



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE PSICOLOGÍA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

1

BASES ANATÓMICAS DE LA INGESTA DE ALIMENTO
INDUCIDA POR LA INYECCIÓN DE NPY EN EL PVN DEL
HIPOTÁLAMO.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADO EN PSICOLOGÍA

PRESENTA:

LUIS ABEL LEÓN MERCADO

DIRECTOR DE TESIS:

DR. RUDOLF MARINUS BUIJS



MÉXICO D.F. 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	3
RESUMEN	4
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1 El hipotálamo y el mantenimiento de la homeostasis	6
1.2. Regulación del metabolismo, homeostasis energética y la ingesta de alimento.	11
1.2.1 La Conducta de alimentación y balance de energía.	11
1.2.2 Regulación Extrahipotalámica de la conducta alimenticia	13
1.2.2.1 Tallo cerebral	13
1.2.2.2 Corteza prefrontal.....	16
1.2.3 Regulación Hipotalámica de la conducta alimenticia	17
2. Objetivos e hipótesis.....	20
2.1 Planteamiento del problema	20
2.2 Objetivo.....	20
2.3 Hipótesis.....	20
3. Metodología.....	22
3.1 Sujetos.....	22
3.2 Diseño experimental	22
3.3 Cirugía.	23
3.4 Inyecciones en el PVN.	24
3.5 Perfusión de animales y tratamiento del tejido.....	24
3.6 Inmunohistoquímica.	25
3.7 Conteos celulares.	26
4. Resultados.....	29
4.1 Corteza infralímbica	30
4.2 Corteza prelímbica	31
4.3 Corteza del cíngulo.....	32
4.4 Corteza insular	34
4.5 Corteza piriforme	36
4.6 Núcleo del tracto solitario.....	38
5. Discusión	40
5.1 Consideraciones técnicas	40
5.2 Comparación entre lados	41
5.3 Comparación entre grupos.	43
5.4 NPY y el PVN.....	45
6. Conclusiones	48
7. Perspectivas	49
8. Referencias.....	50

AGRADECIMIENTOS

A Oliva y José Luis, por todo el apoyo que me han dado siempre, gracias papás.

A Alejandro y Oskar, mis hermanos, por todas las veces que logran robarme una sonrisa y por confiar en mí como lo hacen.



Al Dr. Rudolf Buijs, por haberme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio y por todo lo que he aprendido ahí.

A la Dra. Carolina Escobar, por revisar este trabajo y darme siempre comentarios productivos.

A los doctores Fernando Peña y David Velázquez y a la Lic. Katia Rodríguez por leer mi tesis y darme sus comentarios.

A Dani, por todo lo que compartimos en el laboratorio

Agradezco el apoyo de CONACyT 79797 y PAPIIT 209711 para la realización de este trabajo

RESUMEN

Para regular el metabolismo se han descrito células productoras de neurotransmisores inductores (orexigénicas) o inhibidores (anorexigénicas) de la ingesta de alimento. Entre las sustancias con efectos orexigénicos se encuentran el péptido relacionado con agouti (AGRP), la epinefrina (EPI), la norepinefrina (Nor) y neuropéptido Y (NPY), mientras que entre las anorexigénicas se encuentran la α -melanocortina (α -MSH) y los transcritos regulados por cocaína y amfetamina (CART). Se ha demostrado que el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) es especialmente susceptible a la acción de estas sustancias aumentando o disminuyendo la cantidad de alimento ingerido.

En contraste con la organización central de la salida autónoma y endócrina, el entendimiento de las vías neuronales que llevan al inicio de la conducta de ingesta por la estimulación de este núcleo es poco claro, porque la activación conductual típicamente requiere la participación de estructuras extrahipotalámicas y corticales a las que no proyecta directamente el PVN. Se propone que el PVN podría comunicarse con estas estructuras a través de proyecciones a núcleos del tallo cerebral, como el núcleo del tracto solitario (NTS).

Así, el objetivo de este trabajo fue identificar estructuras extrahipotalámicas en el sistema nervioso que inician la conducta alimenticia por la acción del NPY y comprobar que su actividad es regulada por la estimulación del PVN.

Para esto, se realizaron microinyecciones unilaterales de NPY dentro de éste núcleo y se retiró la comida para evitar las señales de consumo y saciedad, se hizo un análisis mediante inmunohistoquímica de la cantidad de proteína c-Fos, como indicador de la actividad neuronal, expresada en el tallo cerebral, la corteza cerebral y médula espinal.

Los resultados muestran que hay un aumento en la actividad de la corteza del cíngulo, la corteza infralímbica, prelímbica, piriforme e insular, así como el núcleo del tracto solitario, además, se observaron cambios en la médula espinal.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El hipotálamo y el mantenimiento de la homeostasis.

El hipotálamo es una estructura filogenéticamente antigua involucrada de manera importante en muchas respuestas autónomas y conductuales que son esenciales para la supervivencia (Kruk et al., 1998). Es una de las partes del diencefalo, junto con el tálamo, y se sitúa en la mitad ventral, en la base del cerebro anterior, unido al quiasma óptico en la parte ventral, al tegmentum del mesencefalo en la parte caudal, en la parte dorsal con la zona incierta en casi toda su longitud y en la parte lateral por los pedúnculos cerebrales (Paxinos, 2004). Forma el piso y las paredes ventrales del tercer ventrículo y se conecta con la glándula pituitaria a través del tallo infundibular (Purves, 2004).

