclei of food-entrained rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286: R158-R165.
- Antle MC, Mistlberger RE (2000) Circadian clock resetting by sleep deprivation without exercise in the Syrian hamster. *J Neurosci* 20(24): 9326-9332.
- Aschoff J (1984). Free-running and entrained circadian rhythms. *Handbook of Behavioral Neurobiology*. Vol. 4: Biological Rhythms. (Jurgen Aschoff, Ed.) New York: Plenum Press: 81-93.
- Baldo BA, Sadeghian K, Baso AM, Kelley AE (2002) Effects of selective dopamine D1 and D2 receptor blockade within nucleus accumbens subregions on ingestive behavior and associated motor activity. *Behav Brain Res* 137: 165-177.
- Balsalobre A, Damiola F, Schibler U (1998) Serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* 93: 929-937.

- Balsalobre A, Brown SA, Marcacci L, Tronche F, Kellendonk C, Reichardt HM, Schutz G, Schibler U (2000) Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science* 289(5488): 2344-2347.
- Balsalobre A (2002) Clock genes in mammalian peripheral tissues. *Cell Tissue Res* 309: 193-199.
- Bassareo V, DiChiara G (1997) Differential influence of associative and nonassociative learning mechanism on the responsiveness of prefrontal and accumbal dopamine transmission to food stimuli in rats fed ad libitum. *J Neurosci* 17(2): 851-861.
- Bassareo V, Di Chiara G (1999a) Differential responsiveness of dopamine transmission to food-stimuli in nucleus accumbens shell-core compartments. *Neuroscience* 113: 324-336.
- Bassareo V, Di Chiara G (1999b) Modulation of feeding-induced activation of mesolimbic dopamine transmission by appetitive stimuli and its relation to motivational state. *Eur J Neurosci* 11: 4489-4397.
- Berridge KC (2003) Pleasures of the brain. *Brain and Cognition* 52: 106-128.
- Berridge KC, Robinson TE (2003) Parsing reward. *Trends Neurosci* 26(9): 507-513.
- Biello SM, Harrington ME, Mason R (1991) Geniculo-hypothalamic lesions block chlordiazepoxide-induced phase advances in Syrian hamsters. *Brain Res* 552: 47-52.
- Biello SM, Janik D, Mrososvsky N (1994) Neuropeptide Y and behaviorally induced phase shifts. *Neuroscience* 62: 273-279.
- Bolles RC, de Lorge J (1962) The rat's adjustment to a-diurnal feeding cycles. *J Comp Physiol Psychol* 55: 760-762.
- Brown SA, Zumbrunn G, Fleury-Olela F, Preitner N, Schibler U (2002) Rhythms of mammalian body temperature can sustain peripheral circadian clocks. *Curr Biol* 12(18): 1574-1583.
- Buijs RM, Kalsbeek A (2001) Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nat Rev Neurosci* 2: 521-526.
- Buijs RM, Chun S, Nijima A, Romijn HA, Nagai A (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* 431: 405-423.
- Cain SW, Verwey M, Hood S, Leknickas P, Karatsoreos I, Yeomans JS, Ralph MR (2004a) Reward and aversive stimuli produce similar nonphotic phase shifts. *Behav Neurosci* 118(1): 131-137.
- Cain SW, Chou T, Ralph MR (2004b) Circadian modulation of performance on an aversion-based place learning task in hamsters. *Behav Brain Res* 150: 201-205.

- Castillo MR, Hochstetler KJ, Tavernier RJ, Greene DM, Bult-Ito A (2004) Entrainment of the master circadian clock by scheduled feeding. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287: R551-R555.
- Cermakian N, Monaco L, Pando MP, Dierich A, Sassone Corsi P (2001) Altered behavioral rhythms and clock gene expression in mice with a targeted mutation in the Period 1 gene. *EMBO J* 20: 3967-3974.
- Challet E, Malan A, Pévet P (1996a) Daily hypocaloric feeding entrains circadian rhythms of wheel-running and body temperature in rats kept in constant darkness. *Neurosci Lett* 211: 1-4.
- Challet E, Pévet P, Malan A (1996b) Intergeniculate leaflet lesion and daily rhythms in food-restricted rats fed during daytime. *Neurosci Lett* 216: 214-218.
- Challet E, Pévet P, Vivien-Roels B, Malan A (1997a) Phase-advanced daily rhythms of melatonin, body temperature, and locomotor activity in food-restricted rats fed during daytime. *J. Biol. Rhyth*, 12: 65-79.
- Challet E, Jacob N, Vuillez P, Pévet P, Malan A (1997b) Fos-like immunoreactivity in the circadian timing system of calorie-restricted rats fed at dawn: daily rhythms and light pulse-induced changes. *Brain Res* 770(1-2): 228-236.
- Challet E, Solberg LC, Turek FW (1998) Entrainment in calorie-restricted mice: conflicting zeitgebers and free-running conditions. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 274: R1751-R1761.
- Challet E, Takahashi JS, Turek FW (2000) Nonphotic phase-shifting in clock mutant mice. *Brain Res.* 859(2): 398-403.
- Challet E, Caldelas I, Graff C, Pevet P (2003) Synchronization of the molecular clockwork by light-and-food-related cues in mammals. *Biol Chem* 384(5): 711-719.
- Chou TC, Scammell TE, Gooley JJ, Gaus SE, Saper CB, Lu J (2003) Critical role of dorsomedial hypothalamic nucleus in a wide range of behavioral circadian rhythms. *J Neurosci* 23(33): 10691-10702.
- Cutrera RA, Kalsbeek A, Pevet P (1994) Specific destruction of the serotonergic afferents to the suprachiasmatic nuclei prevents triazolam-induced phase advances of hamster activity rhythms. *Behav Brain Res* 62: 21-28.
- Daan S, Aschoff J (2001) The entrainment of circadian systems. En *Circadian Clocks*, Vol. 12, Handbook of Behavioral Neurobiology, ed. Takahashi JS, Turek FW, Moore RY. Kluwer Academic/Plenum publishers, New York: 7-43.
- Damiola F, Le Minh N, Preitner N, Kornmann B, Fleury-Olela F, Schibler U (2000) Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev* 14: 2950-2961.

- Davidson AJ, Cappendijk SL, Stephan FK (2000) Feeding-entrained circadian rhythms are attenuated by lesions of the parabrachial region in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278: R1296-R1304.
- Davidson AJ, Aragona BJ, Houtp TA, Stephan FK (2001) Persistence of meal-entrained circadian rhythms following area postrema lesions in the rat. *Physiol Behav* 74: 349-354.
- Davidson AJ, Poole AS, Yamazaki S, Menaker M (2003) Is the food-entrainable circadian oscillator in the digestive system? *Genes Brain Behav* 2: 32-39.
- Díaz-Muñoz M, Vazquez-Martínez O, Aguilar-Roblero R, Escobar C (2000) Anticipatory changes in liver metabolism and entrainment of insulin, glucagons, and corticosterone in food-restricted rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279: R2048-R2056.
- Dudley CA, Erbel-Sieler C, Estill SJ, Reick M, Franken P, Pitts S, McKnight SL (2003) Altered patterns of sleep and behavioral adaptability in NPAS2-deficient mice. *Science* 301: 379-383.
- Edelman K, Amir S (1996) Constant light induces persistent Fos expression in the rat intergeniculate leaflet. *Brain Res* 731: 221-225.
- Edelman K, de la Iglesia HO, Schwartz WJ, Mrosovsky N (2003) Behavioral arousal blocks light-induced phase advances in locomotor rhythmicity but not light-induced Per1 and Fos expression in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* 118(1): 253-261.
- Elmquist JK, Elias CF, Saper CB (1999) From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron* 22(2): 221-232.
- 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.
- Escobar C, Mendoza JY, Salazar-Juárez A, Ávila J, Hernández-Muñoz R, Díaz-Muñoz M, Aguilar-Roblero R (2002) Rats made cirrhotic by chronic CCL4 treatment still exhibit anticipatory activity to a restricted feeding schedule. *Chronobiology Int* 19(6): 1073-1086.
- Graudo SQ, Billington CJ, Levin AS (1998) Effects of opioid antagonist naltrexone on feeding induced by DAMGO in the central nucleus of amygdala and in the paraventricular nucleus in the rat. *Brain Res* 782: 18-23.
- Glass JD, Tardif SD, Clements R, Mrosovsky N (2001) Photic and nonphotic circadian phase resetting in a diurnal primate, the common marmoset. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280: R191-R197.
- Granados-Fuentes D, Prolo LM, Abraham U, Herzog ED (2004) The suprachiasmatic nucleus entrains, but does not sustain circadian rhythmicity in the olfactory bulb. *J Neurosci* 24(3): 615-619.

- Hanlon EC, Baldo BA, Sadeghian K, Kelley AE (2004) Increases in food intake or food-seeking behavior induced by GABAergic, opioid, or dopaminergic stimulation of the nucleus accumbens: is it hunger?. *Psychopharmacology* 172: 241-247.
- 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.
- Hastings MH, Mead SM, Vindlacheruvu RR, Ebling FJ, Maywood ES, Grosse J (1992) Nonphotic phase shifting of the circadian activity rhythm of Syrian hamsters: the relative potency of arousal and melatonin. *Brain Res* 591(1): 20-26.
- Hastings MH, Duffield GE, Smith EJ, Maywood ES, Ebling FJ (1998) Entrainment of the circadian system of mammals by nonphotic cues. *Chronobiol Int* 15: 425-445.
- Hastings MH, Reddy AB, Maywood ES (2003) A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease. *Nat Rev Neurosci* 4: 649-661.
- Heimer L, Zham DS, Churchill L, Kalivas PW, Wohltmann C (1991) Specificity in the projection patterns of accumbens core and shell in the rat. *Neuroscience* 41: 89-125.
- Herbert H, Moga MM, Saper CB (1990) Connections of the parabrachial nucleus with the nucleus of the solitary tract and medullary reticular formation in the rat. *J Comp Neurol* 293: 540-580.
- Honma KI, Honma S, Hiroshige T (1984) Feeding-associated corticosterone peak in rats under various feeding cycles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 246(5 Pt2): R721-R726.
- Horikawa K, Yokota S, Fuji K, Akiyama M, Moriya T, Okamura H, Shibata S (2000) Nonphotic entrainment by 5-HT1A/7 receptor agonists accompanied by reduced *Per1* and *Per2* mRNA levels in the suprachiasmatic nuclei. *J Neurosci* 20: 5867-5873.
- Hut RA, Mrosovsky N, Daan S (1999) Nonphotic entrainment in a diurnal mammal, the European ground squirrel (*Spermophilus citellus*). *J Biol Rhythms* 14: 409-419.
- Inzunza O, Seron-Ferre MJ, Bravo H, Torrealba F (2000) Tubermammillary nucleus activation anticipates feeding under a restricted schedule in rats. *Neurosci Lett* 293(2): 139-142.
- Janik D, Mikkelsen JD, Mrosovsky N (1995) Cellular colocalization of Fos and neuropeptide Y in the intergeniculate leaflet after nonphotic phase-shifting events. *Brain Res* 698: 137-145.
- Jones BE, Yang TZ (1985) The efferent projections from the reticular formation and the locus coeruleus studied by anterograde and retrograde axonal transport in the rat. *J Comp Neurol* 242: 56-92.
- Jones MW, Kilpatrick IC, Phillipson OT (1989) Regulation of dopamine function in the nucleus accumbens of the rat by the thalamic paraventricular nucleus and adjacent midline nuclei. *Exp Brain Res* 76: 572-580.

- Kalsbeek A, Fliers E, Romijn J, La Fleur S, Wortel J, Bakker O, Endert E, Buijs RM (2001) The suprachiasmatic nucleus directly generates the diurnal changes in plasma leptin levels. *Endocrinology* 142: 2677-2685.
- Kelley AE (1999) Neural integrative activities of nucleus accumbens subregions in relation to learning and motivation. *Psychobiology* 27: 198-213.
- Kim EM, Shi Q, Olszewski PK, Grace MK, O'Hare E, Billington CJ, Levine AS (2001) Identification of central sites involved in butorphanol-induced feeding in rats. *Brain Res* 907: 125-129.
- Kornhauser JM, Nelson DE, Mayo KE, Takahashi JS (1990) Photic and circadian regulation of c-fos gene expression in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Neuron* 5: 127-134.
- Krieger DT (1974) Food and water restriction shifts corticosterone, temperature, activity and brain amine periodicity. *Endocrinology* 95: 1195-1201.
- Krieger DT, Hauser H, Krey LC (1977) Suprachiasmatic nuclear lesions do not abolish food-shifted circadian adrenal and temperature rhythmicity. *Science* 197: 398-399.
- Kuriyama K, Sasahara K, Takashi K, Shibata S (2004) Daily injection of insulin attenuated impairment of liver circadian clock oscillation in the streptozotocin-treated diabetic mouse. *FEBS Lett* 572: 206-210.
- 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, Card JP, Moore RY (1999) Suprachiasmatic pacemaker organization analyzed by viral transynaptic transport. *Brain Res* 819(1-2): 23-32.
- Liu C, Reppert SM (2000) GABA synchronizes clock cells within the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron* 25(1): 123-128.
- Marchand EG, Watson NV, Mistlberger RE (1997) Both neuropeptide Y and serotonin are necessary for entrainment of circadian rhythms in mice by daily treadmill running schedules. *J Neurosci* 17(20): 7974-7987.
- Martínez-Merlos T, Angeles-Castellanos M, Díaz-Muñoz M, Aguilar-Roblero R, Mendoza J, Escobar C (2004) Dissociation between adipose tissue signals, behavior and the food-entrained oscillator. *J Endocrinol* 181: 171-195.
- Masubuchi S, Honma S, Abe H, Ishizaki K, Namihira M, Ikeda M, Honma K (2000) Clock genes outside the suprachiasmatic nucleus involved in manifestation of locomotor activity rhythm in rats. *Eur J Neurosci* 12: 4206-4214.

- Maywood ES, Smith E, Hall SJ, Hastings MH (1997) A thalamic contribution to arousal-induced, non-photic entrainment of the circadian clock of the Syrian hamster. *Eur J Neurosci* 9: 1739-1747.
- Maywood ES, Mrosovsky N, Field MD, Hastings MH (1999) Rapid down-regulation of mammalian *Period* genes during behavioral resetting of the circadian clock. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96: 15211-15216.
- Maywood ES, Mrosovsky N (2001) A molecular explanation of interactions between photic and non-photic circadian clock-resetting stimuli. *Gene Expression Pattern* 1:27-31.
- Maywood ES, Okamura H, Hastings MH (2002) Opposing actions of neuropeptide Y and light on the expression of circadian clock genes in the mouse suprachiasmatic nuclei. *Eur J Neurosci* 15(1): 216-220.
- Mead S, Ebling F, Maywood S, Humby T, Herbert J, Hasting MH (1992) A nonphotic stimulus causes instantaneous phase advances of the light-entrainable circadian oscillator of the Syrian hamster but does not induce the expression of c-fos in the suprachiasmatic nuclei. *J Neurosci* 12(7): 2516-2522.
- Meijer JH (2001) Photic entrainment in mammals. En *Circadian Clocks*, Vol. 12, Handbook of Behavioral Neurobiology, ed. Takahashi JS, Turek FW, Moore RY. Kluwer Academic/Plenum publishers, New York: 183-222.
- Mendoza J, Aguilar-Roblero R, Díaz-Muñoz M, Escobar C (2003) Daily epinephrine but not norepinephrine administration produces anticipatory drinking behavior in rats. *Biol Rhythms Res* 34: 73-90.
- Mendoza J, Dardente H, Escobar C, Pevet P, Challet E (2004) Dark pulse resetting of the suprachiasmatic clock in Syrian hamsters: behavioral phase-shifts and clock genes expression. *Neuroscience* 127(2) 529-532.
- Meyer-Bernstein EL, Morin LP (1996) Differential serotonergic innervation of the suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet and its role in circadian rhythm modulation. *J Neurosci* 16(6): 2097-2111.
- Mikkelsen JD, Vrang N, Mrosovsky N (1998) Expression of Fos in the circadian system following nonphotic stimulation. *Brain Res Bull* 47(4): 367-376.
- Mistlberger RE, Rusak B (1987) Palatable daily meals entrain anticipatory activity rhythms in free feeding rats: Dependence on meal size and nutrient content. *Physiol Behav* 41: 219-226.
- Mistlberger RE, Mumbly DG. (1992): The limbic system and food-anticipatory circadian rhythms in the rat: ablation and dopamine blocking studies. *Behav Brain Res* 47: 159-168.
- Mistlberger RE (1994) Circadian food anticipatory activity: formal models and physiological mechanism. *Neurosci Biobehav Rev* 18: 171-195.

- Mistlberger RE, Antle MC, Webb IC, Jones M, Weinberg J, Pollock MS (2003) Circadian clock resetting by arousal in Syrian hamsters: the role of stress and activity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285: R917-R925.
- Moga MM, Weis RP, Moore RY (1995) Efferent projections of the paraventricular thalamic nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 359: 221-238.
- Moga MM, Moore RY (1996) Putative excitatory amino acid projections to the suprachiasmatic nucleus in the rat. *Brain Res* 743: 171-177.
- Moga MM, Moore RY (1997) Organization of neural inputs to the suprachiasmatic nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 389: 508-534.
- Mogenson GJ, Jones DJ, Yim CY (1980) From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. *Prog Neurobiol* 14: 69-97.
- Moore-Ede M, Sulzman FM, Fuller CA (1982) *The Clocks that Time Us: Physiology of the Circadian Timing System*. Harvard University Press, Cambridge.
- Moore RY, Eichler VB (1972) Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic nucleus lesions in rats. *Brain Res* 42: 201-206.
- Moore RY, Leak RK (2001) Suprachiasmatic nucleus. En *Circadian Clocks, Vol. 12, Handbook of Behavioral Neurobiology*, ed. Takahashi JS, Turek FW, Moore RY. Kluwer Academic/Plenum publishers, New York: 141-179.
- Mrosovsky N (1991) Double-pulse experiments with nonphotic and photic phase-shifting stimuli. *J Biol Rhythms* 6: 167-179.
- Mrosovsky N (1995) A non-photic gateway to the circadian clock of hamsters. En: *Circadian Clocks and their Adjustment*. Chatwick and Ackrill, (Eds). Ciba Foundation Symposium 183, England, pp 154-172.
- Mrosovsky N (1996) Locomotor activity and non-photic influences on circadian clocks. *Biol Rev Camb Philos Soc* 71: 343-372.
- Novák M (1965) Colorimetric ultramicro method for the determination of free fatty acids. *J Lipid Res*, 6: 431-433.
- Novak CM, Nuñez AA (1998) Daily rhythms in Fos activity in the rat ventrolateral preoptic area and midline thalamic nuclei. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 275: R1620-R1626.
- Novak CM, Smale L, Nuñez AA (2000) Rhythms in Fos expression in brain areas related to the sleep-wake cycle in the diurnal *Arvicanthus niloticus*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278: R1267-R1274.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

- Ono M, Shibata S, Minamoto Y and Watanabe S (1996) Effect of the noncompetitive N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) receptor antagonist MK-801 on food-anticipatory activity rhythm in the rat. *Physiol Behav* 59: 585-589.
- Paxinos G (1995) *The rat nervous system*. 2nd edn, Academic Press, San Diego USA.
- Paxinos G, Watson C (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 4th edn Academic Press San Diego USA.
- Pecina S, Berridge KC (2000) Opioid eating site in accumbens shell mediates food intake and hedonic "liking": map based on microinjection Fos plumes. *Brain Res* 863: 71-86.
- Pecoraro N, Gomez F, Laugero K, Dallman MF (2002) Brief access to sucrose engages food-entrainable rhythms in food-deprived rats. *Behav Neurosci* 116(5): 757-776.
- Penev PD, Turek FW, Zee PC (1995) A serotonin neurotoxin attenuates the phase-shifting effects of triazolam on the circadian clock in hamsters. *Brain Res* 669: 207-216.
- Perreau-Lenz S, Pevet P, Buijs RM, Kalsbeek A (2004) The biological clock: the bodyguard of temporal homeostasis. *Chronobiol Int* 21(1): 1-25.
- Petrovich GD, Setlow B, Holland PC, Gallagher M (2002) Amygdalo-hypothalamic circuit allows learned cues to override satiety and promote eating. *J Neurosci* 22(19): 8748-8753.
- Pickard G (1985) Bifurcating axons of retinal ganglion cells terminate in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet of the thalamus. *Neurosci Lett* 55: 211-217.
- Pittendrigh C (1984) Circadian systems: Entrainment. *Handbook of Behavioral Neurobiology*. Vol. 4: Biological Rhythms. (Jurgen Aschoff, Ed.) New York: Plenum Press. 95-124.
- Pitts S, Perone E, Silver R (2003) Food-entrained circadian rhythms are sustained in arrhythmic Clk/Clk mutant mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285(1): R57-R67.
- Pomonis JD, Jewett DC, Kotz CM, Briggs JE, Billington CJ, Levine AS (2000) Sucrose consumption increases naloxone-induced c-Fos immunoreactivity in limbic forebrain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278(3): R712-R719.
- Reick M, Garcia JA, Dudley C, McKnight SL (2001) NPAS2: an analog of clock operative in the mammalian forebrain. *Science* 293: 506-509.
- Reppert SM, Weaver DR (2001) Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol* 63: 647-676.
- Reppert SM, Weaver DR (2002) Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418: 935-941.
- Richter CP (1922) A behavioristic study of the activity of the rat. *Comp Psychol Monogr* 1: 1-54.

- Robinson BW, Mishkin M (1968) Alimentary responses to forebrain stimulation in monkeys. *Exp. Brain Res* 4: 330-366.
- Roennenberg T, Daan S, Meroz M (2003) The art of entrainment. *J Biol Rhythms* 18(3): 183-194.
- Rolls ET (2000) The orbitofrontal cortex and reward. *Cerebral Cortex* 10(3): 284-294.
- Rusak B, Meijer JH, Harrington ME (1989) Hamster circadian rhythms are phase-shifted by electrical stimulation of the geniculo-hypothalamic tract. *Brain Res* 493: 283-291.
- Rusak B, Robertson HA, Wisden W, Hunt SP (1990) Light pulse that shift rhythms induce gene expression in the suprachiasmatic nucleus. *Science* 248: 1237-1240.
- Rutter J, Reick M, Wu LC, McKnight SL (2001) Regulation of clock and NPAS2 DNA binding by redox state of NAD cofactors. *Science* 293: 510-514.
- Sakamoto K, Nagase T, Fukio H, Horikawa K, Okada T, Tenaka H, Sato K, Miyake Y, Ohara O, Kako K, Ishida N (1998) Multitissue circadian expression of rat period homolog (*rPer2*) mRNA is governed by the mammalian circadian clock, the suprachiasmatic nucleus in the brain. *J Biol Chem* 273(42): 27039-27042.
- Salamone JD, Mahan K, Rogers S (1993) Ventrolateral striatal dopamine depletions impair feeding and food handling in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 44: 605-610.
- Salazar-Juárez A, Escobar C, Aguilar-Roblero R (2002) Anterior paraventricular thalamus modulates light-induced phase shifts in circadian rhythmicity in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283: R897-R904.
- Salazar-Juárez A, Aguilar-Roblero R, Parra L, Escobar C (2003) Restricted feeding schedules modulate free-running drinking activity in malnourished rats. *Biol Rhyth Res*, 34(5): 459-474.
- Saper CB, Loewy AD (1980) Efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. *Brain Res* 197: 291-317.
- Schibler S, Ripperger J, Brown SA (2003) Peripheral circadian oscillators in mammals: time and food. *J Biol Rhythms* 18(3): 250-260.
- Schwartz WJ, Lydic R, Moore-Ede MC (1987) In vivo metabolic activity of the suprachiasmatic nuclei: non-uniform intranuclear distribution of ¹⁴C-labeled deoxyglucose uptake. *Brain Res* 424(2) 249-257.
- Seeley RJ, Woods SC (2003) Monitoring of stored and available fuel by the CNS: implications for obesity. *Nat Rev Neurosci* 4(11): 901-909.
- Slotten HA, Krekling S, Sicard B, Pevet P (2002) Daily infusion of melatonin entrains circadian activity rhythms in the diurnal rodent *Arvicanthis ansorgei*. *Behav Brain Res* 133: 11-19.