Aunque el hipotálamo de los mamíferos consta de más de cuarenta núcleos y áreas histológicamente diferentes y muchos de los núcleos pueden a su vez dividirse en sub núcleos (Simerly, 1995), algunos autores dividen el hipotálamo en cuatro grandes regiones en el eje anteroposterior y tres zonas en el eje lateral, con sus principales núcleos (véase tabla 1 y figura 1).

Tabla 1.1.1 Principales subdivisiones y núcleos hipotalámicos (Modificado de Paxinos, 2004)

Zona/Región	Preóptica	Anterior	Tuberal	Mamilar
Lateral	Área preóptica lateral (LPO) Núcleo preóptico magnocelular (MCPO)	Área hipotalámica lateral (LH) Núcleo supraóptico (SON)	Área hipotalámica lateral (LH) Núcleo tuberal (TU)	Área hipotalámica lateral (LH) Núcleo magnocelular del área hipotalámica lateral (LHA) Núcleo ventral tuberomamilar (TMV)
Medial	Área preóptica medial (MPA) Núcleo preóptico medial (MPO) Núcleo preóptico anterodorsal (AD) Núcleo preóptico anteroventral (AV) Núcleo paraestrial (PS) Núcleo preóptico posterodorsal (PD)	Área hipotalámica anterior (AHA) Núcleo hipotalámico anterior (AH) Área retroquiasmática (RCh) Nucleus circularis (NC)	Área tuberal (TA) Núcleo ventromedial (VMH) Núcleo dorsomedial (DMH)	Núcleo dorsal premamilar (PMD) Núcleo ventral premamilar (PMV) Complejo mamilar Núcleo mamilar medial (MM) Núcleo mamilar lateral (LM) Núcleo supramamilar (SuM) Área hipotalámica posterior
Periventricular	Núcleo preóptico periventricular (PePO) Órgano vasculoso de la lámina terminal Núcleo preóptico mediano (MPO) Núcleo periventricular anteroventral (MnPO) Núcleo supraquiasmático preóptico (PSCh)	Núcleo periventricular anterior (PeA) Núcleo supraquiasmático (SCN) Núcleo paraventricular (PVN)	Núcleo tuberal periventricular (PeI) Núcleo arqueado (ARC)	Núcleo periventricular posterior (PeP) Núcleo tuberomamilar dorsal (TMD).

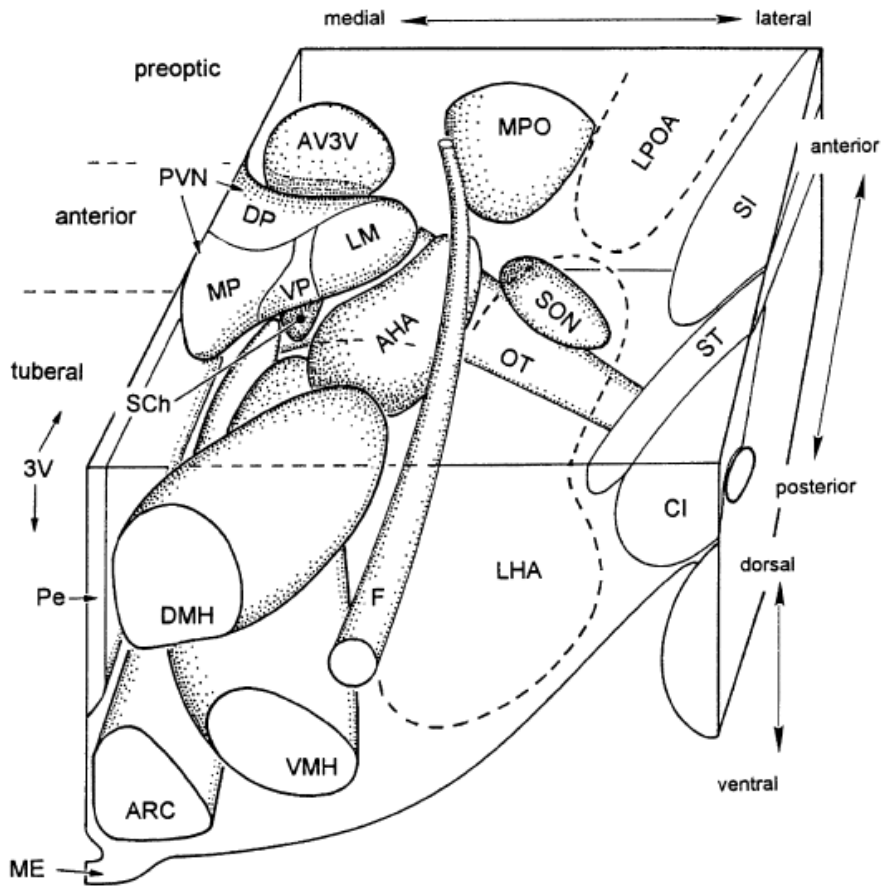


Figura 1.1 Vista tridimensional del hipotálamo de rata (Berthoud, 2002)

El hipotálamo es conocido por ser un centro de integración de procesos esenciales para la supervivencia de muchas especies y la diversidad de su capacidad regulatoria se refleja en su estructura, neuroquímica y conexiones (Squire, 2008).

Entre las diversas funciones en las que la participación del hipotálamo es por lo menos parcialmente comprendida se incluyen:

- + **Los ritmos circadianos:** organizando los períodos de actividad y reposo y modulando la actividad y sensibilidad a las hormonas de diversos órganos internos (Buijs et al., 2001, Kalsbeek et al., 2006), mediante el núcleo supraquiasmático y la zona subparaventricular, con la que está estrechamente asociado, junto con La zona periventricular, que contiene la

mayoría de las neuronas que proyectan a la glándula pituitaria y está principalmente involucrada en la regulación de la secreción de de hormonas desde ésta glándula

- ✚ **El control del flujo sanguíneo y balance hídrico:** promoviendo ajustes en la salida cardiaca, el tono vasomotor, la molaridad sanguínea, la actividad renal y motivando a la ingesta de líquidos y el consumo de sal. Los núcleos alrededor de la zona periventricular pueden ser vistos como un subsistema involucrado en la regulación de la conducta de ingesta y sed, éstos incluyen el órgano subfornical, el núcleo preóptico mediano, el núcleo dorsomedial y el núcleo paraventricular con sus proyecciones al sistema nervioso autónomo.
- ✚ **La coordinación de las respuestas ante condiciones amenazantes:** mediante el control de la liberación de hormonas de stress, modulando el balance entre el tono simpático y parasimpático y modificando la distribución regional de flujo sanguíneo, a través de un grupo de núcleos de la zona media altamente interconectados: el área hipotalámica anterior, y los núcleos premilares dorsomedial, ventromedial y dorsal, que están altamente involucrados en las conductas defensivas (Purves, 2004).
- ✚ **La regulación de la actividad reproductiva:** mediante la influencia en la identidad de género, orientación sexual y conducta de cópula, y en el caso de las hembras, regulando los ciclos menstruales, el embarazo y la lactancia, en la que participan un grupo de núcleos sexualmente dimórficos, incluyendo algunos altamente interconectados, como el preóptico mediano, el núcleo cama de la estría terminalis y los núcleos premilares ventrolateral, ventromedial y ventral, que tienen un papel crítico en la expresión de la conducta sexual.

- ✚ **La regulación del metabolismo y gasto energético:** monitoreando y regulando los niveles de glucosa en sangre y regulando la temperatura, la conducta de ingesta, las funciones digestivas y la tasa metabólica, mediante la participación del hipotálamo ventromedial, el hipotálamo dorsomedial, el hipotálamo lateral, que además parece involucrados en el nivel de alerta y el procesamiento de información sensorial específica (Risold et al., 1997, Swanson, 2000). El núcleo paraventricular y el núcleo arqueado.
- ✚ **Regulación de la temperatura corporal:** a través del área preóptica y en interacción con algunas zonas involucradas en el metabolismo.

1.2. Regulación del metabolismo, homeostasis energética y la ingesta de alimento.

1.2.1 La Conducta de alimentación y balance de energía.

El balance energético se logra mediante el control coordinado de dos sistemas diferentes, uno promueve el gasto energético, que facilita o limita el uso de los recursos energéticos disponibles en el organismo en procesos como la regulación de temperatura, el metabolismo basal y la actividad física, y el otro promueve la entrada de energía mediante la frecuencia, cantidad y tipo de alimentación (Skibicka, 2009).

La alimentación, considerada como proceso, consta de cuatro fases (Watts, 2000):

- I. **La iniciación:** es producto de los cambios en el estado energético interno del organismo o es consecuencia de algún incentivo con valor hedónico. Esta etapa lleva a un cambio en el estado motivacional, lo que permite seleccionar el programa motor adecuado para pasar a la fase de procuración.
- II. **La procuración:** se compone de conductas no estereotipadas y voluntarias que son altamente variables en duración y complejidad. Dirige al individuo a la búsqueda del alimento y por lo tanto incluye la conducta de forrajeo. Tiene una influencia importante de la anticipación de una recompensa y de los sistemas de aprendizaje y memoria.
- III. **El consumo:** son movimientos rítmicos y estereotipados con relativamente poca influencia del aprendizaje y memoria. Se realizan para la ingestión de los alimentos.
- IV. **La terminación:** lleva a la iniciación de otra conducta motivada que tenía menor prioridad hasta antes del consumo de los alimentos.

La información sobre el estado metabólico derivada de diferentes modalidades sensoriales integradas en el cerebro contribuye a la regulación de cada una de las fases de la conducta alimenticia.

Recientemente, se han identificado grupos de neuronas específicas que actúan como sensores de moléculas, metabólicas y hormonales indicadoras de las condiciones energéticas de todo el organismo (Tabla 2.1). Estas moléculas y grupos neuronales pueden clasificarse en:

- **Orexigénicas:** señalizan un estado metabólico negativo, es decir, bajas reservas de energéticas y un estado de anabolismo o ahorro de energía. Inducen la ingestión del alimento.
- **Anorexigénicas:** señalizan un estado metabólico positivo, como altos niveles de reservas energéticas (carbohidratos y grasas) y un estado de catabolismo para aumentar el gasto de energía. Inhiben la ingestión del alimento.

Tabla 1.2.1.1 Señales neuronales y humorales reguladoras la homeostasis energética.

	Catabólicas / Anorexigénicas	Anabólicas / Orexigénicas
<ul style="list-style-type: none"> • Grupos Neuronales 	<ul style="list-style-type: none"> • Hormona liberadora de corticotrofinas (CRH) • Hormona estimulante de melanocortinas α (α-MSH) • Transcrito relacionado a la cocaína y anfetamina (CART) • Somatostatina • Neurotensina • Péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP1) • Serotonina • Ácido γ amino butírico (GABA) • Urocortina • Hormona Liberadora de Tirotrófina 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Neuropeptido Y (NPY) ○ Péptido relacionado a agouti (AGRP) ○ Hormona concentradora de melanina (MCH) ○ Orexinas A y B (hipocretinas 1 y 2) ○ Galanina ○ Dinorfina ○ Hormona liberadora de hormona de crecimiento ○ Glutamato ○ Opioides endógenos ○ Endocannabinoides ○ Catecolaminas ○ Grelina

	<ul style="list-style-type: none"> • Colecistocinina (CCK) • Neuropeptido B y W • Péptido similar a galanina 	
<ul style="list-style-type: none"> • Señales humorales de la periferia 	<ul style="list-style-type: none"> • Leptina • Insulina • Péptido relacionado al gen de la calcitonina • Péptido YY • Estradiol • CCK • Bombesina • Amilina 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Grelina

Dichas moléculas actúan sobre sitios específicos que inician respuestas de salida destinadas a mantener los niveles de energía constantes.