- Stephan FK, Zucker I (1972) Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69: 1583-1586.
- Stephan FK, Swann JM, Sisk CL (1979) Anticipation of 24-hr feeding schedules in rats with lesions of the suprachiasmatic nucleus. *Behav Neural Biol* 25: 346-363.
- Stephan FK (1981). Limits of entrainment to periodic feeding in rats with suprachiasmatic lesions. *J Comp Physiol* 143: 401-410.
- Stephan FK (2001) Food-entrainable oscillators in mammals. *En Circadian Clocks*, Vol. 12, *Handbook of Behavioral Neurobiology*, ed. Takahashi JS, Turek FW, Moore RY. Kluwer Academic/Plenum publishers, New York: 223-246.
- Stephan FK (2002) The "other" circadian system: food as a zeitgeber. *J Biol Rhythms* 17: 284-292.
- Stokkan KA, Yamazaki S, Tei H, Sakaki Y, Menaker M (2001) Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science* 291: 490-493.
- Stratford TR, Kelley AE (1997) GABA in the nucleus accumbens shell participates in the central regulation of feeding behavior. *J Neurosci* 17: 4434-4440.
- Stratford TR, Kelley AE (1999) Evidence of a functional relationship between the nucleus accumbens shell and lateral hypothalamus subserving the control of feeding behavior. *J Neurosci* 19: 11040-11048.
- Su HS, Bentivoglio M (1990) Thalamic midline cells populations projecting to the nucleus accumbens, amygdala, and hippocampus in the rat. *J. Comp. Neurol* 297: 582-593.
- Swanson LW, Petrovich GD (1998) What is the amygdala? *Trends Neurosci* 21: 323-331.
- Szczypka MS, Kwok K, Brot MD, Marck BT, Matsumoto AM, Donahue BA, Palmiter RD (2001) Dopamine production in the caudate putamen restores feeding in dopamine-deficient mice. *Neuron* 30: 819-828.
- Terazono H, Mutoh T, Yamaguchi S, Kubayashi S, Kubayashi M, Akiyama M, Udo R, Ondo S, Okamura H, Shibata S (2003) Adrenergic regulation of clock gene expression in mouse liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(11):6795-6800.
- Tosini G, Menaker M (1996) Circadian rhythms in cultured mammalian retina. *Science* 272: 419-421.
- Touzani K, Taghzouti K, Velley L (1997) Increase of the aversive value of taste stimuli following ibotenic acid lesion of the central amygdaloid nucleus in the rat. *Behav Brain Res* 88: 133-142.

- Vertes RP, Martin GF (1988) Autoradiographic analysis of ascending projections from the pontine and mesencephalic reticular formation and the median raphe nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 275: 511-541.
- Wakamatsu H, Yoishinobu Y, Aida R, Moriya T, Akiyama M, Shibata S (2001) Restricted-feeding-induced anticipatory activity rhythm is associated with a phase-shift of the expression in mPer1 and mPer2 mRNA in the cerebral cortex and hippocampus but not in the suprachiasmatic nucleus of mice. *Eur J Neurosci* 13: 1190-1196.
- Welsh DK, Logothetis DE, Meister M, Reppert SM (1995) Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* 14: 697-706.
- Whitmore D, Foulkes NS, Sassone-Corsi P (2000) Light acts directly on organs and cells in culture to set the vertebrate circadian clock. *Nature* 404(6773): 87-91.
- Wickland CR, Turek FW (1994) Lesions of the intergeniculate leaflet block activity-induced phase shifts in the circadian rhythm of activity in the golden hamster. *Brain Res* 660: 283-300.
- Wise RA (1985) The anhedonia hypothesis: MARK III. *Behav Brain Sci* 8: 178-186.
- Yamaguchi S, Isejima H, Matsuo T, Okura R, Yagita K, Kobayashi M, Okamura H (2003) Synchronization of cellular clocks in the suprachiasmatic nucleus. *Science* 302(5649): 1408-1412.
- Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, Ueda M, Block GD, Sakaki Y, Menaker M, Tei H (2000) Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* 288: 682-685.
- Yannielli PC, Harrington ME (2001) Neuropeptide Y in the mammalian system: effects on light-induced circadian responses. *Peptides* 22: 547-556.
- Zahm DS, Brog JS (1992) On the significance of subterritories in the "accumbens" part of the rat ventral striatum. *Neuroscience*, 50(4): 751-767.

12 ANEXOS

Se anexan copias de los artículos obtenidos con los resultados de esta tesis.

1. **Mendoza J**, Angeles-Castellanos M and Escobar C (2004) Differential role of the accumbens shell and core subterritories in food-entrained rhythms of rats. En prensa.
2. **Mendoza J**, Angeles-Castellanos M and Escobar C. Entrainment by a palatable meal induces food-anticipatory activity and c-Fos expression in reward related areas of the brain. Neuroscience NSC-04-1004. En revisión.
3. **Mendoza J**, Angeles-Castellanos M and Escobar C. A daily palatable meal without food deprivation entrains the suprachiasmatic nucleus of rats. En preparación.

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Behavioural Brain Research xxx (2004) xxx-xxx

BEHAVIOURAL
BRAIN
RESEARCHwww.elsevier.com/locate/abbr

Research report

Differential role of the accumbens Shell and Core subterritories in food-entrained rhythms of rats

Jorge Mendoza, Manuel Angeles-Castellanos, Carolina Escobar*

*Departamento de Anatomía, Facultad de Medicina, Edificio "B" 4° Piso,
Universidad Nacional Autónoma de México, México DF 04510, México*

Received 27 May 2004; received in revised form 12 August 2004; accepted 25 August 2004

Abstract

Restricted feeding schedules (RFS) entrain behavioral and physiological rhythms even in suprachiasmatic nucleus ablated animals, suggesting the existence of a food-entrained oscillator. The nucleus accumbens is an important structure for the expression of motivational behaviors and because its anatomical subterritories, Shell (Acc-Sh) and Core (Acc-Co) establish connections with different functional systems, they may participate in a differential way in food-entrainment. A first experiment, explored the role of Acc-Sh and Acc-Co in food-entrainment using the immunohistochemical detection of the protein c-Fos as a transcriptional activation marker. Experiment 2 tested the differential effect of Acc-Sh and Acc-Co, NMDA excitotoxic lesions. Lesioned rats were entrained to RFS and locomotor activity and free fatty acids (FFA) concentrations were evaluated. Results data show that in the Acc-Sh there is an increase of c-Fos immunoreactivity in food-entrained rats principally during feeding, whereas c-Fos expression in the Acc-Co region was increased during feeding and also anticipating mealtime. FFA were entrained in both lesioned groups, but the basal level was lower in Core-lesion rats. All rats exhibited food anticipatory activity (FAA). However, FAA was increased in Shell-lesioned animals and was almost abolished in the Core-lesion rats. These data indicate that the accumbens nucleus is involved with behavioral and metabolic food-entrainment, and that there is a differential role between both subregions.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Circadian; Food-anticipatory activity; Motivational; c-Fos; Free fatty acids

1. Introduction

Circadian rhythms in behavior and physiology are under the control of internal biological clocks. The suprachiasmatic nucleus (SCN) of the hypothalamus in mammals is the master circadian clock which is entrained principally by the light–dark cycle [18]. In the SCN, a set of clock genes and their protein products are driven by interlocking positive and negative feedback loops in a circadian way to generate oscillations [28]. Likewise, several peripheral tissues exhibit circadian oscillations of clock genes [2,3,6,13,37]. Ablations of the SCN render an animal arrhythmic [25,31], and also

eliminate the oscillations of clock genes in peripheral oscillators, indicating that peripheral oscillators depend on the integrity of the SCN [3,29]. However, this is controversial because recently it was reported that clock gene oscillations in peripheral tissues persist up to 20 cycles in animals with SCN lesions, suggesting that SCN is not necessary for the peripheral tissues oscillations [38].

When animals are exposed to restricted feeding schedules (RFS), allowing them to feed for a few hours every day, they develop food anticipatory activity (FAA) starting 2–3 h previous to mealtime. FAA can be observed in locomotor activity, wheel running, drinking behavior and food cup approaches [24,32]. In addition, physiological and metabolic functions are entrained by food availability [10,12,19]. SCN lesions do not prevent entrainment of behavioral, physiological and molecular parameters by daily RFS, suggesting the existence

* Corresponding author. Tel.: +52 55 5623 2422; fax: +52 55 5623 2425.
E-mail address: cescobar@ifisiol.unam.mx (C. Escobar).

of a food-entrainable oscillator (FEO) [8,15,23,32]. Diverse studies have tried to identify the anatomical and functional substrate of FEO by producing lesions in several nuclei in the central nervous system (CNS) [22,23,32], however, these lesions do not prevent FAA. Only lesions of the parabrachial nucleus (PBN) attenuated FAA, probably because it is a relay structure that mediates the entraining signal from the periphery to the CNS [9]. Expression of *mPer1* and *mPer2* in the cerebral cortex and hippocampus, and *c-Fos* in the hypothalamus are in phase with FAA, suggesting the possibility that these regions are involved in the behavioral manifestation of FEO [4,36]. For the study of the anatomical substrate of FEO, main attention has been focused in neural structures involved with energy balance and regulation of hunger and satiation. Although in FAA there is an evident increase of the motivational state, the mechanisms for increased motivation in the expression of food-entrained circadian rhythms have been poorly studied. There is evidence that restricted feeding providing a palatable diet entrains locomotor activity in hamsters, suggesting that the hedonic value of food is important for entrainment [1,21].

In the brain, the nucleus accumbens has been considered an interface between limbic and motor systems and is relevant for motivated behaviors and reward-related processes [24]. The nucleus accumbens is innervated by dopaminergic neurons from the ventral tegmental area (VTA) and ablation of dopaminergic neurons results in complex sensorimotor alterations and hypophagia, which has been attributed to a lack of reward associated with food ingestion [30,35]. According to its anatomical projections, the nucleus accumbens is subdivided in two regions, the accumbens Shell (Acc-Sh) which represents the ventromedial part and the accumbens Core (Acc-Co) which represents the dorsolateral area [16]. Evidence of pharmacological, anatomical and physiological studies suggests that the Acc-Sh and Acc-Co regions are differentially involved in specific behavioral states, like feeding behavior and motor activity [5,20]. The Acc-Co projects to the dorso-lateral ventral pallidum, which in turn projects to the motor system through the substantia nigra and subthalamic nucleus, and is linked to the extrapyramidal motor system. The pattern of its efferent connections closely resembles those of the caudate-putamen [16]. In contrast, the Acc-Sh is suggested to be more limbic in nature, because its efferent projections are closely connected to limbic output structures such as the VTA, amygdala and lateral hypothalamus (LH) [16]. This later relation between the Acc-Sh and LH is relevant for the control of feeding behavior [33,34].

In view of the anatomical and functional relations, both Acc-Sh and Acc-Co regions may be involved in the process of food-entrainment but may participate differentially in the expression of FAA. The aim of this study was first to determine whether the nucleus accumbens is involved with food-entrainment, and second to determine if there is a differential role in the regulation of food–circadian rhythms between both Acc-Sh and Acc-Co regions. We examined the role of the nucleus accumbens subterritories in food-entrained cir-

cadian rhythms with *c-Fos* immunoreactivity (*c-Fos-IR*) as a marker of transcriptional activity. In a second experiment we evaluated behavioral and metabolic entrainment in rats with specific excitotoxic lesions of either one of the accumbens subregions.

2. Materials and methods

2.1. Animals and housing

Male Wistar rats weighing 230–250 g at the beginning of the experiment were housed in groups of five individuals in transparent acrylic cages (40 cm × 50 cm × 20 cm). Rats were maintained in a 12:12 h light–dark cycle (lights on at 0700 designated as zeitgeber time ZT0) and constant temperature (22 ± 1 °C) with free access to food (Rodent Laboratory Chow 5001, IL, USA) and water unless otherwise stated. Experiments were approved by the national guide of care and use of animal experimentation of Mexican laws (Decreto de Ley de Protección a los Animales del Distrito Federal, Gaceta Oficial del DF, 26/02/02).

2.2. Experiment 1

2.2.1. Experimental design

To evaluate the *c-Fos-IR* during food-entrainment in both Acc-Sh and Acc-Co subregions, animals were assigned randomly to an ad libitum feeding condition (AL) as a control group, or to a restricted feeding schedule (RF) for 3 weeks with food access only for 2 h daily at the middle of the light phase from ZT6–ZT8 (1300–1500 h). On the last day of experimental manipulation, animals were randomly sacrificed at different time points ZT4, ZT5, ZT6, ZT8, ZT12, ZT14 ($n = 5$ per group and time) for immunohistochemistry. To evaluate the persistence of the food-entrained *c-Fos-IR* rhythm, another set of rats was assigned to two groups. The persistence group (RF-F) was entrained to RFS for 3 weeks, then allowed free food access for 5 days and left food deprived for 3 days. In the control fasting group (AL-F) free food access was available for 3 weeks and then was left food deprived for 3 days. For both groups, animals were perfused on the last day of fasting conditions at the same time points as the food-entrained animals.

2.2.2. Immunohistochemistry

Animals were deeply anaesthetized with sodium pentobarbital and were perfused transcardially with 250 ml saline solution (0.9%) followed immediately by 250 ml of 4% paraformaldehyde solution in 0.1 M phosphate buffer (PB; pH 7.2). Brains were removed and post-fixed in the buffered paraformaldehyde solution for 1 h, then transferred successively to 10, 20 and 30% sucrose solutions in 0.1 M PB. Frozen coronal sections of 40 µm were cut with a cryostat and collected in four series. One series of tissue was stained with cresyl violet, and another set was incubated during 72 h

at 4 °C in c-Fos antibody made in rabbit (Santa Cruz Biotechnology, USA) diluted 1:2500 in PB saline goat serum triton (PBSGT; PBS, 1% goat serum and 0.3% Triton X-100). Sections were rinsed three times for 10 min in phosphate buffer saline (PBS), then were incubated in biotinylated secondary antibody (goat anti-rabbit; Vector laboratories) 1:200 in PBSGT for 2 h. The tissues were rinsed again and then were incubated in avidin–biotin–peroxidase complex (Vectastain Elite ABC Kit; Vector Labs) for 2 h and washed again three times for 10 min in PBS. The tissue was reacted in diaminobenzidine (0.5 mg/ml, in trizma buffer 7.2) with hydrogen peroxide (35 µl, 30% H₂O₂). Sections were mounted in gelatin-coated slides, intensified with osmium tetroxide 0.1% for 30 s and dehydrated through a series of alcohol, cleared with xylene, and coverslipped with Permount (Fisher Chemicals).

2.2.3. Quantification of cells

The number of c-Fos-positive nuclei were counted unilaterally in matched coronal sections from all groups. Sections were selected in accordance with the stereotaxic atlas from Paxinos and Watson (Acc-Co, Interaural 10.20 mm; Acc-Sh Interaural 10.60 mm) [27]. Images of the corresponding cresyl violet sections were acquired to define the area of each region of the nucleus. Images were examined under a light microscope (Nikon Eclipse E600) and captured at a 10× magnification using a computerized image analysis system (Meta Vue series 4.5, Universal imaging corporation). A grid of 108 squares each 40 µm × 40 µm was superimposed on the image and immunopositive cells for c-Fos included under the grid were counted manually. To avoid counting false positives, background optical density (OD) was established in a nearby region lacking c-Fos-IR, only stained cells that reached or surpassed three fold the OD background were considered positive, whereas cells under this staining threshold were discarded. Cell number was transformed and is expressed as cells per square millimeter.

2.3. Experiment 2

2.3.1. Experimental design

Animals were randomly assigned to one of four groups: Shell-lesion, Shell-sham, Core-lesion and Core-sham. For metabolic analysis animals were entrained to RFS for 17 days and samples were obtained at several time points: ZT3, ZT4, ZT5, ZT6, ZT8 and ZT9 (mealtime at ZT6).

For behavioral analysis, the four groups had free access to food for 15 days (ad libitum), on day 16 they were entrained to RFS for 3 weeks with food access only for 2 h daily at the middle of the light phase (ZT6–ZT8), followed by 3 days in total food deprivation in order to evaluate persistence of FAA. Finally, rats were left with free food access for other 15 days.

2.3.2. Surgery

Animals were anaesthetized with chloral hydrate (10 mg/kg body weight) and secured in a Kopf stereotaxic

instrument with the incisor bar set at –3.3 mm. Lesions were induced by infusing 0.4 µl of NMDA per side (*N*-methyl-D-aspartate, Sigma; 10 mg/ml solution in PB 0.1 M, pH 7.4) with the following stereotaxic coordinates: Shell, AP +1.6, L ±0.4, DV –7.0; Core, AP +1.2, L ±1.8, DV –7.2 [27]. Each lesioned group had a sham operated control which received 0.4 µl of PB (0.1 M, pH 7.4) instead of NMDA.

2.3.3. Body weight and food intake

Body weight of all animals was registered before the surgery and during ad libitum conditions before starting RFS. In addition, to verify possible effects of the lesion on food ingestion, food intake for a 24 h interval was monitored once for each animal under ad libitum conditions.

2.3.4. Determination of free fatty acids

On day 15 of food-entrainment, animals were cannulated in the internal jugular vein with a polyethylene silicon tube (0.025 in. i.d. and 0.047 in. o.d.; Silastic Brand) filled with heparin (500 U/ml) as anti-coagulant. Blood samples (600 µl) were collected in Eppendorff (1.8 ml) tubes containing a clot-activator gel and were centrifuged at 2500 rpm during 15 min. Aliquots of 100 µl were processed with spectrophotometric methods for determination of free fatty acids (FFA) by using a colorimetric method as previously described [12].

2.3.5. Behavioral recordings

One week after metabolic sampling, cannulae were blocked and animals were housed individually in transparent plastic cages (30 × 45 × 20) and maintained in a sound-proof room under a 12:12 h light–dark cycle and constant temperature (22 ± 1 °C), with free access to food and water before any experimental manipulation. General activity was continuously monitored with infrared sensors attached to the lateral walls of the cages. Behavioral events were automatically stored in 10 min intervals for further analysis. Double-plotted actograms were obtained for each animal and activity profiles were constructed for each group with the mean activity for each feeding condition (AL, RF, fasting). Analysis was performed with the SPADI (Sistema de Procesamiento y Adquisición de Datos. Version 1.1.1) designed for our laboratory.

2.3.6. Histology

At the end of the behavioral experiments, animals were killed with an overdose of sodium pentobarbital and perfused intracardially with 250 ml of 0.9% saline followed by 250 ml of 4% paraformaldehyde in a 0.1 M PB and then cryoprotected overnight in 10, 20 and 30% of sucrose. Brains were frozen and cut in 40 µm coronal sections, alternate sections were mounted on gelatin-coated glass slides, then stained with cresyl violet. Cellular damage and lesion placement were verified with a light microscope. Animals with incomplete lesions were discarded from the study.

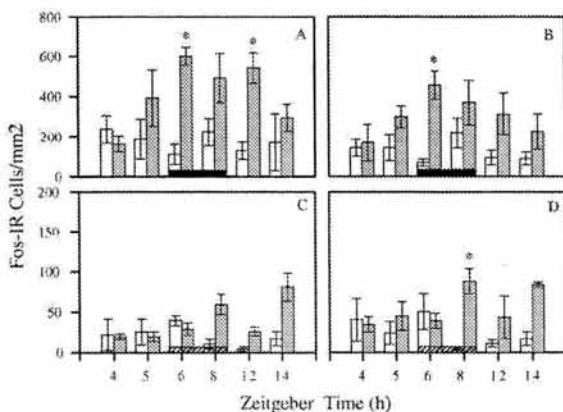


Fig. 1. Mean number \pm S.E.M. of Fos-IR cells in Acc-Sh (A) and Acc-Co (B) in RF (gray bars) and AL rats (white bars). (C) and (D) Represent number of Fos-IR cells on the Acc-Sh and Acc-Co, respectively, during fasting after RFS (gray bars) and after ad libitum (white bars). Horizontal bars represent mealtime or expected mealtime (stripes). * $p < 0.05$ Post-hoc entrainment vs. ad libitum.

2.3.7. Statistical analyses

Data were classified by groups and time and are represented as mean \pm S.E.M. Number of c-Fos-IR cells were compared with a two-way ANOVA for the main factors group and time. Body weight as well as food intake were analyzed with a one-way ANOVA for independent measures for the factor group (lesion versus sham). Metabolic variations in

serum concentration of FFA, and locomotor activity, under RFS and during fasting conditions, were evaluated with a two-way ANOVA for the factors group (lesion versus sham) and time, as a factor of repeated measures. All analyses were followed by a Tukey multiple-comparisons post-hoc test with α set at $p < 0.05$. Statistical analysis was performed with Statistica for Windows version 4.5 (StatSoft, 1993).

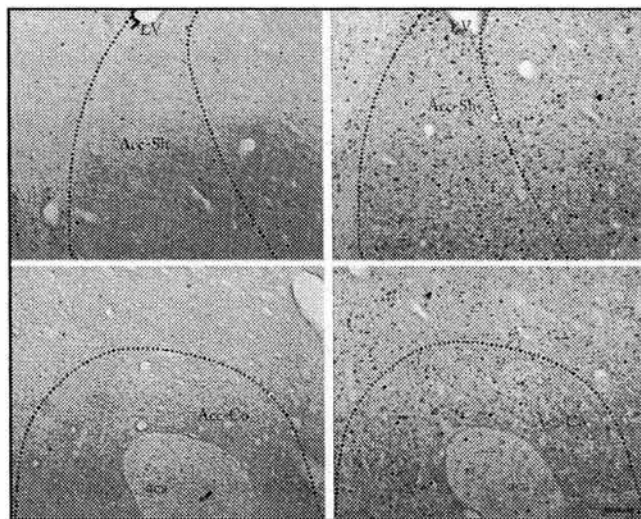


Fig. 2. Photomicrographs of Fos-IR in Acc-Sh and Acc-Co of animals under AL (left) and RFS (right) at ZT6. LV, Lateral ventricle; aca, anterior commissure. Dotted lines represent the counted area. Scale bar: 120 μ m.