Investigaciones recientes apuntan a la existencia de diferentes circuitos cerebrales involucrados en la regulación de las diferentes etapas de la ingesta. Aunque estos circuitos no actúan de manera independiente, hay por lo menos tres niveles en los que la ingesta de alimentos puede ser regulada: el tallo cerebral, el hipotálamo y el sistema cortico-límbico-estriatal (Adan et al. 2008).

1.2.2 Regulación Extrahipotalámica de la conducta alimenticia

1.2.2.1 Tallo cerebral

El tallo cerebral es un lugar de entrada y salida al sistema nervioso de proyecciones provenientes de las vísceras con información digestiva y metabólica. Los núcleos del tallo cerebral involucrados en estas funciones son el núcleo del tracto solitario (NTS) y el complejo vagal (DMX). En el tallo cerebral también se encuentra el área postrema, zona limita con el cuarto ventrículo y carece de barrera hematoencefálica, lo que le permite tener acceso a moléculas metabólicas en el líquido cefalorraquídeo.

El tallo cerebral tiene una participación importante en la conducta de la ingesta, ya que es capaz de organizar elementos de la conducta de ingesta en la ausencia de señales provenientes del telencéfalo o el hipotálamo. Sin embargo, la capacidad de respuesta del tallo cerebral es limitada a un sistema de regulación inmediato y se basa en un sistema reflejo, por lo que es necesario la participación de otras estructuras superiores para ajustar la ingesta de alimento dependiendo del tiempo, las reservas energéticas disponibles, el tiempo entre comidas y otros factores como la motivación por conseguir el alimento.

Cuando se estudia la participación del tallo cerebral en la conducta alimenticia mediante ratas descerebradas, se ha demostrado que los animales son capaces de ingerir alimentos de manera refleja, pueden discriminar los sabores y rechazar aquellas sustancias de sabores desagradables; adicionalmente, pueden rechazar la comida cuando se encuentran satisfechos y, en condiciones de ayuno, ingerir alimentos que previamente rechazaron debido al sabor.

Por otro lado, estos animales, a pesar de que son capaces de responder a señales de saciedad inmediatas, no presentan una organización de las comidas a lo largo del día cuando ésta se encuentra disponible, y tras períodos de ayuno, consumen una cantidad relativamente igual de alimento a la que consumieron antes del ayuno, a diferencia de las intactas, en las que la ingesta se ve aumentada después de la privación de alimento (Grill et al, 2001).

Se ha demostrado que el núcleo del tracto solitario (NTS) es un área en el cerebro que tiene una población significativa de neuronas que expresan el gen POMC, del que se deriva α -MSH, y receptores a melanocortinas como MC4-R. Además, las neuronas del NTS producen NPY junto con EPI y NE; que están altamente relacionadas con el control de la ingesta.

El NTS es un centro integrador que recibe una gran cantidad de información sensorial de las vísceras, y está organizado de manera organotópica, recibiendo

en su parte más rostral información gustativa, seguido de información proveniente del la faringe, el estómago y en su parte más caudal recibe señales desde el intestino, dichas señales podrían contribuir como marcadores de saciedad.

Las señales de saciedad generadas en el tracto gastrointestinal durante la comida regulan la ingestión de alimentos con base en la sensación de “estar lleno” (fullnes). Después de entrar en el lumen del tracto gastrointestinal, los nutrientes disparan la secreción de una gran variedad de péptidos, que entre otros efectos, activan vías simpáticas y del vago que proyectan al NTS, donde proveen información sobre las propiedades de la comida como la cantidad y propiedades químicas. Algunas de las fibras viscerosensoriales terminan en neuronas catecolaminérgicas y alrededor del NTS (grupos de neuronas A2 y C2-C3) (Stricker et al, 2004).

La gran mayoría de las señales viscerosensoriales son conducidas al hipotálamo mediante vías multisinápticas desde la médula espinal y el tallo cerebral caudal, especialmente desde el NTS, la mayoría desde interoceptores viscerosensoriales, que se encuentran relacionados con funciones autónomas como la barorecepción, respiración, motilidad gástrica e ingesta de alimentos.

Metabolitos, hormonas y otras sustancias secretadas en la periferia relacionadas con la ingesta, como la leptina, también pueden actuar directamente sobre el área postrema y algunas partes del núcleo del tracto solitario que carecen de barrera hematoencefálica.

Entre muchos otros destinos, las neuronas del NTS proyectan sobre todo al núcleo parabraquial, al núcleo paraventricular y a otros centros hipotálámicos (Berk et al., 1981). Las señales somatosensoriales, incluyendo nociceptivas, pueden alcanzar el sistema hipotálamo-hipofisario directamente a través del tracto espinotalámico, por colaterales de axones de fibras del tracto espino-retículo-talámico y/o de

tractos espinotalámicos, o a través de la activación del sistema catecolaminérgico del tallo cerebral (Palkovits, 1999). Además, el NTS proyecta a diversas regiones de la corteza prefrontal, incluyendo la región insular e infralímbica.

1.2.2.2 Corteza prefrontal

Aunque la médula espinal, el tallo cerebral y el hipotálamo contienen las motoneuronas y los circuitos suficientes para mantener la parte refleja de la alimentación, se necesita la participación del telencéfalo para dirigir los componentes conductuales de carácter motivacional (orientado a metas) como la iniciación y procuración en la conducta alimenticia, que como se ha descrito, son conductas altamente variables entre animales de la misma especie.

Se ha descrito que la corteza prefrontal (PFC) medial está relacionada con la modulación de respuestas autónomas, mientras que las áreas de la corteza insular en la PFC lateral reciben en su mayoría entradas nerviosas provenientes de los sistemas sensoriales viscerales, principalmente a través del núcleo del tracto solitario (Van der Kooy et al., 1982, Van Eden et al., 2000).

Entre las estructuras corticales, la corteza infralímbica y la prelímbica junto con la corteza del cíngulo son buenos candidatos para mandar señales relacionadas con el inicio de conductas motivadas. La corteza infralímbica puede iniciar la activación general y las respuestas autónomas necesarias que caracterizan las respuestas apetitivas (Valdés, 2006), ya que tiene proyecciones hacia núcleos hipotalámicos como el PVN, DMH y LH, y al tallo cerebral, particularmente al NTS. La corteza del cíngulo y prelímbica, proyectan también al tallo cerebral, particularmente a las áreas A1/A5, así como al NTS y a la médula espinal, en la columna intermediolateral.

Estudios recientes apuntan a que la corteza infralímbica es un área clave en el inicio y procuración de la conducta apetitiva, sobre todo en condiciones de ayuno, ya que puede proveer señales a estructuras subcorticales que están relacionadas con las conductas preparatorias, como la activación conductual y el incremento en la temperatura observados al inicio de la conducta alimenticia (Valdés, et al., 2006).

1.2.3 Regulación Hipotalámica de la conducta alimenticia

El hipotálamo es un elemento clave en el sistema regulación del metabolismo, la mayoría de los trabajos de investigación se han centrado en su papel como centro integrador, ya que recibe información del estado metabólico mediante proyecciones neuronales provenientes del tallo cerebral y mediante los órganos circunventriculares, que permiten monitorear señales humorales. Los mediadores humorales están presentes en la circulación sanguínea a niveles que reflejan los niveles de carbohidratos y la cantidad de grasa acumulada en el cuerpo en distintos compartimentos, como el tejido adiposo o hepático, y transmiten esta señal mediante receptores neuronales en el sistema nervioso central para provocar las repuestas metabólicas y conductuales apropiadas dentro de periodos cortos de tiempo (Barsh et al., 2009). Moléculas como leptina, colecistocinina (CCK), insulina o grelina, pueden conducir a efectos catabólicos o anabólicos en el organismo mediante neuropéptidos.

Algunas de las neuronas clave en la detección y monitoreo de nutrientes dentro del hipotálamo han sido identificadas dentro del núcleo arqueado, el hipotálamo ventromedial y en el hipotálamo lateral (Ver tabla 1). La evidencia electrofisiológica indica que éstas neuronas presentan respuestas neurofisiológicas de excitación o inhibición específicas a cambios en los niveles extracelulares de nutrientes (Jo et al., 2009, Oomura et al., 1969, Song et al., 2001, Wang et al., 2006), además de poseer un conjunto único de enzimas transportadoras y canales iónicos que les permiten detectar y procesar nutrientes (Blouet et al., 2010).

Así, se han identificado cinco áreas estrechamente relacionadas con la ingesta de alimentos dentro del hipotálamo (Ver tabla 1):

- ✚ **El núcleo arqueado (ARC).** En este núcleo se distinguen dos poblaciones neuronales relacionadas con la regulación del estado energético del organismo: las neuronas que expresan las sustancias orexigénicas NPY y AGRP y otra población neuronal que expresa los péptidos anorexigénicos del gen POMC y CART. Además, este núcleo es sensible a indicadores metabólicos presentes en la circulación como leptina, grelina, insulina y glucosa. El ARC proyecta principalmente al PVN y al área lateral del hipotálamo (LHA), aunque en general, es aceptado que este núcleo transmite estas señales al resto del hipotálamo para organizar la conducta alimenticia.

- ✚ **El área hipotálamica lateral (LHA).** La estimulación de este núcleo provoca ingestión del alimento aún en animales saciados. Posee dos poblaciones neuronales, que expresan MCH o hipocretinas/orexinas. Además está interconectado con otros núcleos del hipotálamo medial y con neuronas glucosensibles estimuladas por hipoglucemia. Además, el LHA recibe proyecciones de neuronas POMC, expresa receptores a NPY, y proyecta al PVN, es muy sensible a la acción orexigénica de este péptido cuando se inyecta localmente.

- ✚ **El hipotálamo ventromedial (VMH).** Es un sitio clave para la acción de la leptina, que actúa en la inhibición de la ingesta de alimentos, también recibe proyecciones desde el ARC y otros núcleos involucrados en la ingesta.

- ✚ **El hipotálamo dorsomedial (DMH).** Posee abundantes conexiones con otros núcleos hipotalámicos mediales, integra información de estos núcleos, incluyendo el VMH, también posee receptores a leptina.