3. Results

3.1. Experiment 1

3.1.1. *c-Fos* expression

The number of *c-Fos*-IR cells was increased in both Acc-Sh and Acc-Co in food-entrained rats. The Acc-Sh of the RF group had significantly more *c-Fos*-IR cells than the AL group at ZT6, mealtime, and at ZT12, 6 h after feeding. Although not statistically significant, a marginal increase was observed at ZT8 (Figs. 1A and 2). In the Acc-Co a marginal increase started in *c-Fos*-IR of RF rats at ZT5 and a statistical increase was observed at ZT6 (Figs. 1B and 2). Because animals for the ZT6 point in the RF group remained unfed until sacrifice, the *c-Fos*-IR at this time point was mainly associated with the anticipatory activation. Although there was not statistical difference, there was also an increase in ZT12 (Fig. 1B). The two-way ANOVA confirmed a main effect between AL and RF in the Acc-Sh ($F(1,42) = 25.78; p < 0.001$) and in Acc-Co ($F(1,41) = 21.04; p < 0.001$). In the time factor, statistical analysis did not show a significant effect (Acc-Sh, $F(5,41) = 1.081$; NS; Acc-Co, $F(5,42) = 2.06$; NS). Furthermore, there was a significant group \times time interaction in the Acc-Sh ($F(5,42) = 4.76; p < 0.001$), but not interaction effect for Acc-Co ($F(5,41) = 1.52$; NS).

A general effect during fasting was a lower number of *c-Fos*-IR cells in both groups. There was not a clear persistence of the food-entrained pattern in the RF-F group. However, the two-way ANOVA indicated a significant difference between RF-F and AL-F groups in both Acc-Sh and Acc-Co regions (Acc-Sh, $F(1,40) = 9.335; p < 0.003$; Acc-Co, $F(1,40) = 9.781; p < 0.003$; Fig. 1C and D), post-hoc analysis showed only difference between groups in Acc-Co at ZT8 ($p < 0.05$).

3.2. Experiment 2

3.2.1. Histology

In the sham-lesioned animals, no signs (cell loss or gliosis) of lesion-induced damage were observed. Shell lesions were mainly restricted to the medial and ventral regions. In some Shell-lesioned animals, gliosis was observed in the lateral and medial septum apparently affected by the trajectory of the injection needle or distension of the lateral ventricles. Evaluation of the Core-lesions revealed a marked cell loss and intense gliosis in a discrete area surrounding the injection site and shrinkage of the Core region around the anterior commissure. Fig. 3 shows an illustration of the extension of maximal and minimal lesions in representative rats with Shell and Core lesions.

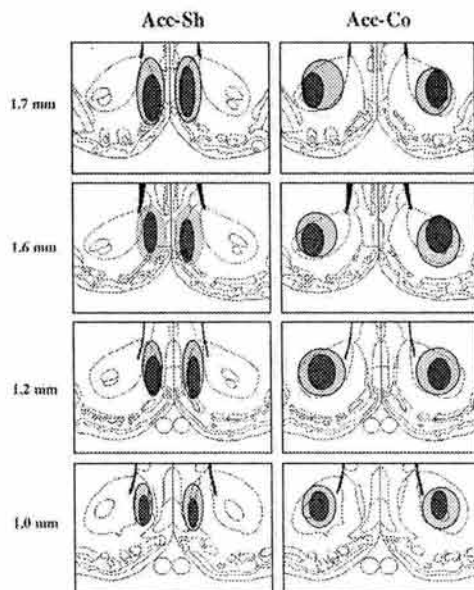


Fig. 3. Schematic representation of lesions extent (maximum, light shading; minimum, dark shading) of the Acc-Sh (left) and Acc-Co (right). Representative reconstruction of serial coronal sections are +1.7 mm anterior through +1.0 mm posterior to bregma (based on the Atlas of Paxinos and Watson, 1998).

3.2.2. Body weight and food intake

Both Shell-sham and Shell-lesion animals increased their weight throughout the experiment. Shell-lesion animals gained more weight than Shell-sham under ad libitum conditions ($F(1,15) = 4.51; p < 0.05$) (Table 1). Core-sham gained weight in a similar proportion as the previous groups, however, the Core-lesion group gained weight in a lower proportion and when compared to the Core-sham group the weight was significantly lower ($F(1,12) = 11.70; p < 0.005$) (Table 1). The effect of the lesion on food ingestion during the 24 h interval was also different between the Shell and Core groups. Food intake was enhanced in Shell-lesion animals and this effect was significant compared with the Shell-sham group ($F(1,14) = 9.60; p < 0.0078$). In contrast, Core-lesion animals showed a strong decrease in ingested food during the experiment ($F(1,12) = 122.11; p < 0.0001$) (Table 1), in fact, for some animals food had to be placed in their proximity.

Table 1
Body weight and food intake in sham and lesioned animals

	Shell-sham ($n = 8$)	Shell-lesion ($n = 9$)	Core-sham ($n = 7$)	Core-lesion ($n = 7$)
Body weight (g)	280.12 \pm 5.02	293.66 \pm 3.24 ^a	281.28 \pm 4.13	252.28 \pm 4.42 ^a
Food intake (g)	23.68 \pm 0.86	27.00 \pm 0.62 ^a	24.85 \pm 1.03	12.00 \pm 0.53 ^a

All values are mean \pm S.E.M.

^a $p < 0.05$ Difference between NMDA lesioned animals and their respective control (Tukey post-hoc test).

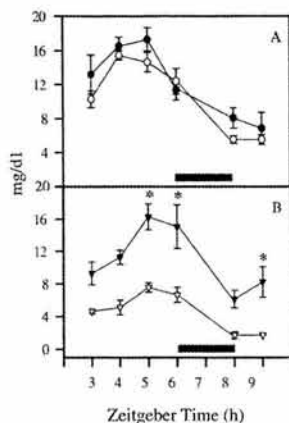


Fig. 4. Temporal profile (mean \pm S.E.M.) of free fatty acids of rats exposed for 3 weeks to RFS (A) for the Shell-lesion rats (white circles) and their controls (black circles) and for (B) Core-lesion rats (white triangles) and their controls (black triangles). The horizontal black bar indicates mealtime. * $p < 0.05$ Lesion vs. sham.

3.2.3. Serum free fatty acids

The diurnal rhythm of FFA was entrained to RFS. Serum levels of FFA were increased before meal time and declined after feeding in the Shell-sham and Shell-lesioned animals

(Fig. 4A). The ANOVA indicated a significant difference in the time factor ($F(5,50) = 47.15$; $p < 0.0001$), but there was not a difference between groups ($F(1,10) = 1.24$; NS). Also, both Core-sham and Core-lesion groups showed an increase in FFA plasma concentrations anticipating meal time ($F(5,50) = 11.43$; $p < 0.0001$), however, mean FFA levels were lower in the Core-lesion animals (Fig. 4B). The ANOVA indicated a significant difference between groups ($F(1,10) = 123.26$; $p < 0.0001$).

3.2.4. Food-anticipatory activity

During the first 15 days under food ad libitum conditions, all groups showed a clear diurnal rhythm of activity. Statistical analysis showed that there was not a difference in the intensity of activity between Shell-sham and Shell-lesion groups ($F(1,17) = 1.06$; NS) and there was a difference in time factor, indicating circadian rhythms entrained to the light–dark cycle ($F(23,391) = 23.40$; $p < 0.0001$) (Figs. 5A, C and 6A). For the Core-sham and Core-lesion groups there was a clear diurnal rhythm of locomotor activity ($F(23,368) = 15.85$; $p < 0.00001$) and there was not a difference in intensity between groups ($F(1,16) = 0.0001$; NS) (Figs. 5B, D and 6D). During RFS, Shell-sham and Shell-lesion animals exhibited a clear FAA. In the Shell-lesion group, FAA started 2 h before the Shell-sham group. General activity level was increased in the nocturnal activity as well as during FAA and in some animals there was a large phase advance in this activity (Figs. 5C and 6B).

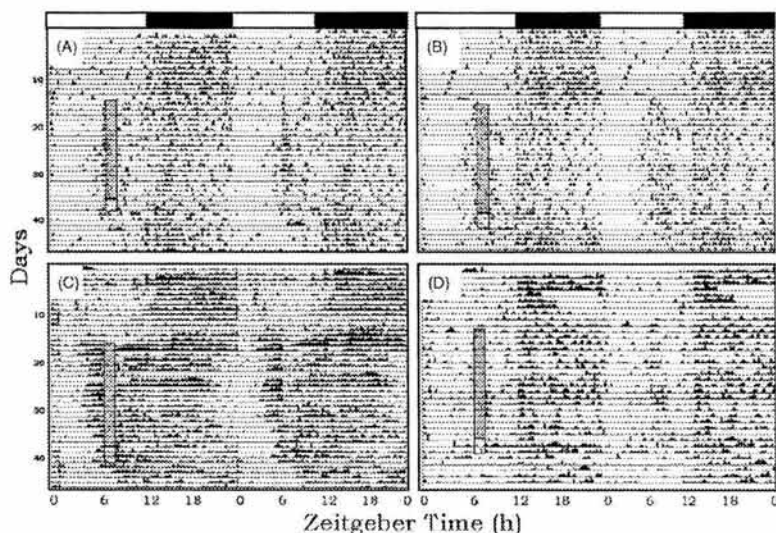


Fig. 5. Representative double-plotted actograms of daily general activity of rats kept in light–dark cycle 12:12 h. During the first 15 days animals had free food access (ad libitum). Rats were entrained to RFS (vertical gray bar) for 3 weeks, followed by 3 days of fasting conditions (vertical white bar). (A) and (B) Show a representative samples of Shell-sham and Core-sham rats respectively. (C) and (D) Are two representative animals with NMDA lesions in Shell and Core, respectively.

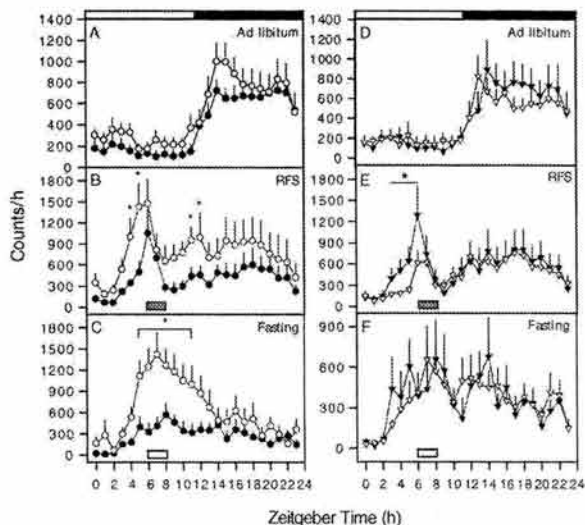


Fig. 6. Activity profiles of locomotor activity of rats with sham lesions (black symbols) and NMDA lesions (white symbols) in Shell (left side) and Core (right side) during AL feeding condition (A–D), under RFS (B–E) and in 3 days in fasting conditions (C–F). White and black bars indicate the light–dark cycle. Horizontal gray bar in RFS plots indicate mealtime, whereas horizontal white bar in fasting plots, indicate the expected mealtime. $p < 0.05$ Lesion vs. sham.

Statistical analysis indicated a main effect between groups for FAA ($F(1,16) = 6.93$; $p < 0.018$). In animals with Core-lesions FAA was almost absent, there was a small increase of activity after mealtime and not a clear FAA as in the Core-sham (Figs. 5B, D and 6E). This difference between groups in FAA intensity was significant ($F(1,17) = 5.70$; $p < 0.02$). Some animals of the Core-lesion group did not show FAA during the first 10 days of food-entrainment and it developed partially in the last days of entrainment (Fig. 5D). Nocturnal locomotor activity of these animals was not altered by the lesion. During fasting conditions, persistence of food-entrained activity was observed in all groups. Shell-lesion animals exhibited enhanced locomotor activity which was significantly higher than their controls ($F(1,16) = 12.52$; $p < 0.002$; Fig. 6C). There was no difference in intensity and onset time between Core-sham and Core-lesion animals ($F(1,15) = 0.6804$; NS; Fig. 6F).

4. Discussion

The response observed with the c-Fos-IR suggests that both Acc-Sh and Acc-Co subregions are involved with the expression of FAA, and that there is a functional difference between them during food-entrainment.

In the Acc-Co there was an increase starting in ZT5, followed by a significant increase in ZT6, in addition increased c-Fos-IR was observed after mealtime suggesting that this region is involved with the behavioral activation during FAA

and during feeding. In the Acc-Sh region c-Fos-IR was increased at mealtime, at ZT6, and in the time points following food ingestion indicating mainly a relation with consummatory behavior. Similar differential data between consummatory subregions were described in a microdialysis study showing that extracellular dopamine levels increased in Acc-Co evoked by a conditioned stimuli during the orienting and approach behavior to food, while in Acc-Sh dopamine levels increased during the first minutes of consumption of a highly palatable food [7]. These observations and the present c-Fos-IR data, point out the differential relation of both subregions in food-entrained behavior, indicating a main role of the Acc-Co with anticipation and a main role of Acc-Sh with consummatory behavior and possibly with a reward response during feeding. In addition, during fasting conditions a persistence of the food-entrained c-Fos-IR pattern was only observed in Acc-Co indicating a link with a food-entrainable pacemaker. Due to the relationship of Acc-Co with the motor system and for its important role in food-seeking behaviors [7], these results support the hypothesis that the Acc-Co may be a relevant structure for the expression of FAA.

In the second experiment, the NMDA lesions of Acc-Sh and Acc-Co also showed differential effects. Under ad libitum conditions Shell-lesion rats increased their food intake and their body weight in a higher rate than their sham controls. Animals with Core-lesions exhibited a low body weight throughout the study and showed a critical decrease in food intake. In these later rats locomotor activity was not altered as observed in the general activity during the first 15 days

of baseline monitoring. Thus we assume that the decrease of ingestion was not due to a locomotor impairment. All groups showed entrainment of FFA although in Core-lesion rats the general basal level of this metabolite was significantly decreased. The lower levels of FFA can be explained by the decrease in food intake and low weight gain in Core-lesioned animals. All groups showed also FAA, however, in Shell-lesion rats the onset time was advanced and general activation was increased, while Core-lesion rats showed a low or non-FAA in the first days of entrainment.

The contrasting effect of Core and Shell-lesions may be attributed to specific anatomical connections associated with both subregions of the nucleus accumbens. Whereas the Acc-Co establishes efferent projections to the motor system, the efferents of the Acc-Sh have more limbic characteristics. A differential role between Acc-Sh and Acc-Co in feeding has been evidenced blocking excitatory amino acid input to the Acc-Sh, which resulted in a marked stimulation on feeding behavior, while the same manipulation in Acc-Co, impaired the response to food during an instrumental test [5,14].

Evidence obtained in this study suggests a relevant role of Acc-Sh for the control and inhibition of feeding; first, basal food ingestion was increased in Acc-Sh lesion animals, and second, c-Fos-IR was increased in Acc-Sh during feeding. This suggestion finds support in the anatomical relation between Acc-Sh and LH via an inhibitory gabaergic pathway as main neurotransmitter [33,34]. Inhibition of the Acc-Sh function due to an injection of a GABA agonist increases food intake and produces an increase of c-Fos expression in LH [34]. Thus, the increase in body weight and food intake due to Shell-lesions, can be explained as a disinhibition of LH due to the absence of the GABA projections from the Acc-Sh. In addition, evidence obtained in this study also suggests that Acc-Sh may be a region that inhibits locomotor activity as an output of FEO, because in the Acc-Sh lesioned animals, FAA during RFS and during fasting conditions was increased.

In contrast, the reduced amplitude and intensity of FAA observed in Core-lesion rats suggests that this region may be involved with the expression of FEO's output. The Acc-Co is related to a different functional system than the Acc-Sh, because the Acc-Co is functionally related with the caudate-putamen. Previous studies have described that specific destruction of dopamine terminals in the caudate-putamen region in rats inhibits feeding, but not locomotion [30]. At the molecular level, dopamine deficient mice become hypophagic and die of starvation by 4 weeks of age, suggesting that regulated release of dopamine within the striatum is required for the integration of salient cues that are necessary for feeding [35]. In despite that there was a clear decrease in FAA of Acc-Co lesioned animals, we can not argue that Acc-Co is the FEO, because FAA and anticipation of FFA were not totally absent. In addition, this study did not address other variables that can be driven by FEO, like corticoesterone and clock genes expression in several regions of the brain, which are entrained with RFS and should be modified in animals with Acc-Co lesions. We have suggested that

the FEO's clock network is constituted by a distributed system [4], for this model it is possible that the Acc-Co is part of this network. In such a case its lesion would produce a decrease of FAA but not its total absence.

A decrease in FAA can be due to weak entraining signal to FEO, as well as due to a modification in the output pathway. Previous studies have described that the nutritious value and the size of a meal are relevant to attain properties as a zeitgeber [21], when the meal size is reduced during RFS, no FAA is observed. In addition, a previous study showed a decrease in FAA due to PBN lesions [9]. The most likely interpretation of these data was that the PBN is a relay nucleus for the entraining signal elicited by food and the gut. Thus, the lesion of PBN may decrease the intensity of food related signals and thus produce a lower intensity of FAA. Present data also describe a decrease in FAA intensity due to Acc-Co lesions, we suggest based on the anatomical relation of this region, that this decrease is mainly due to an alteration in the output pathway or as described in the previous paragraph, due to an alteration in the oscillator's network itself.

It is important to point out that despite a clear decrease of FAA in Core-lesion rats, no decrease was observed for the nocturnal activity, which showed similar values as the other groups as can be observed in Figs. 5 and 6. This specific effect on FAA confirms that effects were not due to a locomotor impairment and suggests a specific role of the Acc-Co region as output for the behavioral expression of FEO. The prefrontal cortex, including the prelimbic and anterior cingulate cortex, project to the Acc-Co, but not to the Acc-Sh [16]. Recent evidence has described a rhythm in clock genes expression in the prefrontal cortex which is entrained by feeding schedules [36]. These findings have suggested that the cortex may be a circadian oscillator, and in this case, the Acc-Co may be part of the output pathway to the principal motor structures for the expression of behavioral food-entrained rhythms. In addition, prefrontal cortex and Acc-Co are interconnected via glutamatergic fibers and this circuit has been implicated with the acquisitions of instrumental behaviors [17]. A previous report described that intraperitoneal injection of an antagonist of NMDA receptors, MK-801, impaired FAA expression in rats [26]. Our results indicating an impairment of FAA in animals with Acc-Co lesions, in combination with the evidence of the study cited above, suggest that the expression of FAA may require the integrity of this corticostriatal network. This possibility is further supported by a study which described that in the striatum and cortex *NPAS2* gene is expressed in a circadian manner and that in knock mice of the *NPAS2* gene FAA is deficient. These mice also show several problems to adapt to this food regimen and to gain weight [11]. Interesting, the nucleus accumbens is part of the ventral striatum, suggesting that at physiological and molecular level, manipulations of this region could be critical for food-entrainment.

A previous study reported that large accumbens lesions in rats do not abolish FAA [22]. In that study, authors reported a decrease of general activity by complete lesions of

accumbens including several structures like the septum, ventral pallidum, vertical limb of the diagonal band, the bed nucleus of stria terminalis, anterior and ventral caudatoputamen and paraventricular thalamic nucleus. The weak FAA was attributed to the general state of hypoactivity and the conclusion was that this structure was not involved with the FEO. However, the present study does not agree with such findings, because we have described a differential role of accumbens subregions and present data indicate that both regions play a relevant role for food-entrainment.

At the moment there is not a clear evidence of an anatomical location of FEO. The present study adds information on a differential role of the two subregions of the accumbens as two components of the distributed system for the food-entrainable system. For this model Acc-Sh may be involved with the consummatory and motivational aspects of ingestion and thus with FEO's inputs and Acc-Co is involved with the expression of FAA and may be an output or an element of the clock's network of FEO.

Acknowledgement

This work was supported by grants DGAPA-UNAM PAPIIT-IN-203803 to C.E. and Ph.D. fellowship (CONA-CyT) to J.M.

References

- Abe H, Rusak B. Anticipatory activity and entrainment of circadian rhythms in Syrian hamsters exposed to restricted palatable diets. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 1992;263:R116–24.
- Abe M, Herzog ED, Yamazaki S, Straume M, Tei H, Sakaki Y, et al. Circadian rhythms in isolated brain regions. *J Neurosci* 2002;22:350–6.
- Amir S, Waddington-Lamont E, Robinson B, Stewart J. A circadian rhythm in the expression of PERIOD 2 protein reveals a novel SCN-controlled oscillator in the oval nucleus of the bed nucleus of the stria terminalis. *J Neurosci* 2004;24:781–90.
- Angeles-Castellanos M, Aguilar-Roblero R, Escobar C. e-Fos expression in the hypothalamic nuclei of food-entrained rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;286:R158–65.
- Baldo BA, Sadeghian K, Baso AM, Kelley AE. Effects of selective dopamine D1 and D2 receptor blockade within nucleus accumbens subregions on ingestive behavior and associated motor activity. *Behav Brain Res* 2002;137:165–77.
- Balsalobre A. Clock genes in mammalian peripheral tissues. *Cell Tissue Res* 2002;309:193–9.
- Bassareo V, Di Chiara G. Differential responsiveness of dopamine transmission to food-stimuli in nucleus accumbens shell-core compartments. *Neuroscience* 1999;113:324–36.
- Damiola F, Le Minh N, Preitner N, Kornmann B, Fleury-Olela F, Schibler U, et al. Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev* 2000;14:2950–61.
- Davidson AJ, Cappendijk SL, Stephan FK. Feeding-entrained circadian rhythms are attenuated by lesions of the parabrachial region in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000;278:R1296–304.
- Diaz-Muñoz M, Vazquez-Martinez O, Aguilar-Roblero R, Escobar C. Anticipatory changes in liver metabolism and entrainment of insulin, glucagon, and corticosterone in food-restricted rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000;279:R2048–56.
- Dudley CA, Erbel-Sieler C, Estill SJ, Reick M, Franken P, Pitts S, et al. Altered patterns of sleep and behavioral adaptability in NPAS2-deficient mice. *Science* 2003;301:379–83.
- Escobar C, Diaz-Muñoz M, Encinas F, Aguilar-Roblero R. Persistence of metabolic rhythmicity during fasting and its entrainment by restricted feeding schedules in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 1998;274:R1309–16.
- Granados-Fuentes D, Prolo LM, Abraham U, Herzog ED. The Suprachiasmatic nucleus entrains, but does not sustain circadian rhythmicity in the olfactory bulb. *J Neurosci* 2004;24:615–9.
- Hanlon EC, Baldo BA, Sadeghian K, Kelley AE. Increases in food intake or food-seeking behavior induced by GABAergic, opioid, or dopaminergic stimulation of the nucleus accumbens: is it hunger? *Psychopharmacology* 2004;172:241–7.
- Hara R, Wan K, Wakamatsu H, Aida R, Moriya T, Akiyama M, et al. Restricted feeding entrains liver clock without participation of the suprachiasmatic nucleus. *Genes Cell* 2001;6:269–78.
- Heimer L, Zham DS, Churchill L, Kalivas PW, Wehlmann C. Specificity in the projection patterns of accumbens core and shell in the rat. *Neuroscience* 1991;41:89–125.
- Kelley AE. Neural integrative activities of nucleus accumbens subregions in relation to learning and motivation. *Psychobiology* 1999;27:198–213.
- Klein DC, Moore RY, Reppert SM. *The mind's clock*. NY: Oxford University Press; 1991.
- Krieger DF. Food and water restriction shifts corticosterone, temperature, activity and brain amine periodicity. *Endocrinology* 1974;95:1195–201.
- Maldonado-Irizarri CS, Kelley AE. Excitotoxic lesions of the core and shell subregions of the nucleus accumbens differentially disrupt body weight regulation and motor activity in rat. *Brain Res Bull* 1995;38:551–9.
- Mistlberger RE, Rusak B. Palatable daily meals entrain anticipatory activity rhythms in free-feeding rats: dependence on meal size and nutrient content. *Physiol Behav* 1987;41:219–26.
- Mistlberger RE, Mumby DG. The limbic system and food-anticipatory circadian rhythms in the rat: ablation and dopamine blocking studies. *Behav Brain Res* 1992;47:159–68.
- Mistlberger RE. Circadian food anticipatory activity: formal models and physiological mechanism. *Neurosci Biobehav Rev* 1994;18:171–95.
- Mogenson GJ, Jones DJ, Yim CY. From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. *Prog Neurobiol* 1980;14:69–97.
- Moore RY, Eichler VB. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic nucleus lesions in rats. *Brain Res* 1972;42:201–6.
- Ono M, Shibata S, Minamoto Y, Watanabe S. Effect of the non-competitive N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist MK-801 on food-anticipatory activity rhythm in the rat. *Physiol Behav* 1996;59:585–9.
- Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 4th ed. San Diego, USA: Academic Press; 1998.
- Reppert SM, Weaver DR. Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol* 2001;63:647–76.
- Sakamoto K, Nagase T, Fukio H, Horikawa K, Okada T, Tenaka H, et al. Multitissue circadian expression of rat period homolog (rPer2) mRNA is governed by the mammalian circadian clock, the suprachiasmatic nucleus in the brain. *J Biol Chem* 1998;273(42):27039–42.
- Salamone JD, Mahan K, Rogers S. Ventrolateral striatal dopamine depletions impair feeding and food handling in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1993;44:605–10.
- Stephan FK, Zuckler I. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1972;69:1583–6.

- [32] Stephan FK. The "other" circadian system: food as a zeitgeber. *J Biol Rhythms* 2002;17:284-92.
- [33] Stratford TR, Kelley AE. GABA in the nucleus accumbens shell participates in the central regulation of feeding behavior. *J Neurosci* 1997;17:4434-40.
- [34] Stratford TR, Kelley AE. Evidence of a functional relationship between the nucleus accumbens shell and lateral hypothalamus subserving the control of feeding behavior. *J Neurosci* 1999;19:11040-8.
- [35] Szczyńska MS, Kwok K, Brot MD, Marck BT, Matsumoto AM, Donahue BA, et al. Dopamine production in the caudate putamen restores feeding in dopamine-deficient mice. *Neuron* 2001;30:819-28.
- [36] Wakamatsu H, Yoishinobu Y, Aida R, Moriya T, Akiyama M, Shibata S, et al. Restricted-feeding-induced anticipatory activity rhythm is associated with a phase-shift of the expression in mPer1 and mPer2 mRNA in the cerebral cortex and hippocampus but not in the suprachiasmatic nucleus of mice. *Eur J Neurosci* 2001;13:1190-6.
- [37] Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, Ueda M, et al. Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* 2000;288:682-5.
- [38] Yoo SH, Yamazaki S, Lowrey PL, Shimomura K, Ko CH, Buhr ED, et al. PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 5339-46.

Fecha: Fri, 19 Nov 2004 13:20:56 -0500
De: "Neuroscience, Editorial" <neuroscience@journal-office.com>
Para: cescobar@ifc.unam.mx
Cc: keiji@postman.riken.go.jp, neuroscience@journal-office.com
Asunto: NSC-04-1004: Interim Decision

Ms. No.: NSC-04-1004
Title: ENTRAINMENT BY A PALATABLE MEAL INDUCES FOOD-ANTICIPATORY ACTIVITY AND c-FOS EXPRESSION IN REWARD RELATED AREAS OF THE BRAIN

Dear Dr. Escobar,

We have now received the reviews of your manuscript referenced above. While the reviewers believe that this paper would ultimately make a significant contribution to the literature and could be acceptable for publication in Neuroscience, they have also raised a number of serious concerns. These concerns are outlined in their reviews which have been included below. We invite you to revise and resubmit the manuscript.

Please carefully address the issues raised in the attached comments, point by point, and make appropriate changes in the manuscript, or provide a suitable rebuttal to any specific request for change that you believe is unwarranted. When the revised manuscript is received, it will be sent for re-review.

You may submit your revision online by logging onto the Neuroscience Editorial Manager:
<http://nsc.edmgr.com/>

Username: Your username is: ritmos

Password: Your password is: escobar384

You can find the manuscript record listed under "Submissions Needing Revisions". Click "Submit Revision" to submit your revision. (If you have forgotten your password, please click the "Forget your password" link located on the log-in screen.)

When submitting your revised paper, please include a separate document called "Response to Reviews" detailing your responses to the comments of the reviewers. To facilitate the electronic publication of your manuscript, we request that your manuscript text, tables and figure legend be submitted in an editable format (Word or LaTeX only), and all figures uploaded individually. TIF or EPS files are the preferred formats for figures; however, PowerPoint, Word, and Excel files will also be accepted. DPI minimums are as follows:

- Line art must be at least 1000dpi.
- Line/tone (combination of photographs and lines or labels) must be at least 500dpi.

Thank you and we look forward to receiving your revised manuscript.

With kind regards,

David G. Amaral
Chief Editor
Neuroscience

Keiji Tanaka
Section Editor
Neuroscience

Neuroscience Editorial Office
Elsevier Science USA
525 B Street, Suite 1900
San Diego, CA 92101-4495
USA
FAX: 619-699-6855
E-mail: neuroscience@journal-office.com

Section Editor: Dr. Keiji Tanaka.

ENTRAINMENT BY A PALATABLE MEAL INDUCES FOOD-ANTICIPATORY
ACTIVITY AND c-FOS EXPRESSION IN REWARD RELATED AREAS OF THE BRAIN

Jorge Mendoza, Manuel Angeles-Castellanos and Carolina Escobar

Departamento de Anatomía, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México,
México DF, 04510, México.

Running title: Entrainment by a palatable meal.

Corresponding Author:

Dra. Carolina Escobar
Departamento de Anatomía, Facultad de Medicina
Edificio "B" 4º Piso
Universidad Nacional Autónoma de México
México DF 04510
México
Tel. (52-55) 5623-2422
Fax. (52-55) 5623-2425
E-mail: cescobar@ifc.unam.mx

Abbreviations

AA, anticipatory activity.
Acc-Co, accumbens core.
Acc-Sh, accumbens shell.
CeA, central nucleus of the amygdala.
DMH, dorsomedial hypothalamic nucleus.
FEO, food-entrainable oscillators.
FFA, free fatty acids.
LD, light-dark cycle.
LH, lateral hypothalamic nucleus.
PFC, prefrontal cortex.
PME, palatable meal entrainment.
PVN, paraventricular hypothalamic nucleus.
RFS, restricted feeding schedules.
SCN, suprachiasmatic nucleus.
VMH, ventromedial hypothalamic nucleus.
ZT, zeitgeber time.

Abstract (293 words)

Rats maintained under restricted feeding schedules develop food-anticipatory activity (AA) and entrainment of physiological parameters. Food entrainment is independent of the suprachiasmatic nucleus and depends on food-entrainable oscillators (FEO). Restricted feeding schedules (RFS) lead animals toward a catabolic state and increase their food driven motivation, suggesting that in this process metabolic and reward related mechanisms are implicated. This study explored if taste driven motivation is sufficient to entrain the FEO. To address this question, we evaluated whether daily fixed access to a highly palatable meal (PME) entrained locomotor activity, serum glucose and free fatty acids (FFA) concentrations in rats maintained without food deprivation. The entrained response of PME rats was compared with rats entrained to RFS. In a second experiment, we used c-Fos-IR to identify structures in the central nervous system involved with PME. Rats showed AA to a daily palatable meal, with a lesser intensity than rats entrained to RFS. AA persisted at least for 4 cycles after interrupting palatable-meal, suggesting that this persistence depends on a circadian oscillator. Glucose and FFA were not entrained in PME rats, c-Fos expression in limbic system nuclei was in phase with meal time and this oscillatory pattern persisted, but not in the hypothalamus. These results suggest that for the expression of AA, food deprivation, i.e. a catabolic state is not necessary, that an increase in motivational state by the reward properties of taste is sufficient to entrain behavior and that structures in the limbic system oscillate due to reward entrainment. The present study indicates that at least two different mechanisms are associated with food entrainment, metabolic and motivational, and suggests that the FEO may be a multi-oscillatory system distributed over different regulatory systems in the brain.

Keywords: Food-entrained oscillator, circadian rhythms, taste, limbic system, hypothalamus.

In mammals circadian rhythms in behavior and physiology are driven by a central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus (SCN) of the hypothalamus (Klein et al., 1991). In addition, there are other circadian oscillators in the central nervous system and in peripheral tissues (Yamazaki et al., 2000; Abe et al., 2002; Balsalobre, 2002; Granados-Fuentes et al., 2004; Amir et al., 2004), which are in synchrony with the SCN and are thought to be organized in a hierarchical way in which the SCN couples daily rhythms in all these tissues (Reppert and Weaver, 2002; Hastings et al. 2003). The SCN is entrained by the light-dark cycle, and in turn transmits its phase and period to circadian oscillators via neuronal or humoral outputs (Buijs and Kalsbeek, 2001). SCN ablations eliminate or disrupt circadian organization (Moore and Eichler, 1972), but do not prevent the induction of circadian rhythms in peripheral oscillators by restricted feeding schedules (RFS; Hara et al., 2001; Balsalobre, 2002). In addition, RFS uncouple peripheral oscillators from the SCN in intact animals (Damiola et al., 2000; Stokkan et al., 2001). Animals under RFS display daily rhythms of food-anticipatory activity (AA) and entrainment of physiological parameters (Mistlberger, 1994; Stephan, 2002; Escobar et al., 1998; Diaz-Muñoz et al., 2000), which are considered to be driven by food-entrainable oscillators (FEO) independent of the SCN (Stephan, 2002). The anatomical substrate of FEO is not yet known. Lesions in several structures of the central nervous system do not prevent food-entrainment (Mistlberger, 1994; Stephan, 2002). In mice RFS lead to entrainment of *Per1* and *Per2* clock genes in the cerebral cortex and hippocampus, and in rats RFS entrain c-Fos expression in the dorsomedial and lateral hypothalamus, which peak in phase with meal time, suggesting the possibility that these nuclei are involved in the manifestation of FEO (Wakamatsu et al., 2001; Angeles-Castellanos et al., 2004).

During RFS animals are exposed to an alternation of long fasting-short meal intervals, which lead them to a chronic catabolic state. In such conditions animals develop an increased state of arousal

and food-oriented drive, which suggests that a metabolic and a reward process underlie food-entrainment.

Restricted feeding with a palatable diet as well as a brief access to sucrose can produce AA in hamsters and rats, suggesting that the hedonic value of food is relevant for entrainment (Mistlberger and Rusak 1983; Kucie and Rusak, 1992; Pecoraro et al., 2002).

Several nuclei of the limbic system are involved with the positive reaction to reward properties of food (Berridge, 2003). In monkeys, activation of the prefrontal cortex (PFC) has been implicated in the reaction to a favorite taste, and in rats neurons of PFC respond to the positive affective value of food (Bassaero and DiChiara, 1997; Rolls, 2000). The amygdala has anatomical connections with neural circuits in the hypothalamus for the control of feeding behavior (Petrovich et al., 2002) and has been related with the response to palatable meals, especially the central nucleus of the amygdala (Pomonis et al., 2000). The nucleus accumbens has been considered as an interface between limbic and motor systems (Mogenson, 1980) and also regulates the reward properties in feeding behavior (Stratford and Kelley, 1999; Berridge and Robinson, 2003). Despite the clear role of the motivational mechanisms involved in food-entrainment, these processes have been poorly studied.

The aim of this study was to evaluate the role of the reward value of taste as a relevant factor for food-entrainment. Therefore we first evaluated whether a palatable snack can entrain behavioral and metabolic rhythms in rats without food-deprivation. In a second part of this study we used c-Fos expression to determine cellular activation in the hypothalamus and limbic structures related with palatable meal entrainment (PME). Finally, we explored whether food-entrained c-Fos patterns persisted after interruption of PME in order to identify possible oscillatory structures involved with FEO.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals and housing

Male Wistar rats weighing 230-250 g at the beginning of the experiment were housed in individual transparent acrylic cages (30 X 45 X 20cm). Rats were maintained in a 12:12 h light-dark (LD) cycle (lights on at 0700=ZT0) and constant temperature (22± 1°C) with free access to food (Rodent laboratory chow 5001) and water unless otherwise stated. Experiments were approved by the national guide of care and use of animal experimentation of Mexican laws (Decreto ley de protección a los animales del distrito federal, gaceta oficial del distrito federal 26/02/02).

Experimental design

For the first phase of the experiment, rats were randomly assigned to one of two groups: a restricted feeding group (RFS) which was maintained for 3 weeks under food restriction with food available daily for two hours (ZT6-ZT8), and PME group in which animals were maintained *ad libitum* to their regular chow and received 5g of tasty-meal at ZT6. Palatable meal used to entrain animals was a 5g chocolate bar containing 10% of proteins, 51% of carbohydrates and 34% fat for a caloric value of 550kcal/100g. For a baseline all animals remained on the 12:12 h LD cycle in individual cages with food and water *ad libitum* at least for 20 days. Starting on day 21 both groups were entrained for 3 weeks, according to its assigned protocol, and the intensity of AA was evaluated. To evaluate persistence of AA, after interruption of entrainment protocols, RFS group remained 3 days in fasting conditions and the PME rats remained 4 days under regular

food *ad libitum*. At the end of experimental manipulations all rats were left *ad libitum* for other 3 weeks.

For the second phase of the experiment, another set of rats was assigned for metabolic and immunohistochemical evaluation either entrained to RFS or to PME for 3 weeks. On the last day of entrainment rats were sacrificed at three different time points related to food or palatable-meal access, during AA (ZT4), at regular or palatable-meal access (ZT6) and after meal time (ZT8; $n=5$ per group and time point).

On a third phase and in order to evaluate persistence of PME patterns in metabolic and c-Fos expression, 4 days after interruption of palatable-meal entrainment (A-PME) another set of rats was sacrificed at the same time points indicated above ($n=4$ per time point). For this last group we used as a control a set of rats maintained under regular food *ad libitum* conditions (AL) but without a previous palatable-meal entrainment.

Locomotor activity

To assess locomotor activity, rats were housed individually in transparent acrylic cages (30 X 45 X 20 cm) and maintained in a soundproof room under a 12:12 h LD cycle, constant temperature (22 $^{\circ}$ C), with free access to food and water. General locomotor activity was monitored continuously with infra-red detectors located on the walls of the cage. Movement counts were stored and analyzed in 15 min intervals. For each rat double-plotted actograms were obtained and for each experimental condition mean activity waveforms were constructed with the SPAD1 (Sistema de procesamiento y adquisición de datos. Versión 1.1.1.) designed in our lab.

Immunohistochemistry

Samples were obtained 30 min after each indicated temporal point because the intracellular cascade of events to produce the protein c-Fos takes from 30 to 45 min, and the maximal expression at 90 minutes (Morgan and Curran, 1991). Rats were deeply anaesthetized, with sodium pentobarbital and were perfused transcardially with 250 ml saline solution (0.9%) followed immediately by 250 ml of 4% paraformaldehyde solution in 0.1 M phosphate buffer (PB; pH 7.2). Brains were removed and post-fixed in paraformaldehyde solution for 1 hour, then transferred successively to 10, 20 and 30% sucrose solutions in 0.1 M PB. Frozen coronal sections of 40 μ m were cut with a cryostat. One set of tissue was stained with cresyl violet, and another set of tissue was incubated during 72 h at 4 $^{\circ}$ C in c-Fos antibody made in rabbit (Santa Cruz Biotechnology, USA) diluted 1:2500 in phosphate buffer saline (PBS), 1% of goat serum and 0.3% triton (PBSGT). Tissues were rinsed 3 times for 10 minutes in PBS, then were incubated for 2 h in biotinylated secondary antibody (goat anti-rabbit; Vector laboratories) 1:200 in PBSGT. The tissues were rinsed again 3 times for 10 minutes and then were incubated for 2 h in avidin-biotin-peroxidase complex (0.9% avidin and 0.9% biotin solutions; Vectastain Elite ABC Kit; Vector Labs) and washed again 3 times for 10 minutes in PBS. The tissue was reacted in diaminobenzidine (0.5 mg/ml, in trizma buffer 7.2), nickel-cobalt (200 μ l, 10%) and hydrogen peroxide (35 μ l, 30% H₂O₂). After this final reaction, sections were mounted in gelatin-coated slides, and dehydrated through a series of alcohols, cleared with xylene, and coverslipped with Permount (Fisher Chemicals).

Quantification of cells

The number of c-Fos-positive nuclei were counted unilaterally in coronal sections selected in accordance with the stereotaxic atlas from Paxinos and Watson (1998), for the prefrontal cortex (PFC) interaural 11.70mm, for both regions shell and core of the nucleus accumbens (Acc-Sh, Acc-Co) interaural 10.20mm, for the SCN interaural 7.70mm, for the lateral hypothalamic nucleus (LH), paraventricular hypothalamic nucleus (PVN) and central nucleus of the amygdala (CeA) interaural 7.12mm coronal section and for the ventromedial hypothalamic nucleus (VMH) and dorsomedial hypothalamic nucleus (DMH) interaural 5.86mm. Images of the corresponding Nissl sections were acquired to identify the total area for each nucleus. Images were examined under a light microscope (Nikon Eclipse E600) and captured at a 10X magnification using a computerized image analysis system (Meta Vue series 4.5, Universal imaging corporation). Immunopositive cells for c-Fos included under an area of 108 squares of 40X40µm each, were counted manually in one side of each section. To minimize the number of false positives, background optical density (OD) was established in a nearby region lacking c-Fos expression, stained cells that reached or surpassed three times the OD background were considered positive, whereas cells under this staining threshold were discarded. Number of cells for each sampled area were transformed to cells per square millimeter (mm²).

Metabolic variables

Metabolic entrainment was determined by evaluating rhythmicity of free fatty acids (FFA) and glucose. At the moment of perfusion blood samples were obtained from each animal via a puncture in the inferior cava vein and were collected in Eppendorf tubes containing a clot-activator gel. To obtain the serum, blood samples were centrifuged at 2500 rpm during 15 min. For determination of FFA a sample of 100 µl was processed with spectrophotometric methods as

previously described (Escobar et al. 1998). Serum glucose was determined with a 10 µl sample using a commercial colorimetric kit (Hycel No 70408, St. Louis MO).

Statistical analysis

Data are represented as mean ± standard error of the mean (SE). The intensity of anticipatory activity (AA) was determined with a one-way ANOVA for repeated measures for the main factor time. Main effects in RFS or PME groups and A-PME or AL groups in c-Fos expression, FFA and glucose concentrations were compared with a two-way ANOVA for independent measures for the factors group and time. All analyses were followed by a Tukey multiple-comparisons post-hoc test with alpha set at $p < 0.05$. Statistical analysis was performed with Statistica version 4.5 (StatSoft, 1993).

RESULTS

Meal-entrained locomotor activity

In the first 20 days under food *ad libitum* conditions, all animals showed clear diurnal rhythms of activity. (Fig. 1 A-B, Fig. 2A, D). In RFS or PME groups, all animals developed a clear AA (Fig. 1A-B, Fig. 2B, E). The one-way ANOVA confirmed a significant effect of both entrainment protocols on locomotor activity (RF, $F_{(47,329)}=3.693; p < 0.0001$; PME, $F_{(47,329)}=15.56; p < 0.001$), and the post hoc test indicated that movement counts during AA were significantly higher than the expected diurnal activity. General locomotion during AA was more intense in the RFS than in PME group.

During the 3 days in fasting conditions, persistence of AA in the RFS group was evident ($F(47,229)=1.712, p<0.003$; Figs. 1A, 2C). For the PME group, also persistence of AA was present in *ad libitum* conditions for at least 4 cycles (Fig. 2F, $F(47,229)=11.619, p<0.001$). During the following days this entrained locomotor activity was dampened (Fig. 1B).

Metabolic entrainment

In the RFS group there was a clear entrainment of metabolic variables, glucose showed an increase after meal time and FFA a peak anticipating meal time, as previously described (Escobar et al., 1998; Martínez-Merlos et al., 2004). In contrast, in the PME group there was not a meal entrained temporal pattern in the 3 phases evaluated (Fig. 3). In the A-PME as well as in the AL group no time related fluctuations were observed in glucose nor FFA after interruption of meal entrainment (data not shown). For glucose and FFA concentrations the ANOVA indicated a clear difference between RFS and PME groups ($F(1,27)=24.93, p<0.0001$, glucose; $F(1,27)=9.814, p<0.0001$, FFA) and due to the factor time ($F(2,27)=5.727, p<0.0001$, glucose; $F(2,27)=3.35, p<0.05$, FFA).

c-Fos-IR expression in the hypothalamus during RFS and PME

In all evaluated hypothalamic structures, the RFS group showed higher c-Fos-IR cells than the PME group (Fig. 4). The RFS group showed in the DMH a temporal pattern with increasing values during anticipation and high values after feeding, while c-Fos-IR in the LH were increased in the 3 phases. The PME group did not exhibit temporal changes associated with meal time. In the PVN a significant response was observed in the RFS group following meal time (ZT8), while no c-Fos-IR was observed in the PME group (Fig. 4). In contrast, in agreement with a previous study (Angeles-Castellanos et al., 2004), in the VMH, the RFS group did not show temporal

fluctuations associated with meal time, while an anticipatory activation was observed in the PME group (Fig. 4). For the DMH and PVN the two-way ANOVA indicated significant effect in the factors group, time and in the group X time interaction. For the LH the two way ANOVA indicated a difference due to group and for the VMH a difference due to time and group X time (see Table 1). After interruption of palatable-meal access, in the A-PME group a general decrease of c-Fos-IR was observed resulting in comparable levels as in the AL control group and no oscillations were observed associated with the expected palatable meal time (Fig. 4). The two-way ANOVA showed significant effects in the factor group for the DMH, LH and PVN and a significant effect in the time factor for VMH. In the SCN no c-Fos-IR entrainment was observed in the RFS group nor in the PME group, however, significant difference due to the time was indicated by the ANOVA (Fig. 5, Table 1). After interruption of the entrainment, a non fluctuating pattern was observed in both AL and A-PME groups (Fig. 5; Table 1). The two-way ANOVA indicated a significant difference between RFS and PME groups (Table 1).

c-Fos expression during RFS and PME in the limbic system

For all limbic structures cell counts were significantly higher in the PME group than the RFS group. In the PME group a peak of c-Fos expression anticipating mealtime was observed at ZT4 and ZT6 (Figs. 6-7). Due to the high counts in the PME group, in the graphs this increase is not evident for the RFS group, but a further one way ANOVA indicated significant effects due to time (Acc-Co, $F(2,11)=4.263, p<0.01$; Acc-Sh, $F(2,11)=11.116, p<0.002$; CeA, $F(2,12)=5.56, p<0.01$; PFC, $F(2,13)=15.54, p<0.0002$).