✚ **El núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN).** Es un núcleo integrador en el que convergen numerosas vías implicadas en la homeostasis energética, incluyendo proyecciones desde el ARC. El núcleo tiene abundantes terminales que contienen péptidos o neurotransmisores conocidos por modificar el apetito, como NPY y α -MSH, serotonina, galanina, noradrenalina, adrenalina y los péptidos opioides. Este núcleo es una vía de salida a través de la cual se pueden modificar la actividad del sistema nervioso autónomo comunicándose con neuronas del sistema nervioso autónomo. También modifica los niveles hormonales mediante sus neuronas endócrinas. Ambas vías pueden estar involucradas en el control del metabolismo (Kalsbeek et al., 2010).

Reportes previos demuestran que lesiones del PVN causan déficits en el control de la conducta alimenticia (Shor-Posner, et al., 1985). Se ha demostrado, además, que la estimulación eléctrica del PVN altera la actividad basal del Complejo Dorsal del Vago (DVC) y su capacidad de respuesta a la estimulación gastrointestinal (Zhang et al., 1999).

Una inyección de norepinefrina, epinefrina o NPY dentro del PVN tiene efectos orexigénicos (Leibowitz, 1988), por lo que se ha convertido en el blanco de la mayoría de la investigación orientada a la regulación de la ingesta. El NPY produce la respuesta más fuerte de alimentación, es una respuesta dependiente de la dosis, con una latencia corta, incluso en animales saciados o que se encuentran en su fase de reposo, durante la que normalmente no consumen grandes cantidades de alimento (Stanley et al, 1985, Taylor et al, 2007). Los estudios realizados a la fecha se han centrado sobre todo en la relación existente entre el hipotálamo y sus blancos en el tallo cerebral, sin embargo, el efecto de estas inyecciones sobre otros sitios del sistema nervioso que pueden participar en el proceso de inicio y de procuración del alimento, que implican conductas motivadas, no ha sido explorado.

2. Objetivos e hipótesis

2.1 Planteamiento del problema

Dentro del sistema nervioso, el hipotálamo es uno de los sitios más sensibles a la acción de diversas sustancias que provocan el inicio de la conducta alimenticia, como el péptido relacionado con agouti (AGRP), epinefrina (EPI), norepinefrina (Nor) y neuropéptido Y (NPY). Se ha demostrado que el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) es especialmente susceptible a la acción de estas inyecciones.

En contraste con la organización central de la salida autónoma y endócrina, el funcionamiento de las vías neuronales que llevan al inicio de la conducta de ingesta por la estimulación del PVN es mucho menos claro. Debido a que las proyecciones del PVN son en su totalidad descendentes y no se han descrito proyecciones directas del PVN hacia áreas reguladoras de la activación y la motivación conductual, la activación de éstas áreas para el inicio de la conducta alimenticia será a través de un relevo en el tallo cerebral (NTS).

2.2 Objetivo

Identificar las principales áreas extrahipotálamicas que participan en el inicio de la conducta de ingesta y la procuración de alimento tras la administración de NPY dentro del PVN.

2.3 Hipótesis

Hipótesis: La administración unilateral de NPY dentro del núcleo paraventricular del hipotálamo sin el permitir a las ratas el consumo de alimento conducirá a una activación del NTS y de estructuras corticales relacionadas con el inicio de la ingesta de alimento.

Las áreas corticales que reciben inervación directa del NTS mostrarán actividad neuronal.

3. Metodología

3.1 Sujetos.

Se usaron ratas macho de la cepa Wistar proporcionadas por el bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM, de entre 250-300 gr de peso al momento de la implantación de la cánula. Las ratas fueron alojadas en un cuarto con temperatura de aproximadamente 21°C y un ciclo luz-obscuridad con el encendido de luces a las 7:00 hrs y el apagado de luces a las 19:00 hrs, se colocaron individualmente en cajas de acrílico, alimentadas con pellets de Purina rat chow y agua ad libitum, excepto cuando se indique lo contrario.

La manipulación de los animales se realizó bajo las normas de uso de animales de experimentación, según el decreto de ley de protección a los animales, emitida en la Gaceta Oficial del Distrito Federal el 26 de febrero de 2002.

3.2 Diseño experimental

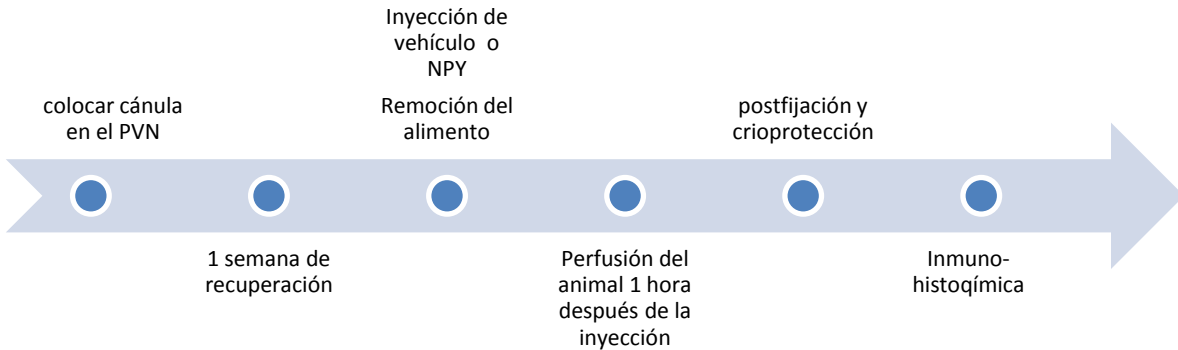


Figura 3.2.1 Esquema del diseño experimental

Los animales fueron asignados aleatoriamente a uno de los siguientes tratamientos:

Sitio/ Tratamiento	Vehículo	NPY
PVN	3 de 6	9 de 12

3.3 Cirugía.

A todas las ratas les fue administrada una dosis intramuscular de 180 µl de ketamina y una dosis de 100 µl de xilacina intraperitoneal, dosis adicionales de anestésicos fueron administradas en los casos necesarios. Fue implantada una cánula guía de acero inoxidable de 21G mediante cirugía estereotáxica, se colocaron tres tornillos en la superficie del cráneo y se cubrieron con polímero dental para evitar el desprendimiento de la cánula.