After interruption of PME a different c-Fos-IR pattern remained between the A-PME and the AL (Fig. 6). For all the nuclei evaluated (Acc-Co, Acc-Sh, CeA and PFC) at ZT4 there was a significant increase of c-Fos-IR in the A-PME group anticipating expected meal time. The

ANOVA indicated significant effects due to the group, time and group x time interaction factors (Table 2).

DISCUSSION

This study shows that entrainment with a tasteful palatable diet can elicit anticipatory activity in rats, and that this behavior persists in the absence of the palatable meal at least for 4 cycles, indicating that a circadian clock mechanism is implicated. In contrast, metabolic variables like glucose and FFA serum concentrations were not entrained by the palatable-meal, but were entrained by RFS as previously reported (Escobar et al., 1998; Martínez-Merlos et al., 2004). In addition, we found that under palatable meal entrainment, nuclei of the limbic system, but not of the hypothalamus, exhibited a clear c-Fos-IR increase anticipating palatable-meal access, while RFS also entrained nuclei in the hypothalamus.

In spite that locomotor activity was entrained by a daily palatable-meal, glucose and FFA were not, suggesting that alternation of fasting-feeding intervals are necessary to entrain metabolic variables as observed in the RFS group. In contrast such a condition is not necessary to produce AA, and the reward properties of taste are sufficient for entrainment. These results support previous studies in which nutritive food or palatable meal are clearly sufficient to entrain the FEO in animals without or with a mild food deprivation (Abe and Rusak, 1992; Mistlberger and Rusak, 1987). Because palatable meal for this study was 5 g of chocolate we cannot discard that the daily high caloric ingestion due to the palatable meal played a relevant role to produce entrainment. Previous studies have demonstrated that high caloric value and not the volume, is necessary to produce AA (Stephan, 1997). In the present study, the 5 g of chocolate were not sufficient to modify the nocturnal regular food intake which remained similar for the PME group

as the RFS group (data not shown). However, nor did they have the strength to entrain metabolism.

The intensity of AA in PME group was lower than that observed in RFS rats. We suggest that food-entrainment due to RFS involves an increased food driven motivation linked with the metabolic fluctuations due to fasting-feeding intervals, while entrainment with a palatable-meal excludes this metabolic alternation and only involves the motivational drive. Thus the difference in AA intensity in both entrainment paradigms may reflect the different regulatory systems involved. Previous evidence has shown that RFS entrain behavioral and metabolic rhythms as well as peripheral oscillators (Davidson et al., 2003; Martínez-Merlos et al., 2004; Yamazaki, 2000). Present data indicate that PME does not modify metabolic rhythms. Furthermore activation of brain regions suggest that the mechanisms involved in entrainment by RFS are different from those underlying PME.

In a previous study, we described entrainment in the DMH and LH of c-Fos-IR by RFS while the entrained pattern persisted in fasting for several cycles indicating that these nuclei can be involved in the clockwork of FEO (Angeles-Castellanos et al., 2004). In addition, the increased c-Fos-IR in the PVN after feeding suggests a relevant role for this hypothalamic structure as a central input pathway to FEO (Angeles-Castellanos et al., 2004). In the present study we found similar results in the hypothalamus of rats under RFS, confirming the relevance of hypothalamic nuclei in food-entrainment. In contrast, c-Fos expression in the hypothalamus did not show an entrained pattern by a palatable-meal without food restriction. This suggests that c-Fos-IR patterns entrained by RFS in the hypothalamus are associated with metabolic entrainment and because PME rats did not undergo an alternating long fasting/ short feeding condition, this response was not evoked in the hypothalamus.

As previously described c-Fos-IR in the SCN was not entrained by RFS (Angeles-Castellanos et al., 2004; Damiola et al., 2000; Hara et al., 2001; Wakamatsu et al., 2001), nor was it entrained by a palatable-meal. It is well documented that the light-dark cycle is the main zeitgeber for the SCN and only under an extreme catabolic state feeding schedules can affect its phase or its response to light (Challet et al., 1997,1998; Kalsbeek et al., 2000). Thus, we conclude that because PME does not challenge the metabolic condition, c-Fos-IR in the SCN was not affected.

In rats under PME, several regions of the limbic system showed a peak expression in c-Fos-IR during AA and at the time of palatable-meal access (ZT4, ZT6). This response was also observed with lower amplitude in rats under RFS, suggesting that in both entrainment conditions Acc-Sh, Acc-Co, CeA and PFC are involved in the manifestation of AA. Present data are in agreement with a previous study in which we have described an increase in c-Fos expression anticipating meal-time in both regions of the nucleus accumbens in rats under RFS (Mendoza et al. in press). In addition, a previous study in mice showed clock genes entrainment under RFS in the cortex and hippocampus, both peaking in phase with AA (Wakamatsu et al., 2001). The increased cellular activation during AA can be associated with the increased state of arousal and food oriented drive that animals exhibit anticipating mealtime, it can also be due to the expectation of food reward. Other studies have related the cellular activation in the nucleus accumbens core and prefrontal cortex with the expectation of reward by a tasteful diet and evoked by changes in dopamine release (Bassaero and Di Chiara, 1999). Because c-Fos-IR was significantly higher in PME than RFS rats, we suggest that under PME the reward or hedonic system was mainly implicated and could have been the main underlying process promoting behavioral activation, while in RFS metabolic processes also play a role.

In the CeA, there was also a clear increase in c-Fos-IR in animals under PME, which was also higher than the activation in the RFS group. The CeA is another relevant structure implicated in

anticipating reward and motivational processes evoked by taste and food (Giraud et al., 1998; Berridge, 2003). The amygdala is considered as part of the limbic taste pathway and has a relevant projection to the hypothalamus for the control of food intake (Petrovich et al., 2002). In the present study c-Fos-IR in the CeA can be related to the motivational response to the taste of chocolate. These results find support in similar experiments in which tasteful feeding evoked c-Fos-IR in the CeA (Kim, et al., 2001). Also, CeA lesioned rats displayed lower preference for palatable saccharine solution as compared to control rats (Touzani et al., 1997).

Interestingly, we showed c-Fos-IR at ZT4 in the limbic structures after 4 days of PME interruption. This activation is in agreement with the behavioral persistence of AA in PME rats. This observation indicate that limbic structures are involved in the motivational response to taste and due to the persistence may constitute oscillators of FEO (Fig. 6). Present evidence as well as previous studies (Amir et al., 2004; Wakamatsu et al., 2001) suggest that some nuclei in the limbic system can express circadian oscillations and persistence of the food-entrained patterns. Thus, limbic structures may play a relevant role for AA as components of the distributed multi-oscillatory system that constitutes the FEO.

In conclusion, present data that support the hypothesis that behavior and structures in the limbic system are entrained by a tasteful palatable meal. While RFS affect central and peripheral systems related to metabolic balance, including the hypothalamus, PME specifically involve regions of the brain linked with motivational states, such as the nuclei of the limbic system. Thus, the mechanisms involved in PME are different from the mechanism involved in food entrainment by RFS. The present evidence of two different mechanisms associated with food entrainment supports the proposal that the FEO may be a multi-oscillatory system distributed over different regulatory systems.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Dr. Ruud Buijs (The Netherlands Institute for Brain Research) for excellent and constructive comments on the manuscript. The present study was supported by grants DGAPA-UNAM PAPIIT-IN-203803 and IX-227504-1 to CE, and PhD fellowship (CONACyT) to JM.

REFERENCES

- Abe H, Rusak B (1992) Anticipatory activity and entrainment of circadian rhythms in Syrian hamsters exposed to restricted palatable diets. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 263: R116-R124.
- Abe M, Herzog ED, Yamazaki S, Straume M, Tei H, Sakaki Y, Menaker M, Block GD (2002) Circadian rhythms in isolated brain regions. *J Neurosci* 22: 350-356.
- Amir S, Waddington-Lamont E, Robinson B, Stewart J (2004) A circadian rhythm in the expression of PERIOD 2 protein reveals a novel SCN-controlled oscillator in the oval nucleus of the bed nucleus of the stria terminalis. *J Neurosci* 24(4): 781-790.
- Angeles-Castellanos M, Aguilar-Roblero R, Escobar C (2004) c-Fos expression in the hypothalamic nuclei of food-entrained rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286: R158-R165.
- Balsalobre A (2002) Clock genes in mammalian peripheral tissues. *Cell Tissue Res* 309: 193-199.
- Bassareo V, DiChiara G (1997) Differential influence of associative and nonassociative learning mechanism on the responsiveness of prefrontal and accumbal dopamine transmission to food stimuli in rats fed ad libitum. *J Neurosci* 17(2): 851-861.

- Bassareo V, DiChiara G (1999) Modulation of feeding-induced activation of mesolimbic dopamine transmission by appetitive stimuli and its relation to motivational state. *Eur J Neurosci* 11: 4489-4397.
- Berridge KC (2003) Pleasures of the brain. *Brain and cognition* 52: 106-128.
- Berridge KC, Robinson TE (2003) Parsing reward. *Trends Neurosci* 26(9): 507-513.
- Buijs RM, Kalsbeek A (2001) Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nat Rev Neurosci* 2: 521-526.
- Challet E, Jacob N, Vuillez P, Pevet P, Malan A (1997) Fos-like immunoreactivity in the circadian timing system of calorie-restricted rats fed at dawn: daily rhythms and light pulse-induced changes. *Brain Res* 770(1-2): 228-236.
- Challet E, Solberg LC, Turek FW (1998) Entrainment in calorie-restricted mice: conflicting zeitgebers and free-running conditions. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 274: R1751-R1761.
- Damiola F, Le Minh N, Preitner N, Kornmann B, Fleury-Olela F, Schibler U (2000) Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev* 14: 2950-2961.
- Davidson AJ, Poole AS, Yamazaki S, Menaker M (2003) Is the food-entrainable circadian oscillator in the digestive system? *Genes Brain Behav* 2: 32-39.
- Diaz-Muñoz M, Vazquez-Martinez O, Aguilar-Roblero R, Escobar C (2000) Anticipatory changes in liver metabolism and entrainment of insulin, glucagons, and corticosterone in food-restricted rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279: R2048-R2056.
- Escobar C, Diaz-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.

Giraud SQ, Billington CJ, Levin AS (1998) Effects of opioid antagonist naltrexone on feeding induced by DAMGO in the central nucleus of amygdala and in the paraventricular nucleus in the rat. *Brain Res* 782: 18-23

Granados-Fuentes D, Prolo LM, Abraham U, Herzog ED (2004) The Suprachiasmatic nucleus entrains, but does not sustain circadian rhythmicity in the olfactory bulb. *J Neurosci* 24(3): 615-619.

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.

Hastings MH, Reddy AB, Maywood ES (2003) A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease. *Nat Rev Neurosci* 4: 649-661.

Kalsbeek A, Barassin S, van Heerikhuijsen JJ, van der Vliet, Buijs RM (2000) Restricted daytime feeding attenuates reentrainment of the circadian melatonin rhythm after an 8-h phase advance of the light-dark cycle. *J Biol Rhythms* 15: 57-66.

Kim EM, Shi Q, Olszewski PK, Grace MK, O'Hare E, Billington CJ, Levine AS (2001) Identification of central sites involved in butorphanol-induced feeding in rats. *Brain Res* 907: 125-129.

Klein DC, Moore RY, Reppert SM (1991) *Suprachiasmatic nucleus: the mind's clock*. New York: Oxford University Press.

Martinez-Merlos T, Angeles-Castellanos M, Diaz-Muñoz M, Aguilar-Roblero R, Mendoza J, Escobar C (2004) Dissociation between adipose tissue signals, behavior and the food-entrained oscillator. *J Endocrinol* 181: 171-195.

Mendoza J, Angeles-Castellanos M, Escobar C (2004) Differential role of the accumbens shell and core subterritories in food-entrained rhythms of rats. *Behav Brain Res* In press.

Mistlberger RE, Rusak B (1987) Palatable daily meals entrain anticipatory activity rhythms in free feeding rats: Dependence on meal size and nutrient content. *Physiol Behav* 41: 219-226.

Mistlberger RE (1994) Circadian food anticipatory activity: formal models and physiological mechanism. *Neurosci Biobehav Rev* 18: 171-195.

Mogenson GJ, Jones DJ, Yim CY (1980) From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. *Prog Neurobiol* 14: 69-97.

Moore RY, Eichler VB (1972) Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic nucleus lesions in rats. *Brain Res* 42: 201-206.

Morgan JJ, 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.

Paxinos G, Watson C (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 4th edn Academic Press San Diego USA.

Pecoraro N, Gomez F, Laugero K, Dallman MF (2002) Brief access to sucrose engages food-entrainable rhythms in food-deprived rats. *Behav Neurosci* 116(5): 757-776.

Petrovich GD, Setlow B, Holland PC, Gallagher M (2002) Amygdalo-hypothalamic circuit allows learned cues to override satiety and promote eating. *J Neurosci* 22(19): 8748-8753.

Pomonis JD, Jewett DC, Kotz CM, Briggs JE, Billington CJ, Levine AS (2000) Sucrose consumption increases naloxone-induced c-Fos immunoreactivity in limbic forebrain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278(3): R712-R719.

Reppert SM, Weaver DR (2002) Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418: 935-941.

Rolls ET (2000) The orbitofrontal cortex and reward. *Cerebral cortex* 10(3): 284-294.

Stephan FK (1997) Calories affect zeitgeber properties of the feeding entrained circadian oscillator. *Physiol Behav* 62: 995-1002.

Stephan FK (2002) The other circadian system: food as a zeitgeber. *J Biol Rhythms* 17: 284-292.

Stokkan KA, Yamazaki S, Tei H, Sakaki Y, Menaker M (2001) Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science* 291: 490-493.

Stratford TR, Kelley AE (1999) Evidence of a functional relationship between the nucleus accumbens shell and lateral hypothalamus subserving the control of feeding behavior. *J Neurosci* 19: 11040-11048.

Touzani K, Taghzouti K, Velley L (1997) Increase of the aversive value of taste stimuli following ibotenic acid lesion of the central amygdaloid nucleus in the rat. *Behav Brain Res* 88: 133-142.

Wakamatsu H, Yoishinobu Y, Aida R, Moriya T, Akiyama M, Shibata S (2001) Restricted-feeding-induced anticipatory activity rhythm is associated with a phase-shift of the expression in mPer1 and mPer2 mRNA in the cerebral cortex and hippocampus but not in the suprachiasmatic nucleus of mice. *Eur J Neurosci* 13: 1190-1196.

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

FIGURE LEGENDS

Fig 1. Double plotted actograms of locomotor activity of rats entrained to RFS (A) or to a daily palatable-meal (B). In the actograms, each line represents a day of recording. Top bars represent the light-dark cycle. Vertical bar in A indicates meal time during RFS (gray) and days of total food deprivation (white square). Gray triangles in B indicate the beginning and the end of PME respectively. Note the persistence of AA after interruption of the palatable meal access for at least for 4 cycles.

Fig 2. Mean activity waves for locomotor activity in RFS (white circles) and in PME (black circles) groups during *ad libitum* (A, D), during entrainment (B, E) and for the 3 days in food deprivation (C) or 4 days following interruption of palatable meal (F). Horizontal black bar indicates meal time and vertical line indicates palatable meal time (B, E). Horizontal white bar and dotted line indicate time of expected meal time. Values represent mean \pm SE. * post-hoc tukey $p < 0.05$.

Fig 3. Serum concentration of glucose (GL) and free fatty acids (FFA) during RFS (black circles) or PME (white circles). Arrows indicate time of food and palatable-meal access. * post-hoc tukey $p < 0.05$ between groups, ♦ post-hoc tukey $p < 0.05$ between temporal points for RFS group.

Fig 4. Left panel shows number of c-Fos-IR cells in the dorsomedial hypothalamic nucleus (DMH), lateral hypothalamus (LH), paraventricular hypothalamic nucleus (PVN) and ventromedial hypothalamic nucleus (VMH) of RFS group (●) and PME group (○). Right panel shows c-Fos-IR expression of AL animals (▲) and A-PME group (Δ). Arrows indicate meal time

or palatable-meal access.* post-hoc tukey $p < 0.05$ between groups, † post-hoc tukey $p < 0.05$ between temporal points in a group group.

Fig 5. Number of c-Fos-IR cells in the suprachiasmatic nucleus (SCN) of RFS group (●), PME group (○), of AL (▲) and A-PME rats (Δ). Indications as in Fig. 4. Arrows indicate meal time or palatable-meal access.* post-hoc tukey $p < 0.05$ between groups.

Fig 6. Left panel shows the number of c-Fos-IR cells in the both regions core and shell of the nucleus accumbens (Acc-Co and Acc-Sh), the central nucleus of amygdala (CeA) and prefrontal cortex (PFC) of RFS group (●) and PME group (○), and in the right panel of AL (▲) and A-PME rats (Δ). Other indications as in Fig. 4. Arrows indicate meal time and palatable-meal access.* post-hoc tukey $p < 0.05$ between groups, † post-hoc tukey $p < 0.05$ between temporal points for PME group.

Fig 7. Representative photomicrographs of c-Fos-IR in Acc-Co, Acc-Sh, CeA and PFC of PME animals at the three ZT points evaluated. Dotted lines define corresponding area. Scale bar, 120 μm . ac, anterior commissure, LV, lateral ventricle.

Table 1, F and p values obtained with the two-way ANOVA for independent measures for the number of c-Fos-IR in the hypothalamus between RFS-PME and AL-A-PME.

NUCLEUS/CONDITION	GROUP		TIME		GROUP X TIME	
	F(1,27)	P	F(2,27)	P	F(2,27)	P
RFS vs PME						
DMH	240.11	0.0001	26.75	0.0001	29.74	0.0001
LH	150.97	0.0001	1.948	NS	1.649	NS
PVN	128.59	0.0001	21.22	0.0001	25.00	0.0001
VMH	1.024	NS	11.23	0.0002	11.76	0.0002
SCN	19.10	0.0002	3.100	NS	1.145	NS
AL vs A-PME						
	F(1,23)	P	F(2,23)	P	F(2,23)	P
DMH	42.28	0.0001	.182	NS	1.56	NS
LH	95.82	0.0001	1.266	NS	.101	NS
PVN	65.43	0.0001	2.398	NS	2.505	NS
VMH	1.041	NS	3.460	0.04	1.761	NS
SCN	4.671	0.04	7.452	0.003	.944	NS

Table 2. F and p values obtained with the two-way ANOVA for independent measures of the number of c-Fos-IR in the limbic system between RFS-PME and AL-A-PME.

NUCLEUS/CONDITION	GROUP		TIME		GROUP X TIME	
	F(1,27)	P	F(2,27)	P	F(2,27)	P
RFS vs PME						
Acc-Co	42.15	0.0001	4.09	0.03	3.03	NS
Acc-Sh	69.57	0.0001	2.84	NS	10.88	0.0004
CeA	72.87	0.0001	18.87	0.0001	19.27	0.0001
PTC	125.30	0.0001	4.14	0.02	7.34	0.002
AL vs A-PME						
Acc-Co	37.18	0.0001	14.42	0.001	13.04	0.0002
Acc-Sh	46.48	0.0001	16.93	0.0001	13.35	0.0002
CeA	79.59	0.0001	27.61	0.0001	23.58	0.0001
PTC	381.52	0.0001	29.36	0.0001	27.02	0.0001

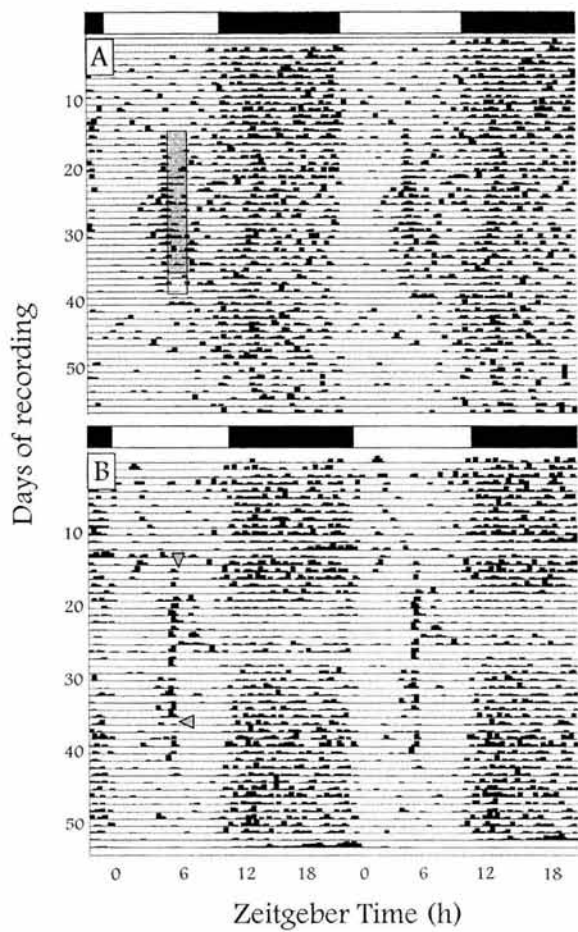


FIGURE 1

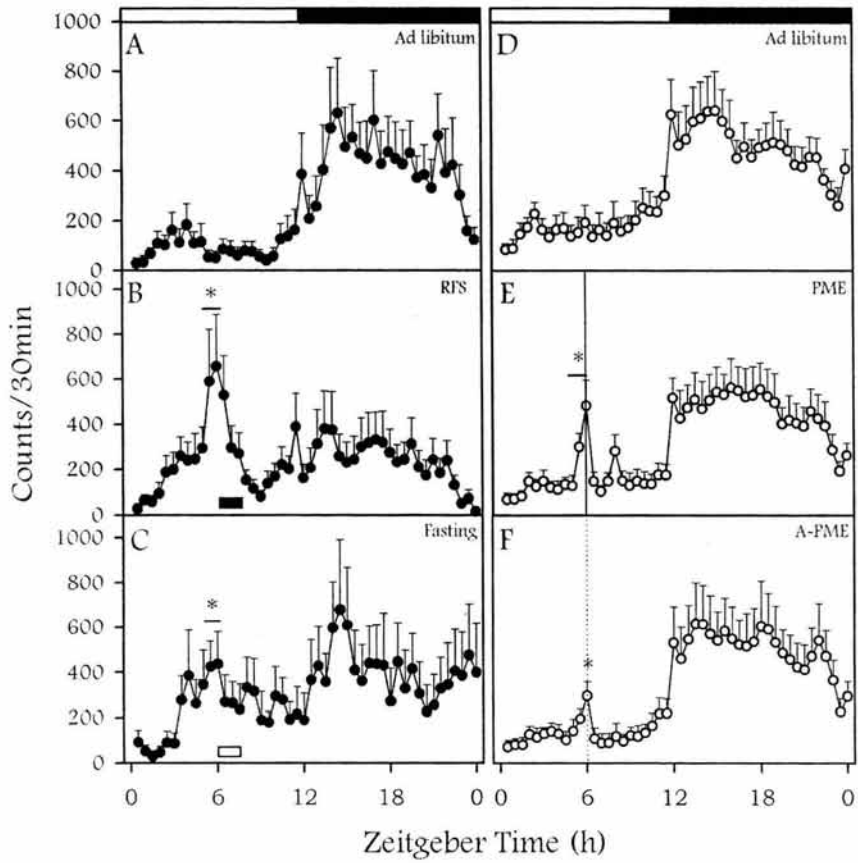


FIGURE 2

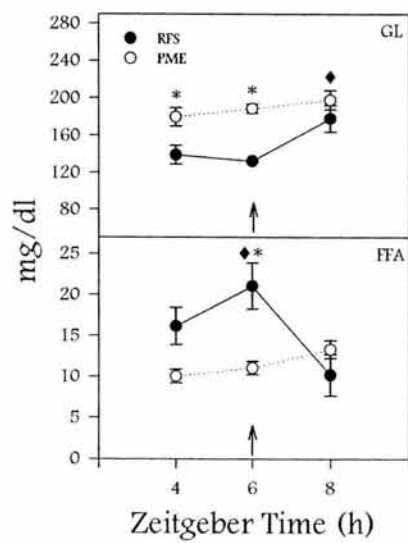


FIGURE 3

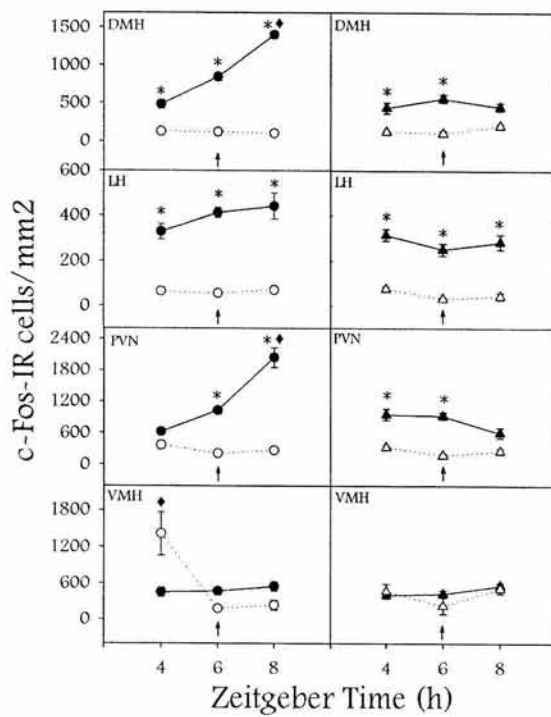


FIGURE 4

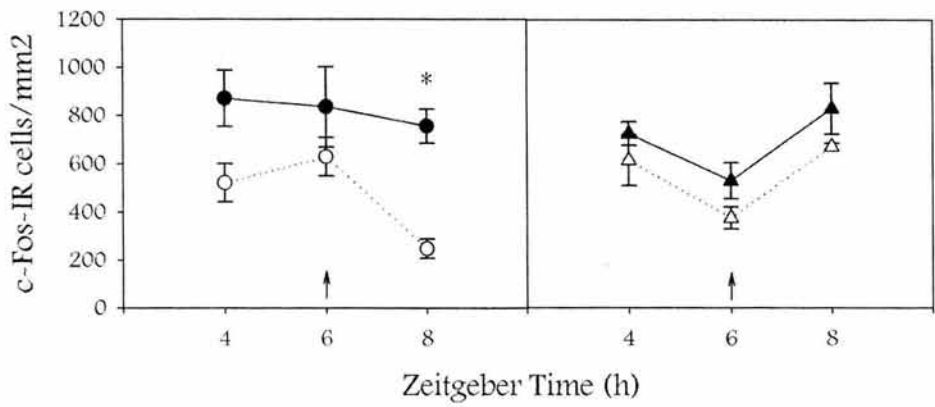


FIGURE 5

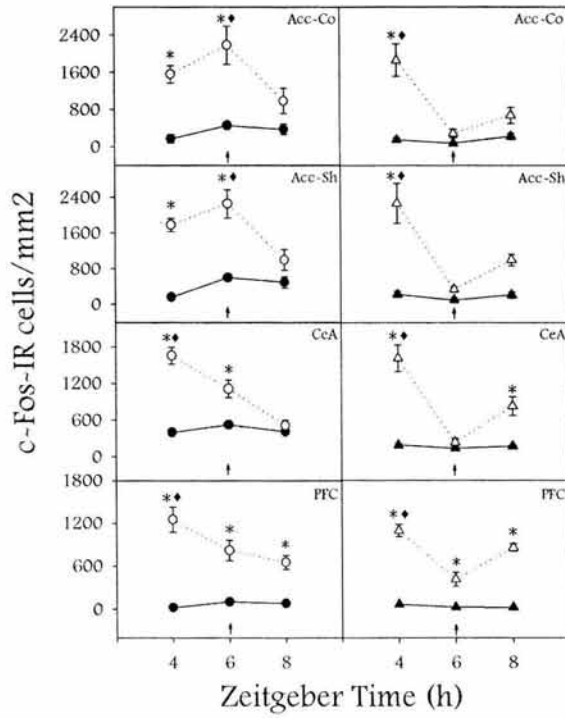


FIGURE 6

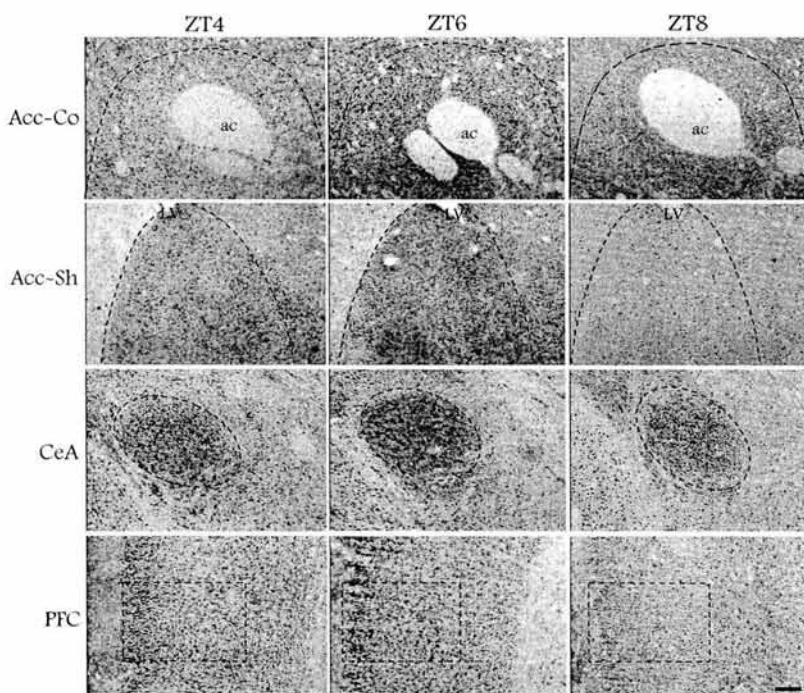


FIGURE 7

Section Editor: Dr. Michael H. Hastings

**A DAILY PALATABLE MEAL WITHOUT FOOD DEPRIVATION ENTRAINS
THE SUPRACHIASMATIC NUCLEUS OF RATS**

Jorge Mendoza, Manuel Angeles-Castellanos and Carolina Escobar

Departamento de Anatomía, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de
México, México DF, 04510, México.

Running title: Entrainment by a palatable meal.

Corresponding Author:

Dr. Carolina Escobar
Departamento de Anatomía, Facultad de Medicina
Edificio "B" 4º Piso
Universidad Nacional Autónoma de México
México DF 04510
México
Tel. (52-55) 5623-2422
Fax. (52-55) 5623-2425
E-mail: cescobar@ifc.unam.mx

Key words: circadian, reward, c-Fos, PER-1, paraventricular thalamic nucleus,
intergeniculate leaflet.

Abstract (245 words)

Food is a potent *zeitgeber* for peripheral oscillators but not for the master circadian clock, the suprachiasmatic nucleus (SCN), which is entrained principally by the light-dark cycle. However, when food attains specific properties in quantity and quality, it can be a potent *zeitgeber* even for the SCN. Here we evaluate whether daily scheduled consumption of a palatable meal, without regular food deprivation, entrains the circadian rhythm of locomotor activity, serum glucose and free fatty acids (FFA), and the c-Fos and PER-1 protein expression in the SCN. Rats in constant darkness, received a palatable meal for 5 weeks starting in the middle of subjective day. Locomotor activity showed entrainment when a relation coordination was established between activity offset and palatable meal time. Glucose and FFA concentrations also showed entrainment with a main concentration at the time and 4 hours after meal access respectively. In the SCN, the main expression of c-Fos and PER-1 was observed at the time and 8 hours after palatable meal access respectively. PER-1 showed a peak during the onset of subjective night as expected. In addition, c-Fos and PER-1 expression in the paraventricular thalamic nucleus (PVT) of the thalamus, a principal inputs to the SCN, also showed entrainment to the palatable-meal, suggesting that this nucleus may be involved as an input pathway to the SCN for palatable food-entrainment. These results demonstrate that the reward properties of food, which evoke an increase in the motivational state of animals, can entrain the SCN.

Introduction (496 words)

In mammals, circadian rhythms of physiology and behavior are generated by an endogenous circadian clock located in the suprachiasmatic nuclei (SCN) of the hypothalamus (Klein *et al.*, 1991). The molecular mechanism underlying rhythm generation has been proposed as interlocked positive and negative transcription-translation feedback loops of clock genes and their protein products (Reppert & Weaver, 2001; Hastings *et al.*, 2003). Entrainment of the SCN, is dependent on both photic and non-photoc cues (Daan & Pittendrigh, 1976; Mrososvsky, 1996). For photic entrainment light acting via retinal afferent through the retinohypothalamic track using glutamate like principal neurotransmitter (Guillete & Mitchell, 2002), and a rapid induction of the *per1* and *per2* genes in the SCN after light stimulation at night (Albrecht *et al.*, 1997). For non-photoc entrainment the thalamic intergeniculate leaflet (IGL) and the dorsal raphe nucleus, using neuropeptide Y and serotonin respectively, are the principal entrainment pathways to the SCN (Mrososvsky, 1996; Meyer-Bernstein & Morin, 1996). In addition, also a glutamatergic projection from the paraventricular thalamic nucleus (PVT), has been proposed to be involved for non-photoc entrainment (Moga, *et al.*, 1995; Moga & More, 1996; Mrososvsky, 1996). Contrary to photic entrainment, animals are most responsive to non-photoc cues during the day with large phase advances of locomotor rhythmicity and attenuate the normally high daytime levels of *c-Fos*, *Per1* and *Per2* genes in the SCN (Mead *et al.*, 1992; Mrososvsky, 1996; Mikkelsen *et al.*, 1998; Maywood *et al.*, 1999; Horikawa *et al.*, 2000).

Restricted feeding schedules (RFS) entrain clock genes expression in peripheral oscillators but not in the SCN (Damiola *et al.*, 2000; Stokkan *et al.*, 2001; Wakamatsu *et al.*, 2001). However, a timed caloric restricted feeding (CRF) entrains the rhythms of locomotor activity and body temperature of rats in constant darkness (DD), and alters the phase angle of photic entrainment of these circadian rhythms in animals exposed to a light-dark cycle (LD), suggesting that, in absent of a LD, CRF is a potent *zeitgeber* for the SCN (Challet *et al.*, 1996a) and in LD affect the entrainment of SCN to a LD cycle (Challet *et al.*, 1997a, 1998).

During CRF a critical metabolic change is determinant for entrain the SCN, however, an evident motivational process, by food restriction, is also implicated and could be relevant for the entrainment by CRF. Consistent with this view, previous studies showed entrainment of locomotor activity, and *c-Fos* expression in several nuclei of the limbic system by a palatable-meal, suggesting that the hedonic value of food is relevant for entrainment (Mistlberger & Rusak 1987; Abe & Rusak, 1992; Mendoza *et al.*, 2004).

On the basis of these evidences, we proposed that the SCN is sensitive only to the reward properties of food. For this purpose, circadian rhythms of locomotor activity, metabolic parameters and *c-Fos* and *PER-1* proteins expression in the SCN were determined in rats entrained to a palatable-meal without food restriction and in DD. In addition, we tested the role of IGL and PVT as a principal entrainment pathways to the SCN.

Materials and methods

Animals and Housing

Male Wistar rats weighing 230-250g at the beginning of the experiment were housed in individuals transparent acrylic cages (30 X 45 X 20cm) in a temperature-controlled environment (22± 1°C) under a 12:12-h light-dark cycle (lights on at 0700) with free access to food (rodent laboratory chow 5001) and water. Experiments were approved by the national guide of care and use of animal experimentation of Mexican laws (Decreto ley de protección a los animales del distrito federal).

Experimental design

For the first phase of the experiment, to assess behavioral entrainment, rats were transferred to constant darkness (DD) with free access to food and water, and were randomly assigned to one of two groups: a palatable-meal entrained group (PME; n=8) in which animals received 5g of tasty-meal (chocolate bar containing 10% of proteins, 51% of carbohydrates and 34% fat for a caloric value of 550kcal/100g.) at 1400 h external time (nearly the middle of subjective day from all animals) without regular food (chow) deprivation, and a control group manipulation (n=8) in which animals were awaked at 1400 h external time by an investigator with a level agitation of the cover of the cages over 10 seconds, simulating the arrival of palatable meal. This group was designed to determine whether behavioral activation (due to repeated disturbances by the palatable-meal entrainment) causes entrainment of locomotor activity. For a baseline all animals were in DD with food and water *ad libitum* at least for 25 days. Animals were entrained for 6 weeks, according to its

assigned protocol. After interruption of entrainment protocols, all animals remained for other 3 weeks under behavioral recording.

Due to a clear behavioral entrainment in PME rats but not in the control group, we decided in a the second phase of the experiment, evaluate cellular and metabolic entrainment only in the PME group. A second set of animals were entrained to PME under the same protocol as in the previous behavioral analysis. In the last day of entrainment, animals were killed and brains and blood samples were obtained for immunohistochemistry and free fatty acids (FFA) and glucose determinations in 6 temporal points at 4-h intervals to obtain a 24 h cycle (n=4, per temporal point), beginning at *zeitgeber* time 0 (ZT0 was designed as palatable meal-time).

Activity recording

To assess locomotor activity, rats were housed individually in transparent acrylic cages (30 X 45 X 20 cm) and maintained in a soundproof room under DD and constant temperature (22 ± 1°C). Locomotor activity was continuously recorded with infra-red detectors located on the walls of the cage. Movement counts were stored at 15 min intervals for further analysis. Double-plotted actograms were obtained and analyzed for each animal using the SPAD1 (Sistema de procesamiento y adquisición de datos. Versión 1.1.1.) designed in our lab.

Period of activity rhythms

Free-running periods (τ) were estimated for the days under regular food *ad libitum* preceding the palatable meal entrainment (PME), for days with a stable entrainment to the palatable meal and after the PME by χ^2 periodogram analysis using SPAD1. The first days

after the PME were skipped to minimize the effect of possible transient cycles after entrainment. In addition, the period of the activity rhythm before, during, and after PME was estimated by fitting a regression line through the calculated onsets.

Immunocytochemistry

Rats were anaesthetized (pentobarbital, 200 mg/kg) and perfused intracardially with 250 ml saline (0.9%) followed by 250 ml of cold 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB; pH 7.2). Brains were removed and postfixed for 1h and cryoprotected in 10, 20 and 30% sucrose solutions in 0.1 M PB overnight. Sections (40 µm) were cut through the entire SCN, PVT and IGL using a cryostat. Alternate free-floating sections were incubated in a goat anti-mPER1 antibody (1:1000) diluted in phosphate buffer saline rabbit serum triton (PBSRT) and another set was incubated in a rabbit polyclonal anti-cFos antibody (Santa Cruz Biotechnology, USA) diluted 1:2500 during 72 h at 4°C. Following incubation in the primary antibody, sections were rinsed in PBS and incubated for 2 h at room temperature with a biotinylated anti-rabbit IgG made in goat (Vector laboratories), diluted 1:200 in PBSGT for c-Fos and with a biotinylated anti-goat IgG made in rabbit diluted 1:200 in PBSRT for PER-1. The tissues were rinsed again 3 times for 10 minutes and then were incubated for 2 h at room temperature in avidin-biotin-peroxidase complex (0.9% avidin and 0.9% biotin solutions; Vectastain Elite ABC Kit; Vector Labs) and washed again 3 times for 10 minutes in PBS. Finally sections were reacted with the avidin-biotin-immunoperoxidase technique using diaminobenzidine (0.5 mg/ml, in trizma buffer 7.2) DAB as the chromogen, with hydrogen peroxide (35µl, 30% H₂O₂), nickel-cobalt (200µl, 10%). After this final reaction, sections were mounted in gelatin-coated slides, and

dehydrated through a series of alcohols, cleared with xylene, and coverslipped with Permout (Fisher Chemicals).

Cell counts

For quantification of c-Fos and mPER1-immunoreactive (ir) cells, cell counting of printed images from mid-SCN, anterior-PVT and IGL was conducted by two observers who were blind to the experimental conditions.

The number of c-Fos and PER-1 positive nuclei were counted unilaterally in matched coronal sections from PME rats. Sections were selected in accordance with the stereotaxic atlas from Paxinos and Watson: SCN and anterior-PVT interaural + 7.70; IGL interaural - 4.80 (Paxinos & Watson, 1998). Images were examined under a light microscope (Nikon Eclipse E600) and captured at a 10X magnification using a computerized image analysis system (Meta Vue series 4.5, Universal imaging corporation). Cells immunopositive for c-Fos and PER-1 were counted manually only in one side of each section. To minimize the number of false positives, backgrounds optical density (OD) was established in a nearby region lacking immunoreactivity, and stained cells that reached or surpassed three times the OD background, were considered positive, whereas cells under this staining threshold were discarded.

Determination of free fatty acids and glucose

For free fatty acids (FFA) and glucose determinations, blood samples were obtained from each animal of the cava vein at the moment of perfusion. Blood samples were collected in

ependorff tubes containing a clot-activator gel. For obtain the blood serum, blood samples were centrifuged at 2500 rpm during 15 min. Aliquots of 100 μ l sample were for free fatty acids determination by using colorimetric methods as previously described (Escobar *et al.*, 1998) and glucose was determined with a 10 μ l sample using a commercial colorimetric kit (Hycel No 70408, St. Louis MO).

Statistical analyses

Data from all experiments are expressed as means \pm SEM. c-Fos and PER-1 expression, FFA and glucose concentrations were evaluated with one-way ANOVA for the factor time for independent measures. For period changes analysis we used a two-way ANOVA for the factors group and experimental condition for repeated measures. In addition, we used a correlation coefficient and *t*-test to evaluate the relation between the endogenous period (τ) and rate of entrainment. All analysis were followed by a tukey multiple-comparisons post-hoc test with a α set of $p < 0.05$. Statistical analysis was performed with Statistica version 4.5 (StatSoft, 1993).

Results

Behavioral entrainment

Locomotor activity rhythms were measured under constant darkness conditions. All animals displayed a stable free-running activity rhythms with an average free-running period of 24.18 ± 0.03 h for control group and 24.17 ± 0.03 h for PME group, that were similar between groups. Animals used as a control group receiving daily behavioral activation, by the simulation of food arrival, do not showed entrainment, the free running

period remained with an average of 24.21 ± 0.04 h, indicating that behavioral activation was insufficient strength to entrain the circadian activity rhythm (Fig. 1). In contrast animals of PME group showed a clear entrainment to the meal access, adjusting the offset of activity with the time of *zeitgeber* (ZT-0) with a period of 24.01 ± 0.01 h (Fig. 2). There were obvious statistical differences in period between groups during entrainment ($F_{(1,14)}=10.97; p < 0.005$). In PME rats, the rate of entrainment was different between animals depending of the endogenous period; animals with a short period last more days to entrainment than animals with a long endogenous period (Fig. 3). This correlation was statistical significant ($r = -4.73; p < 0.003$). After this time, at the end of entrainment, the activity rhythms of PME rats remained with a period similar to that during entrainment, indicating a persistence of the behavioral rhythm entrained to the palatable meal (Fig. 2). The period in control animals continued in free running as in the previous conditions (Fig. 1).

Free fatty acids and glucose entrainment

In PME animals, FFA were increased significantly 4h after to palatable meal time at ZT4 (Fig. 4; $F_{(3,15)}=4.204; p < 0.01$). In the glucose concentrations, there was an increase at the time of meal access (ZT0), and this increase continued with a less concentration at ZT4 and ZT8 (Fig. 4). In addition, a peak at the onset of activity was evident, but not similar in concentration to the peak at ZT0 (Fig. 4). The ANOVA indicated a difference in the time of glucose concentrations ($F_{(3,12)}=9.069; p < 0.0002$).

c-Fos and PER-1 expression

The number of c-Fos-positive cells was increased in the SCN at ZT0, in the time of palatable meal access, which also coincided with the offset of activity (Fig. 5). The one-way ANOVA revealed that for c-Fos in the SCN there was a significant main effect on time ($F(5,18)=4.679, p<0.006$). Because animals of ZT0 point during PME were without the palatable meal until the sacrifice, the c-Fos expression at this point was considered like an anticipatory activity point. For PER-1 expression there was a clear and significantly rhythm of expression with a main number of PER-1 immunoreactive cells at ZT8 (onset of activity) and a less number of PER-1 immunoreactive cells at ZT0 (offset of activity) (Fig. 5; $F(5,18)=17.51, p<0.00001$).

In the PVT, there was a clear rhythm in the expression of c-Fos and PER-1. The main expression of c-Fos and PER-1 was at ZT0, at the palatable meal time, which was in phase with the offset of activity (Fig. 6). The statistical analysis confirmed these qualitative observation, showing a significant difference between the temporal points evaluated (c-Fos, $F(5,18)=3.492, p<0.02$; PER-1, $F(5,18)=4.758, p<0.006$).

In the IGL, also there was a rhythm in the c-Fos expression with a main expression at ZT16, at the middle of activity phase (Fig. 7). However, no significant difference were detected by the one-way ANOVA between the different times ($F(5,16)=2.583, NS$).

Discussion

These studies demonstrate the potent entraining effect of a palatable meal on the circadian pacemaker in rats. The entrainment effect was evident in two outputs of the SCN as the circadian rhythm of locomotor activity and the daily concentration of glucose.

Moreover, both temporal c-Fos and PER-1 expression in the SCN also showed entrainment to the palatable meal, indicating that the clockwork mechanism was modified by the entrainment. In addition, the c-Fos expression in the PVT, as a non photic pathway of entrainment, suggest that this structure could be one of the main pathway for entrainment to the palatable meal.