Las coordenadas estereotaxicas para colocar la punta de la cánula guía en el PVN son: 1.1 mm posterior a bregma, 0.9 mm lateral a la cisura central, con un ángulo de 4°, y 6.9 mm ventral a la duramadre, con la cabeza un ángulo de -2.5° entre lambda y bregma según el atlas Paxinos y Watson (2007), véase fig. 3.3.1.

La localización de la cánula fue verificada mediante histología después del sacrificio del animal.

Todas las ratas fueron manipuladas en los días siguientes a la cirugía.

ventrículo izquierdo del corazón hacia la aorta de los animales con 300 ml de solución salina isotónica al 9%, seguido de 200 ml de una solución de paraformaldehído al 4% en buffer fosfato (PBS, 0.1M, con un pH de 7.2).

Una vez terminada la perfusión, los animales fueron decapitados y los cerebros fueron extraídos manualmente y postfijados en la solución de paraformaldehído 24 hrs a 4°C en un cuarto frío, posteriormente se colocaron en una solución de sacarosa al 30% y 1% de azida de sodio entre 48-72 hrs a 4°C en agitación para favorecer la entrada de la solución en el tejido.

3.6 Inmunohistoquímica.

Los cerebros fueron cortados coronalmente en el criostato a -20°C en secciones de 40µm de grosor y mantenidas en una solución de sacarosa.

Las secciones de cerebro fueron teñidas mediante inmunohistoquímica por flotación, para observar la proteína c-Fos como indicador de actividad neuronal. Las secciones fueron incubadas en anticuerpo primario para la proteína c-Fos en conejo (Vector Laboratories Inc.) disuelto en supermix (PBS con gelatina natural al 2.5% y tritón al 5%), concentración 1:2000 por una hora a temperatura ambiente y continuaron en agitación a 4°C por una noche, posteriormente se hicieron tres lavados con PBS, se incubaron en anticuerpo secundario biotinilado hecho en burro contra conejo (Vector Laboratories Inc.) disuelto en supermix 1:200 por una hora a temperatura ambiente con agitación constante, seguido de 3 lavados con PBS, después se incubaron 1 hora en un complejo de avidina biotina (Vector Laboratories Inc.) concentración 1:500 en supermix, seguido de tres lavados para finalmente ser revelados con solución de diaminobenzidina al 2% y níquel al 1% en TBS.

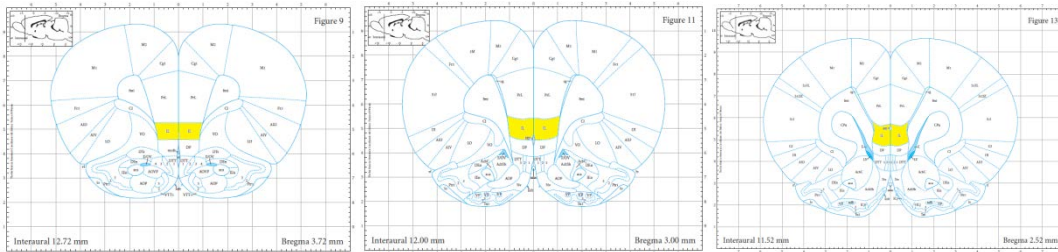
Los cortes fueron colocados en una solución de montaje y colocados sobre portaobjetos gelatinizados, se dejaron secar completamente y posteriormente se

deshidrataron al ser gradualmente al ser sumergidos en alcohol etílico al 70%, 96% y 100% y posteriormente en xileno, se cubrieron con un cubreobjetos con medio de montaje Entellan y se dejaron secar.

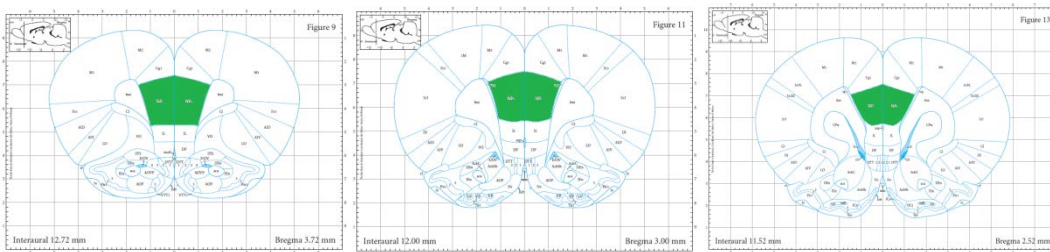
3.7 Conteos celulares.

Para los conteos celulares se consideraron solamente los cerebros con la cánula situada en el PVN. Se analizaron la corteza infralímbica, prelímbica, piriforme, del cíngulo y el núcleo del tracto solitario. Se tomaron tres secciones de cada núcleo de interés para el estudio, anterior, medial y posterior, de acuerdo con el atlas Paxinos y Watson (2007), fig 3.7.1.