Behavioral entrainment

Our results support previous studies that showed the entrainment of locomotor activity in hamsters by a palatable diet (Abe & Rusak, 1992). This entrainment was only in the PME rats, but not in the behavioral activation control group. In despite that there are several studies that showed entrainment by behavioral activation, suggesting that arousal is a potent *zeitgeber* for the SCN, in all these studies the behavioral manipulation is for long times (3h at least) with or without exercise (Hastings *et al.*, 1992, 1998; Mrosovsky, 1995, 1996; Antle & Mistlberger, 2000). In the present study the behavioral manipulation was very short, only for 10 seconds, then an entrainment effect was not possible.

In PME rats, the entrainment of locomotor activity was in phase with the offset of activity, indicating a phase relationship between the phase of *zeitgeber* (palatable meal) and the end of the locomotor activity pattern. These results are similar to previous studies with non photic entrainment, in which there was a similar phase relationship between the *zeitgeber* (melatonin administration, or forced running in a wheel) with the offset of activity in diurnal rodents (Slotten *et al.*, 2002; Hut *et al.*, 1999). Additionally in non human primates also there is an entrainment of locomotor activity, when the time of *zeitgeber* (activity pulse) is in phase with the onset of activity (Glass *et al.*, 2001).

For the phase relation between the *zeitgeber* and the offset of the circadian rhythm of locomotor activity, and because the endogenous period (τ) of locomotor activity was adjusted to the period of *zeitgeber* (T, palatable meal) we concluded that locomotor activity was entrained to the palatable meal. In the other hand, the rate of entrainment was depended of the τ . Rats with a τ close to 24 h take a long time to establish a clear entrainment, whereas rats with a $\tau > 24$ h showed an entrainment in less days. This confirms that the τ of the clock is determinant for the number of cycles to establish a phase relationship between the *zeitgeber* and the endogenous rhythm (Aschoff, 1984; Pittendrigh, 1984).

A previous study showed entrainment of the locomotor activity and PER-2 protein expression in the SCN of mice by feeding schedules (Castillo, *et al.*, 2004). In this study a paradigm with long entrainment times was used, mice took on average 12 weeks to establish an entrainment to the schedule feeding, suggesting that is necessary a paradigm with several days during this paradigm to establish entrainment. In addition, in this previous paper, the schedule feeding was of 6 hours of food access, indicating that a caloric restriction is not necessary for entrainment. In the present study, the animals were not under regular food restriction, supporting the previous results that is not necessary a catabolic state by long times of fasting for entrainment. However, in contrast to the previous study, with a palatable meal entrainment was not necessary long times of entrainment, several animals took only five days to establish a clear entrainment, and animals that needed more days to entrainment, took 3 weeks. That indicate that in our protocol of food entrainment is not necessary long times of entrainment, and that is more important the hedonic value of the palatable meal for establish the entrainment. Then we suggest that potency of food as a

zeitgeber depends of the change in the motivational state of animals by the palatability of meal. That support previous studies that has reported that the motivational value of some non photic cues as brain stimulation or a place preference is relevant for phase shifts in the circadian locomotor activity of hamsters (Cain *et al.*, 2004a,b).

In the other hand in both the previous and the present paper mice and rats respectively were under DD, indicating that in the absent of the principal *zeitgeber* (LD cycle) for the SCN, a palatable meal can be a potent *zeitgeber*. This is supported by previous papers that suggest the relevance of the competition between *zeitgebers* for the potency of food as a *zeitgeber* for the SCN (Challet *et al.*, 1998). In animals under DD a timed caloric restriction is a potent *zeitgeber* for the SCN entraining the circadian rhythms of locomotor activity and body temperature (Challet *et al.*, 1996a). In addition, clock genes expression in the SCN could be entrained by timed caloric restriction (Challet, *et al.*, unpublished data).

In contrast when animals are entrained to hypocaloric restricted feeding under a LD cycle, there is an alteration in phase angle of the locomotor activity, melatonin rhythm and body temperature to the LD cycle, and of the clock genes expression in the SCN (Challet *et al.*, 1997a, 1998, 2003; Mendoza *et al.*, unpublished data).

In rats entrained to a palatable meal under a LD cycle, there are not entrained of the locomotor activity neither *c-Fos* expression in the SCN, in contrast there are a clear food anticipatory activity component which depends of food-entrainable oscillator (Mistlberger, 1994) but not of the SCN, suggesting that when a LD cycle is present, this is more potent *zeitgeber* for the SCN than regular food or palatable meal (Challet *et al.*, 2003; Mendoza *et al.*, 2004).

Previous studies using another kind of non photic cue to entrain the clock, also has been in animals under constant conditions of light (Hut *et al.*, 1999; Sloten *et al.*, 2002; Glass *et al.*, 2001), avoiding the competition between *zeitgebers* (LD cycle vs non photic cue).

Metabolic entrainment

The plasma concentrations of glucose were entrained to the palatable meal showing a peak at the onset of activity as has been reported (La Fleur *et al.*, 1999), but in addition, a clear response to the palatable meal was observed with a high increase in plasma glucose concentrations at the palatable meal time. There is a rhythm in the concentrations of glucose that depends of the SCN, which influence in peripheral tissues as the liver and pancreas through the autonomic nervous system (La Fleur *et al.*, 1999; Buijs & Kalsbeek, 2001). The rise of plasma glucose concentrations in rats is at the end of the light period before to the start feeding, suggesting that this rhythm is endogenous and not the result of feeding (La Fleur *et al.*, 1999). In the present study, the peak in the glucose concentration at the beginning of activity reflects the entrainment to the palatable meal.

The increase at the palatable meal time is a response to high concentrations of carbohydrates of chocolate (51% of carbohydrates), and perhaps this could be powerful by an increase of plasma corticosterone. The peak of blood glucose concentrations occurs at the same time that peak of circadian rhythm of corticosterone (Kalsbeek *et al.*, 1996, La Fleur *et al.*, 1999). In addition, during food anticipatory activity there is an increase of corticosterone concentrations anticipating meal time (Diaz-Muñoz *et al.*, 2000; Martínez-Merlos *et al.*, 2004). PME animals showed a level increase in behavioral activation

anticipating palatable meal time, then perhaps also there was an increase in concentrations of corticosterone anticipating meal time, which powerful the glucose concentrations.

In the other hand, FFA concentration showed an increase at ZT4, four hours after to the palatable meal time. Because there is not a circadian rhythm in the FFA concentrations (Escobar *et al.*, 1998), this peak is only a response to the high fat contained in the palatable meal (34% fat). In addition, the increase in FFA concentrations by the palatable meal was after to the meal time, contrary to the increase during restricted feeding schedules (RFS) in which there is an increase anticipating meal time (Escobar *et al.*, 1998; Martínez-Merlos *et al.*, 2004). That confirms that animals entrained to the palatable meal were not in a catabolic state as by RFS, and suggest that the tasty and reward properties of food is the relevant characteristic to entrain.

Entraining the clockwork mechanism

The present findings demonstrated that c-Fos in the SCN can be entrained by the palatable meal, showing the acrophase of main c-Fos expression at ZT0 (the palatable meal time). Previous studies has reported a rhythm in the mRNA and protein expression of c-Fos in hamsters and rats maintained under DD, beginning around dawn (Sumová *et al.*, 1998; Guido *et al.*, 1999a, 1999b). In the present study the rhythm of c-Fos protein expression was in phase with the offset of activity and the palatable meal time, indicating that there was a clear entrainment effect due to the palatable meal. However, the increase in c-Fos expression by the palatable meal is similar to the induction of c-Fos and *per1* in the SCN by a light pulse (Guido *et al.*, 1999a; Albrecht *et al.*, 1997). In contrast, non photic stimulation produces a decrease in the c-Fos expression (Hastings, *et al.*, 1998; Mead *et al.*, 1992;

Biello *et al.*, 1994; Mikkelsen & Mrososovsky, 1998; Antle & Mistlberger, 2000) and in the *per1* and *per2* genes in the SCN (Maywood *et al.*, 1999; Horikawa *et al.*, 2000; Maywood & Mrososovsky, 2001). This reduction in c-Fos and clock genes expression has been proposed as the mechanism to reset the clock by non photic cues (Maywood *et al.*, 1999).

In the present study, the entrainment with a palatable diet, as a non photic cue, showed opposed effects in the c-Fos expression in the SCN, suggesting that behavioral activation, which normally produces an inhibition of c-Fos and clock genes as *per1* (Mead *et al.*, 1992; Antle & Mistlberger, 2000; Maywood *et al.*, 1999), in PME animals was not the stimuli to produce the increase in c-Fos expression, and perhaps the mechanism for entrainment to a palatable diet could be another one. In addition, that suggest that the hedonic value of food is very important for entrainment as the behavioral activation.

In the other hand, the circadian rhythm of PER-1 showed a main expression at ZT8 and ZT12, at the onset of activity, and the less expression at ZT0 at the palatable meal time. Animals entrained to a LD cycle or in DD showed similar patterns of PER-1 expression, with a peak at the onset of activity and a decrease at the end of activity phase (Reppert & Weaver, 2001; Hastings *et al.*, 2003). Then in the present study we demonstrated that the circadian rhythm of PER-1 was entrained to the palatable meal. That support previous study in which the temporal pattern expression of PER-2 protein in mice entrained to a feeding schedule is similar to the temporal pattern in PER-1 in the present study, with a main expression at ZT-12 and a less expression at ZT-24 (Castillo *et al.*, 2004). However, similar to the expression of c-Fos by a non photic cue, the *per1* and *per2* expression showed a reduction in the SCN by non photic entrainment, then the mechanism for palatable meal entrainment perhaps is different to the photic and non photic entrainment.

The two major inputs to the SCN implicated in non photic are the serotonergic afferents from the median raphe (Meyer-Berstein & Morin 1996) and the NPY input from the IGL of thalamus (Mrososovsky, 1995, 1996). Locomotor activity induces c-Fos expression in NPY immunoreactivity cells in the IGL (Mrososovsky, 1996; Janik *et al.*, 1995). In the other hand bilateral electrolytic lesions of the IGL in hamsters blocks phase shifts by serial arousal (Maywood *et al.*, 1997), suggesting that IGL input to the SCN is relevant for non-photoc entrainment, in which an increase in c-Fos activation in IGL produces a decrease in c-Fos expression in the SCN, possibly by a gabaergic stimulation, to reset the clock. Moreover, IGL lesions blocks the phase shift of locomotor activity and body temperature by an entrainment with a hypocaloric diet suggesting an important role of IGL during food entrainment with a hypocaloric diet (Challet *et al.*, 1996b).

However, in the present study, c-Fos expression in the IGL was increase at ZT16, at the middle of the phase activity. That is in agree with previous studies that showed that the induction of activity produce an increase in c-Fos expression in the IGL (Mrososovsky, 1996; Janik *et al.*, 1995). Moreover, this increase of c-Fos in IGL coincided with the less c-Fos expression in the SCN at the middle of the activity. However, at ZT0 in the palatable meal time, there was not an induction of c-Fos expression in the IGL, and was the time of main c-Fos expression in the SCN, suggesting that the entrainment by the palatable meal is not under the same mechanism than for others non photic cues through the IGL.

In the other hand, the IGL receives a bilateral projection from the retina, from the ganglion cells that project to the SCN through the retinohypothalamic tract (Pickard, 1985). The induction of c-Fos in the IGL by light depends of this projection with the retina, and in animals entrained to a light dark cycle there is a rhythm in the c-Fos expression with an acrophase at the middle of rest phase (Edelstein & Amir, 1996; Challet *et al.*, 1997b).

Because the rhythm of c-Fos in the IGL in the present study was at the middle of activity phase of rats, in antiphase with the c-Fos expression as in previous studies, that suggest that in despite that the IGL is not the principal pathway to entrain the SCN, the c-Fos activity in IGL was changed by the palatable meal.

The PVT is another input to the SCN and is a relevant structure for photic and non photic entrainment (Amir & Steward, 1996; Mrososovsky, 1996; Moga *et al.*, 1995).

In the present study, the increase of c-Fos expression in the PVT at ZT0 in PME rats could be due to the increase in behavioral activation of animals motivated by the palatable meal, and perhaps this is the neural pathway to entrain the SCN.

Light stimulation induces c-Fos expression in the PVT at the onset of activity in rats (Challet *et al.*, 1997b). Moreover, electrical or chemical stimulation in the PVT produce phase shifts in the circadian rhythm of locomotor activity similar to the phase-shift by light pulses (Salazar-Juárez *et al.*, 2002), suggesting a similar mechanism in the entrainment of SCN activity by light stimulation through the retina and the stimulation of PVT. That depends for the release of glutamate from both retina and PVT, and its action in NMDA and non NMDA receptors in the SCN (Kornhauser *et al.*, 1990; Moga & Moore, 1996).

The increase in the c-Fos expression in the PVT and in the SCN by the palatable meal, suggest that perhaps this is mechanism to this entrainment. In addition, for the relevance of PVT in the sleep-wake cycle, principally with wakefulness, enhanced vigilance (Novak & Núñez, 1998; Novak *et al.*, 2000) and their relationship with nuclei relevant for the control of arousal as the noradrenergic system from the locus coeruleus and from the serotonergic system from the medial nuclei of raphe (Jones & Yang, 1985; Vertes & Martin, 1988), the behavioral activation for the motivation evocated by the palatable meal is determinant for the PVT activation and the entrainment SCN.

In the other hand, the PVT has reciprocal connections with several nuclei of the limbic system as the bed nucleus of the stria terminalis, the septum, the amygdala, the infralimbic cortex, the ventral striatum, the hippocampus and the ventral tegmental area (VTA) of the midbrain (Moga, *et al.*, 1995; Su & Bentiboglio, 1990). All these nuclei are also relevant in the arousal, behavioral activation and in the reward processes, then the reward value of the palatable meal is a key factor for the activation of all these nuclei and the PVT. In addition, the neuronal activation of PVT is associated with consummatory behavior (Robinson & Mishkin, 1968) and an increased of dopamine utilization in the nucleus accumbens (Jones, *et al.*, 1989) which is associated with the reward processes.

The release of dopamine from the neurons of VTA to relevant structures for the reward processes as the nucleus accumbens, the amygdala and the prefrontal cortex due to hedonic value of food (Bassareo & DiChiara, 1999; Berridge, 2003). The release of dopamine from VTA could be stimulated by the cellular activation of PVT, then an acute release of dopamine due to the palatable value of meal also produces an increase in the c-Fos expression in PVT, and then the entrainment of the SCN.

The PVT also receives projections of several nuclei form the brainstem as the solitary tract nucleus and the parabrachial nucleus (Saper & Loewy, 1980; Herbert *et al.*, 1990). These structures are relevant for the taste characteristics of meal. The palatable meal used in the present study (chocolate) is highly tasty and could be activated the nuclei in the brainstem and then the PVT, suggesting again that the hedonic value of a tasty meal is relevant for entrainment.

In the other hand, previous studies has showed a circadian pattern in the c-Fos expression in PVT, which is in relation with activity phase of both diurnal and nocturnal animals, suggesting the role of this nuclei with the wakefulness in the sleep-wake cycle. In

despite that there is a clear circadian rhythm in the c-Fos expression in the PVT, (Novak & Núñez, 1998), also seems that there is a circadian rhythm in the PER-1 expression in this nuclei (present study). There is not a clear evidence that the PVT is an autonomous circadian oscillator, or if the oscillations in c-Fos and PER-1 depends of the SCN. However, due to the circadian patterns of c-Fos and PER-1 showed an entrainment of its acrophase to the palatable meal time, we suggest that if this is a circadian oscillator it was entrained to the palatable meal.

Another possibility for the entrainment of the SCN by a palatable meal is that several structures in the brain which showed to be circadian oscillators or entrained to food, as the bed nucleus of strias terminalis (Amir *et al.*, 2004), the olfactory bulb (Granados-Fuentes *et al.*, 2004), the prefrontal cortex and hippocampus (Wakamatsu *et al.*, 2001), the caudate-putamen and parietal cortex (Masubichi, *et al.*, 2000) and the nucleus accumbens and amygdala (Mendoza *et al.*, 2004), becomes strongly entrained by the palatable meal and this promoted a coupling between them and with the SCN (Reppert & Weaver, 2002).

In summary, the present results demonstrate strongly that a daily palatable meal intake causes entrainment in not only behavioral and metabolic rhythms, two principal outputs of the clock, but also cellular rhythms in the SCN clock rhythm, indicating that the reward properties of food, that produces a change un the motivational state of animals, is a key factor in the food to be a potent *zeitgeber* for the SCN.

Acknowledgements

The present study was supported by grants DGAPA-UNAM PAPIIT-IN-203803 and IX-227504-1 to CE, and PhD fellowship (CONACyT) to JM.

Abbreviations

DD, constant darkness; FFA, free fatty acids; IGL, intergeniculate leaflet; LD cycle, light-dark cycle; PME, palatable meal entrainment; PVT paraventricular thalamic nucleus; RFS, restricted feeding schedules; SCN, suprachiasmatic nucleus; ZT, *zeitgeber* time;

References

- Abe, H. & Rusak, B. (1992) Anticipatory activity and entrainment of circadian rhythms in Syrian hamsters exposed to restricted palatable diets. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **263**: R116-R124.
- Albrecht, U., Zheng, B., Larkin, D., Sun, Z.S. & Lee, C.C. (1997) A differential response of two putative mammalian circadian regulators, *mper1* and *mper2*, to light. *Cell*, **91**: 1055-1064.
- Amir, S. & Steward, J. (1996) Resetting of the circadian clock by a conditioned stimulus. *Nature*, **379**: 542-545.
- Amir, S., Waddington-Lamont, E., Robinson, B. & Stewart, J. (2004) A circadian rhythm in the expression of PERIOD 2 protein reveals a novel SCN-controlled oscillator in the oval nucleus of the bed nucleus of the stria terminalis. *J. Neurosci.*, **24**(4): 781-790.

- Antle, M.C. & Mistlberger, R.E. (2000) Circadian clock resetting by sleep deprivation without exercise in the Syrian hamster. *J. Neurosci.*, **20**(24): 9326-9332.
- Aschoff, J. (1984) Free-running and entrained circadian rhythms. Handbook of Behavioral Neurobiology. Vol. 4: Biological Rhythms. (Jurgen Aschoff, Ed.) New York: Plenum Press: 81-93.
- Bassareo, V. & DiChiara, G. (1999) Modulation of feeding-induced activation of mesolimbic dopamine transmission by appetitive stimuli and its relation to motivational state. *Eur. J. Neurosci.*, **11**: 4489-4397.
- Berridge, K.C. (2003) Pleasures of the brain. *Brain and cognition* **52**: 106-128.
- Biello, S.M., Janik, D. & Mrosovsky, N. (1994) Neuropeptide Y and behaviorally induced phase shifts. *Neuroscience*, **62**: 273-279.
- Buijs, R.M. & Kalsbeek, A. (2001) Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nat. Rev. Neurosci.*, **2**: 521-526.
- Cain, S.W., Verwey, M., Hood, S., Leknickas, P., Karatsoreos, I., Yeomans, J.S. & Ralph, M.R. (2004a) Reward and aversive stimuli produce similar nonphotic phase shifts. *Behav. Neurosci.*, **118**(1): 131-137.
- Cain, S.W., Chou, T. & Ralph, M.R. (2004b) Circadian modulation of performance on an aversion-based place learning task in hamsters. *Behav. Brain Res.*, **150**: 201-205.
- Castillo, M.R., Hochstetler, K.J., Traversier, R.J., Greene, D.M. & Bult-Itto, A. (2004) Entrainment of the master circadian clock by scheduled feeding. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **287**: R551-R555.
- Challet, E., Malan, A. & Pévet, P. (1996a) Daily hypocaloric feeding entrains circadian rhythms of wheel-running and body temperature in rats kept in constant darkness. *Neurosci. Lett.*, **211**: 1-4.

- Challet, E., Pévet, P. & Malan, A. (1996b) Intergeniculate leaflet lesion and daily rhythms in food-restricted rats fed during daytime. *Neurosci. Lett.*, **216**: 214-218.
- Challet, E., Pévet, P., Vivien-Roels, B. & Malan, A. (1997a) Phase-advanced daily rhythms of melatonin, body temperature, and locomotor activity in food-restricted rats fed during daytime. *J. Biol. Rhyth.*, **12**: 65-79.
- Challet, E., Jacob, N., Vuillez, P., Pévet, P. & Malan, A. (1997b) Fos-like immunoreactivity in the circadian timing system of calorie-restricted rats fed at dawn: daily rhythms and light pulse-induced changes. *Brain Res.*, **770**(1-2): 228-236.
- Challet, E., Solberg, L.C. & Turek, F.W. (1998) Entrainment in calorie-restricted mice: conflicting zeitgebers and free-running conditions. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **274**: R1751-R1761.
- Challet, E., Caldelas, I., Graff, C. & Pévet, P. (2003) Synchronization of the molecular clockwork by light-and-food-related cues in mammals. *Biol. Chem.*, **384**(5): 711-719.
- Daan, S. & Pittendrigh, C.S. (1976) A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents II. The variability of phase response curves. *J. Comp. Physiol.*, **106**: 253-266.
- Damiola, F., Le Minh, N., Preitner, N., Kormann, B., Fleury-Olela, F. & Schibler, U. (2000) Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev.*, **14**: 2950-2961.
- Diaz-Muñoz, M., Vazquez-Martinez, O., Aguilar-Roblero, R. & Escobar, C. (2000) Anticipatory changes in liver metabolism and entrainment of insulin, glucagons, and

corticosterone in food-restricted rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **279**: R2048-R2056.

- Edelstein, K. & Amir, S. (1996) Constant light induces persistent Fos expression in the rat intergeniculate leaflet. *Brain Res.*, **731**: 221-225.

- Escobar, C., Diaz-Muñoz, M., Encinas, F. and 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.

- Glass, J.D., Tardif, S.D., Clements, R. & Mrosovsky, N. (2001) Photic and nonphotic circadian phase resetting in a diurnal primate, the common marmoset. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **280**: R191-R197.

- Granados-Fuentes, D., Prolo, L.M., Abraham, U. & Herzog, E.D. (2004) The Suprachiasmatic nucleus entrains, but does not sustain circadian rhythmicity in the olfactory bulb. *J. Neurosci.*, **24**(3): 615-619.

- Guido, M.E., Goguen, D., de Guido, L., Robertson H.A. & Rusak B (1999a) Circadian and photic regulation of immediaty-early gene expression in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience*, **90**: 555-571.

- Guido, M.E., de Guido, L., Goguen, D., Robertson H.A. & Rusak B (1999b) Daily rhythm of spontaneous immediaty-early gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus. *J. Biol. Rhyth.*, **14**(4): 275-280.

- Guillete, M.U. & Mitchell, J.W. (2002) Signaling in the suprachiasmatic nucleus: selectively responsive and integrative. *Cell Tissue Res.*, **309**: 99-107.

- Hastings, M.H., Duffield, G.E., Smith, E.J., Maywood, E.S. & Ebling, F.J. (1998) Entrainment of the circadian system of mammals by nonphotic cues. *Chronobiol. Internat.*, **15**: 425-445.

- 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**: 649-661.

- Herbert, H., Moga, M.M. & Saper, C.B. (1990) Connections of the parabrachial nucleus with the nucleus of the solitary tract and medullary reticular formation in the rat. *J. Comp. Neurol.*, **293**: 540-580.

- Horikawa, K., Yokota, S., Fuji, K., Akiyama, M., Moriya, T., Okamura, H. & Shibata, S. (2000) Nonphotic entrainment by 5-HT1A/7 receptor agonists accompanied by reduced Per1 and Per2 mRNA levels in the suprachiasmatic nuclei. *J. Neurosci.*, **20**: 5867-5873.

- Hut, R.A., Mrosovsky, N. & Daan, S. (1999) Nonphotic entrainment in a diurnal mamad, the European ground squirrel (*Spermophilus citellus*). *J. Biol. Rhyth.*, **14**: 409-419.

- Janik, D., Mikkelsen, J.D. & Mrosovsky, N. (1995) Cellular colocalization of Fos and neuropeptide Y in the intergeniculate leaflet after nonphotic phase-shifting events. *Brain Res.*, **698**: 137-145.

- Jones, B.E. & Yang, T.Z. (1985) The efferent projections from the reticular formation and the locus coeruleus studied by anterograde and retrograde axonal transport in the rat. *J. Comp. Neurol.*, **242**: 56-92.

- Jones, M.W., Kilpatrick I.C. & Phillipson, O.T. (1989) Regulation of dopamine function in the nucleus accumbens of the rat by the thalamic paraventricular nucleus and adjacent midline nuclei. *Exp. Brain Res.*, **76**: 572-580.

- Kalsbeek, A., van der Vliet, J. & Buijs, R.M. (1996) Decrease of endogenous vasopressin release necessary for expression of the circadian rise in plasma corticosterone: a reverse microdialysis study. *J. Neuroendocrinol.*, **8**: 299-307.
- Klein, D.C., Moore, R.Y. & Reppert, S.M. (1991) The mind's clock. Oxford Univ. Press, New York.
- Kornhauser, J.M., Nelson, D.E., Mayo, K.E. & Takahashi, J.S. (1990) Photic and circadian regulation of c-fos gene expression in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Neuron*, **5**: 127-134.
- La Fleur, S.E., Kalsbeek, A., Wortel, J. & Buijs, R.M. (1999) A suprachiasmatic nucleus generated rhythm in basal glucose concentrations. *J. Neuroendocrinol.*, **11**: 643-652.
- Martínez-Merlos, T., Angeles-Castellanos, M., Díaz-Muñoz, M., Aguilar-Roblero, R., Mendoza, J. & Escobar, C. (2004) Dissociation between adipose tissue signals, behavior and the food-entrained oscillator. *J. Endocrinol.*, **181**: 171-195.
- Masubuchi, S., Honma, S., Abe, H., Ishizaki, K., Namihira, M., Ikeda, M. & Honma, K. (2000) Clock genes outside the suprachiasmatic nucleus involved in manifestation of locomotor activity rhythm in rats. *Eur. J. Neurosci.*, **12**: 4206-4214.
- Maywood, E.S., Smith, E., Hall, S.J. & Hastings, M.H. (1997) A thalamic contribution to arousal-induced, non-photic entrainment of the circadian clock of the Syrian hamster. *Eur. J. Neurosci.*, **9**: 1739-1747.
- Maywood, E.S., Mrosovsky, N., Field, M.D. & Hastings, M.H. (1999) Rapid down-regulation of mammalian *Period* genes during behavioral resetting of the circadian clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **96**: 15211-15216.

- Maywood, E.S. & Mrosovsky, N. (2001) A molecular explanation of interactions between photic and non-photic circadian clock-resetting stimuli. *Gene Expression Pattern*, **1**: 27-31.
- Mead, S., Ebling, F., Maywood, S., Humby, T., Herbert, J. & Hastings, M.H. (1992) A nonphotic stimulus causes instantaneous phase advances of the light-entrainable circadian oscillator of the Syrian hamster but does not induce the expression of c-fos in the suprachiasmatic nuclei. *J. Neurosci.*, **12**(7): 2516-2522.
- Mendoza, J., Angeles-Castellanos, M. & Escobar, C. (2004) Entrainment by a palatable meal induces food-anticipatory activity and c-Fos expression in reward related areas of the brain. *Neuroscience*, submitted.
- Meyer-Bernstein, E.L. & Morin, L.P. (1996) Differential serotonergic innervation of the suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet and its role in circadian rhythm modulation. *J. Neurosci.*, **16**(6): 2097-2111.
- Mikkelsen, J.D., Vrang, N. & Mrosovsky, N. (1998) Expression of Fos in the circadian system following nonphotic stimulation. *Brain Res. Bull.*, **47**(4): 367-376.
- Mistlberger, R.E. & Rusak, B. (1987) Palatable daily meals entrain anticipatory activity rhythms in free feeding rats: Dependence on meal size and nutrient content. *Physiol. Behav.*, **41**: 219-226.
- Mistlberger, R.E. (1994) Circadian food anticipatory activity: formal models and physiological mechanism. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **18**: 171-195.
- Moga, M.M., Weis, R.P. & Moore, R.Y. (1995) Efferent projections of the paraventricular thalamic nucleus in the rat. *J. Comp. Neurol.*, **359**: 221-238.
- Moga, M.M. & Moore, R.Y. (1996) Putative excitatory amino acid projections to the suprachiasmatic nucleus in the rat. *Brain Res.*, **743**: 171-177.

- Mrosovsky, N. (1995) A non-photic gateway to the circadian clock of hamsters. *Ciba Foundation Symp.*, **183**: 154-189.
- Mrosovsky, N. (1996) Locomotor activity and non-photic influences on circadian clocks. *Biol. Rev.*, **71**: 343-372.
- Novak, C.M. & Nuñez, A.A. (1998) Daily rhythms in Fos activity in the rat ventrolateral preoptic area and midline thalamic nuclei. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **275**: R1620-R1626.
- Novak, C.M., Smale, L. & Nuñez, A.A. (2000) Rhythms in Fos expression in brain areas related to the sleep-wake cycle in the diurnal *Arvicanthus niloticus*. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **278**: R1267-R1274.
- Paxinos, G. & Watson, C. (1998) The rat brain in stereotaxic coordinates. 4th edn. Academic Press, San Diego USA.
- Pickard, G. (1985) Bifurcating axons of retinal ganglion cells terminate in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet of the thalamus. *Neurosci. Lett.*, **55**: 211-217.
- Pittendrigh, C. (1984) *Circadian systems: Entrainment*. Handbook of Behavioral Neurobiology. Vol. 4: Biological Rhythms. (Jurgen Aschoff, Ed.) New York: Plenum Press. 95-124.
- Reppert, S.M. & Weaver, D.R. (2001) Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol* **63**: 647-676.
- Reppert, S.M. & Weaver, D.R. (2002) Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*, **418**: 935-941.
- Robinson, B.W. & Mishkin, M. (1968) Alimentary responses to forebrain stimulation in monkeys. *Exp. Brain Res.*, **4**: 330-366.

- Salazar-Juarez, A., Escobar, C. & Aguilar-Roblero, R. (2002) Anterior paraventricular thalamus modulates light-induced phase shifts in circadian rhythmicity in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **283**: R897-R904.
- Saper, C.B. & Loewy, A.D. (1980) Efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. *Brain Res.*, **197**: 291-317.
- Slotten, H.A., Krekling, S., Sicard, B. & Pévet, P. (2002) Daily infusion of melatonin entrains circadian activity rhythms in the diurnal rodent *Arvicanthus ansorgei*. *Bahav. Brain Res.*, **133**: 11-19.
- Stokkan, K.A., Yamazaki, S., Tei, H., Sakaki, Y. & Menaker, M. (2001) Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science*, **291**: 490-493.
- Su, H.S. & Bentivoglio M. (1990) Thalamic midline cells populations projecting to the nucleus accumbens, amygdala, and hippocampus in the rat. *J. Comp. Neurol.*, **297**: 582-593.
- Sumová, A., Trávníčková, Z., Mikkelsen, J.D. & Illnerov, H (1998) Spontaneous rhythm in c-Fos immunoreactivity in the dorsomedial part of the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain res* **801**: 254-258.
- Vertes, R.P. & Martin, G.F. (1988) Autoradiographic analysis of ascending projections from the pontine and mesencephalic reticular formation and the median raphe nucleus in the rat. *J. Comp. Neurol.*, **275**: 511-541.
- Wakamatsu, H., Yoishinobu, Y., Aida, R., Moriya, T., Akiyama, M. & Shibata, S. (2001) Restricted-feeding-induced anticipatory activity rhythm is associated with a phase-shift of the expression in *mPer1* and *mPer2* mRNA in the cerebral cortex and hippocampus but not in the suprachiasmatic nucleus of mice. *Eur. J. Neurosci.*, **13**: 1190-1196.

Figure legends

FIG. 1. Two representative double plotted actograms of locomotor activity rhythms of rats used in the induced activity pulse as a control group. A 10-s of manipulation of the covert of cage was delivered over 6 weeks (designed by the vertical lines) in animals with a free running activity under constant darkness (DD). In the actograms, days are indicated vertically from each line and time is indicated horizontally. The black top bar represents the DD conditions.

FIG. 2. Double-plotted actograms of 4 rats entrained to a daily intake of palatable meal (PME). 5 g of a palatable meal (chocolate bar) was delivered over 6 weeks (designed by the vertical lines) in animals with a free running activity under constant darkness (DD). Horizontal black bar in the top indicates the DD conditions. Actograms in the left panel are two examples of animals with an endogenous period (τ) close to 24 h, and actograms of the right panel are two examples of animals with a τ longer than 24 h. Note that the rate of entrainment depends of the τ .

FIG. 3. Relationship between the endogenous period (τ) of locomotor activity rhythm and the number of days required to establish an entrainment to the palatable meal time (rate of entrainment).

FIG. 4. Serum concentration of glucose and free fatty acids (FFA) across a 24 h cycle under DD in PME rats. Arrows indicate time of palatable-meal access and hatched area represents the activity phase of locomotor activity. * post-hoc tukey $p < 0.05$ between temporal points.

FIG. 5. (Top) Mean (\pm SEM) number of c-Fos and mPER-1 immunopositive cells in the SCN across the 24-h cycle in PME rats. Arrow indicates time of palatable-meal access and hatched area represents the activity phase of locomotor activity. * post-hoc tukey $p < 0.05$ between temporal points. (Bottom) Representative photomicrographs of coronal sections of the SCN, expressing c-Fos and PER-1 immunoreactivity, sampled every 4 h across the 24 h cycle of PME rats under DD. Arrow indicates palatable-meal access and hatched area represents the activity phase of locomotor activity. * post-hoc tukey $p < 0.05$ between temporal points. 3V, third ventricle; OC, optic chiasm. Scale bar, 120 μ m.

FIG. 6. (Top) Number of c-Fos and PER-1 immunoreactive cells in the PVT nucleus of PME rats. (Bottom) Representative photomicrographs of coronal sections of the PVT expressing c-Fos and PER-1 immunoreactivity across the 24 h cycle of PME rats under DD. Indications as in Fig. 5. 3V, third ventricle. Dotted lines define corresponding area. Scale bar, 120 μ m.

FIG. 7. (Top) Number of c-Fos immunoreactive cells in the IGL of PME rats. (Bottom) Representative photomicrographs of c-Fos-IR in the IGL across the 24 h cycle of PME rats under DD. Indications as in Fig. 5. Dotted lines define corresponding area. Scale bar, 120 μ m.

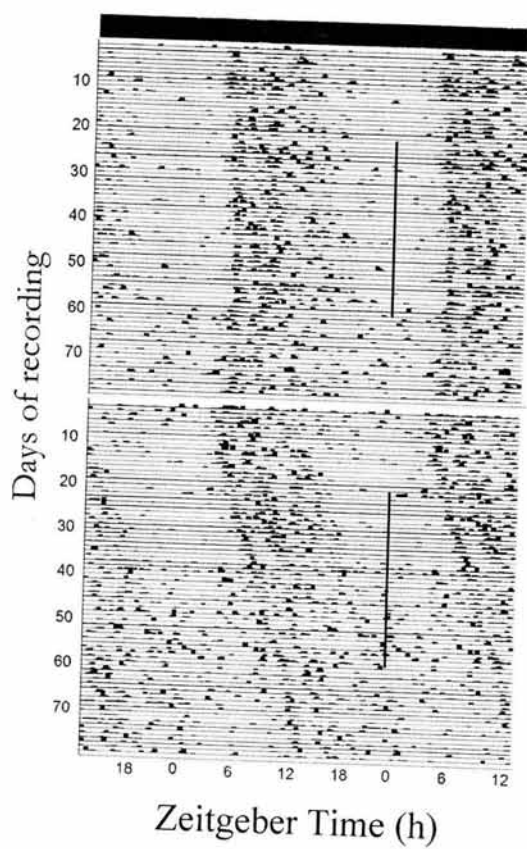


FIGURE 1

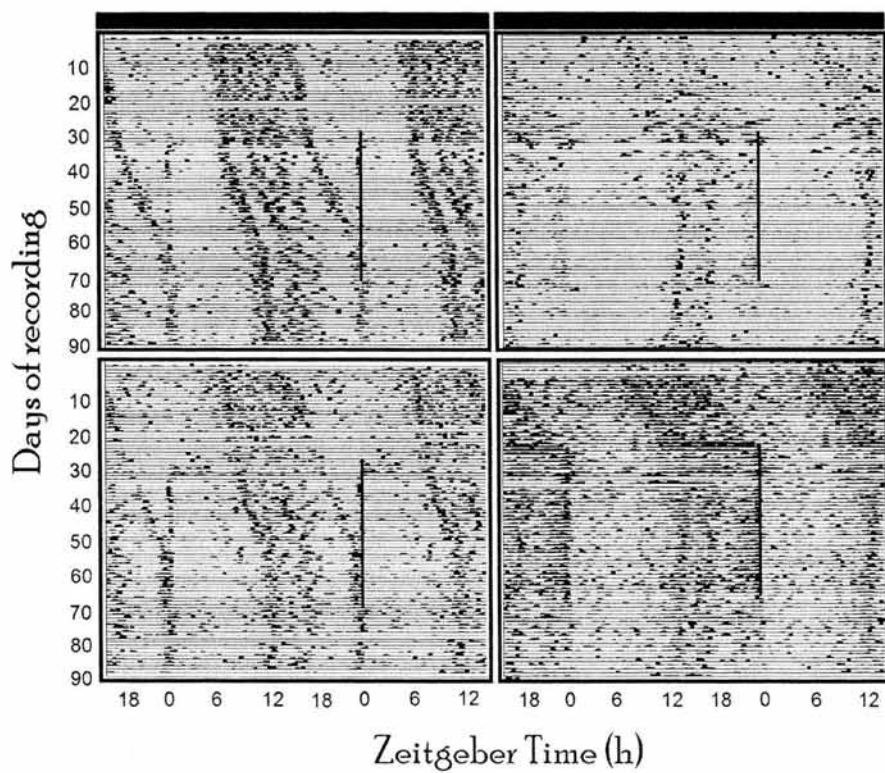


FIGURE 2

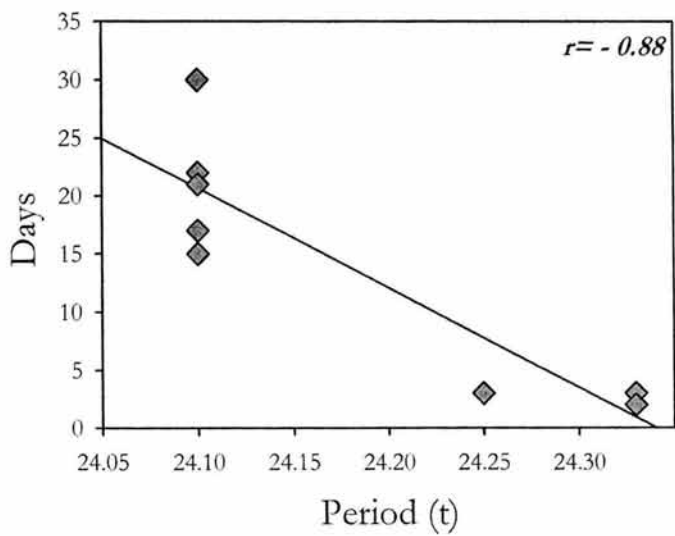


FIGURE 3

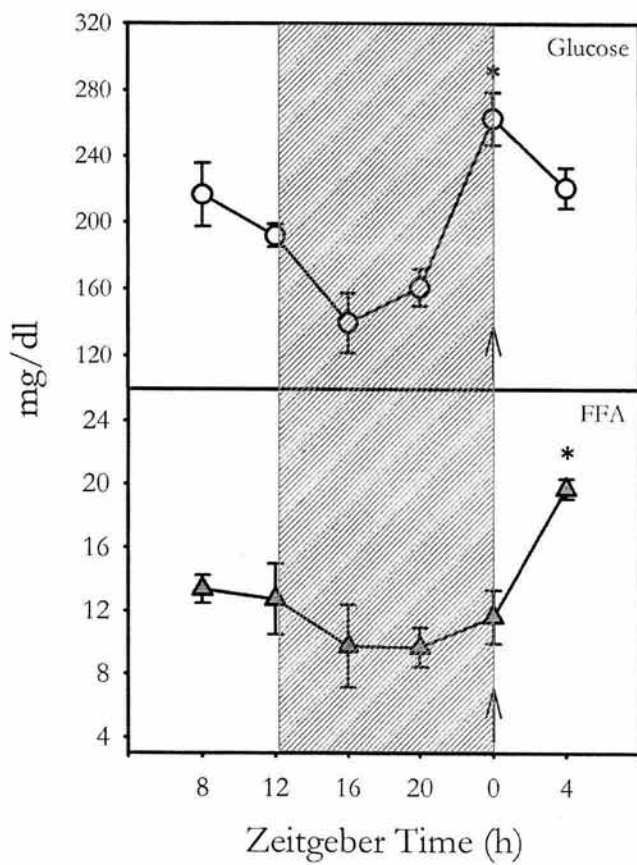


FIGURE 4

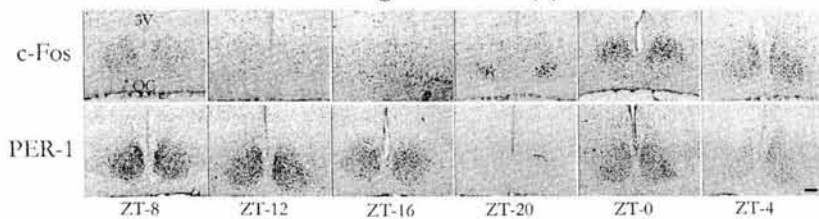
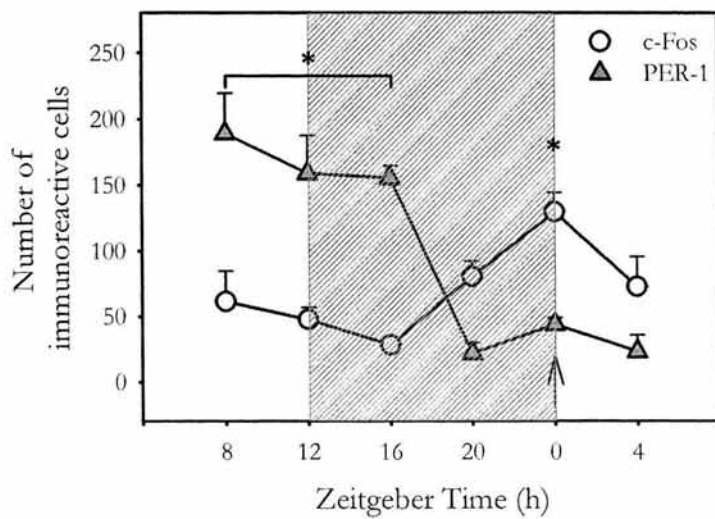


FIGURE 5

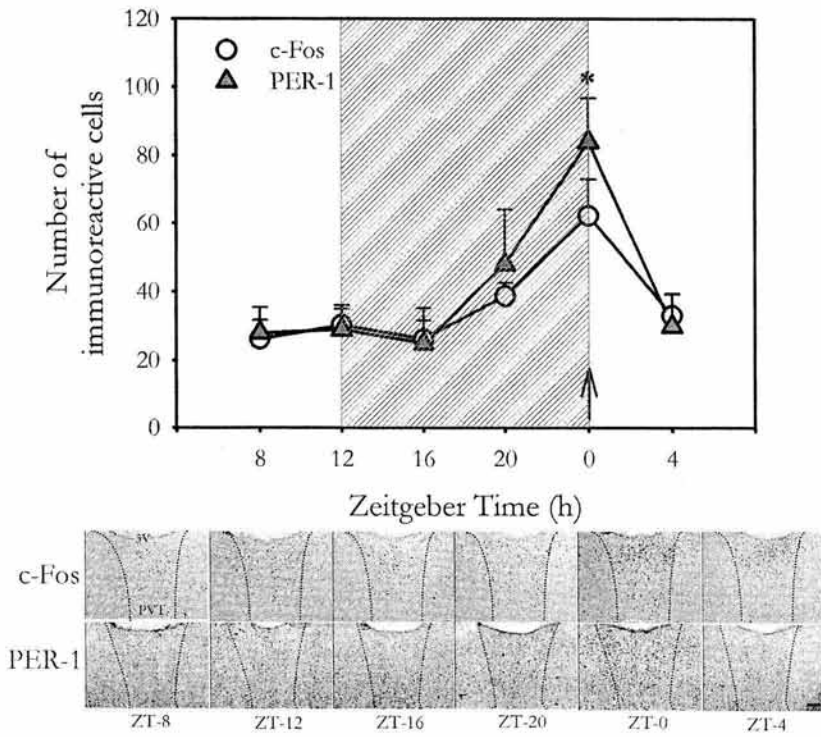


FIGURE 6

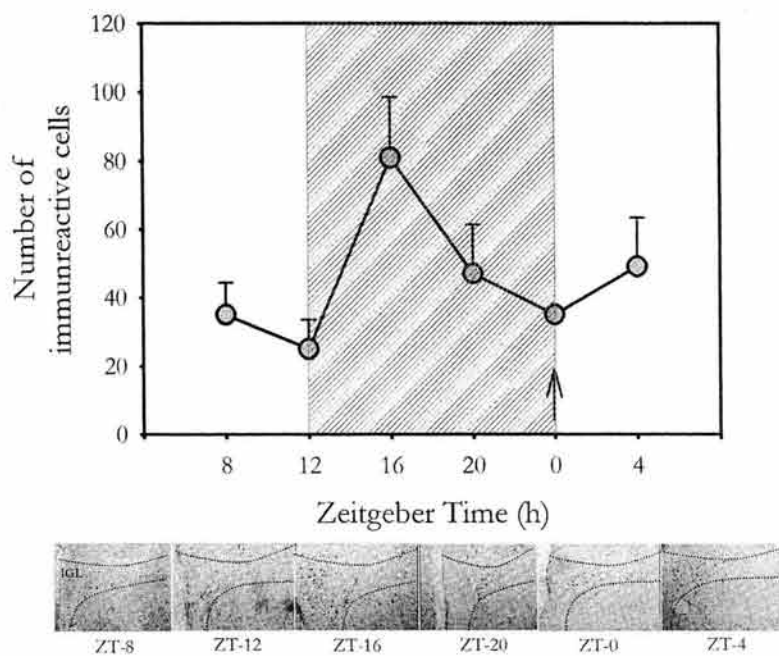


FIGURE 7