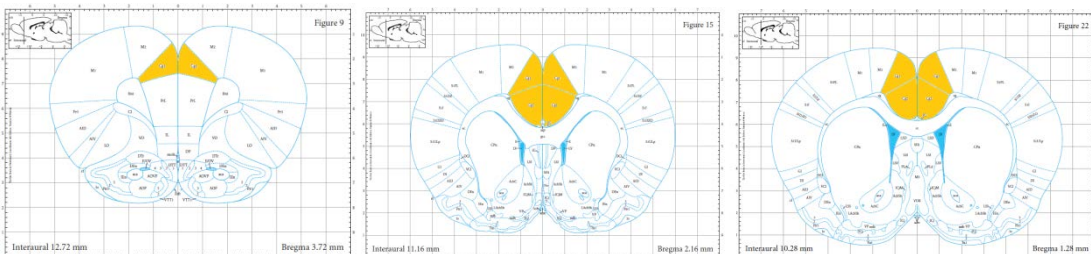
Corteza Infralímbica



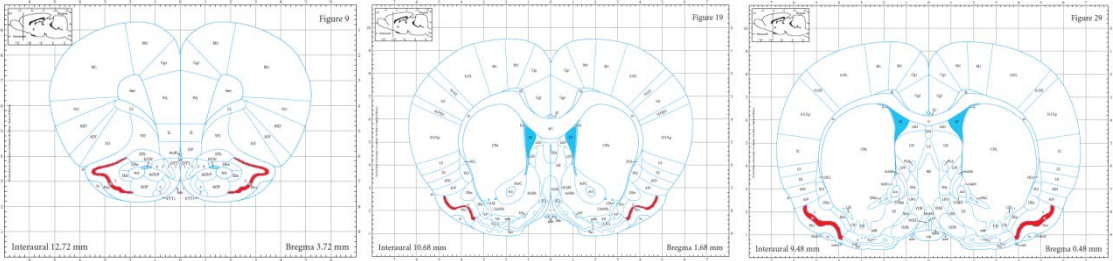
Corteza prelímbica



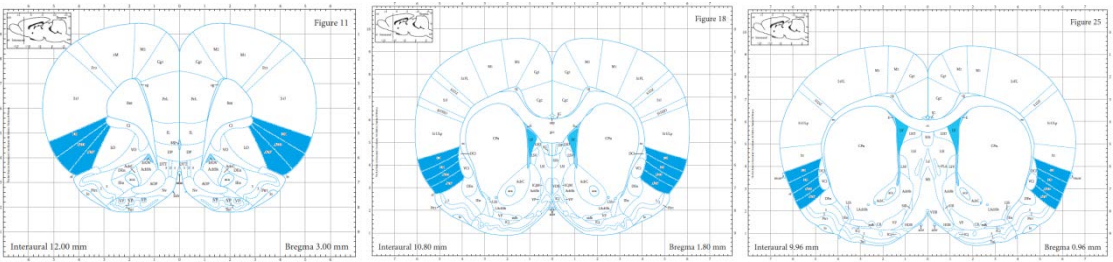
Corteza del cíngulo



Corteza Piriforme



Corteza Insular



Núcleo del Tracto solitario

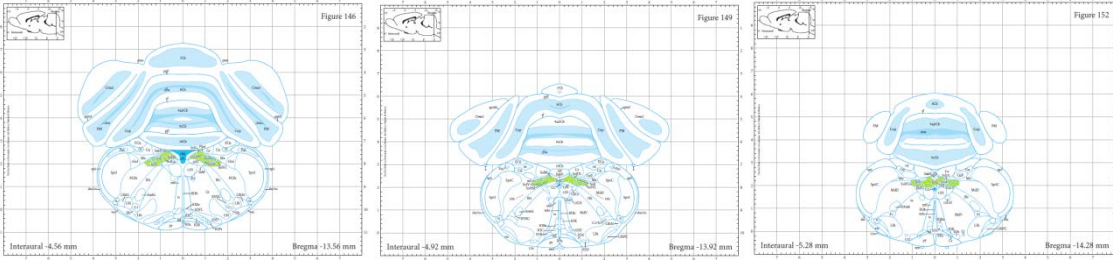


Figura 3.7.1 Esquemas en los que se muestra las diferentes áreas consideradas para análisis en su nivel anterior, medial y posterior. Modificado de Paxinos y Watson (2007).

Se tomaron fotografías mediante un microscopio óptico con un aumento 20x conectado a una computadora mediante el software DP2-BSW y fueron guardadas en formato JPG y analizadas mediante el programa ImageJ 1.42q. Los núcleos que fueron inmunoreactivos a la proteína c-Fos fueron contados bilateralmente delineando manualmente el contorno de cada uno, y estableciendo la densidad óptica en áreas sin c-Fos.

Las células marcadas que sobrepasaron el contexto de densidad óptica fueron tomadas en cuenta para los análisis. Se estimó el número total de células por lado y por grupo en cada núcleo. Se usó la prueba Kolmogorov-Smirnov para analizar la normalidad de los datos.

Debido a que los datos no muestran una distribución normal, se usó la prueba U de Mann Whitney para comprar las medias entre grupos y la prueba de Wilcoxon o una T para dos muestras relacionadas, dependiendo de la normalidad de los datos, para comparar las medias entre los dos lados de una misma región de cada mismo cerebro, todas las pruebas con un nivel de significancia al 0.05.

4. Resultados

La figura 4.1 muestra el sitio en el que se encontraba la punta de la cánula guía utilizada para la inyección de NPY. En todas las fotografías el núcleo que se encuentra del lado de la inyección se muestra a la izquierda.

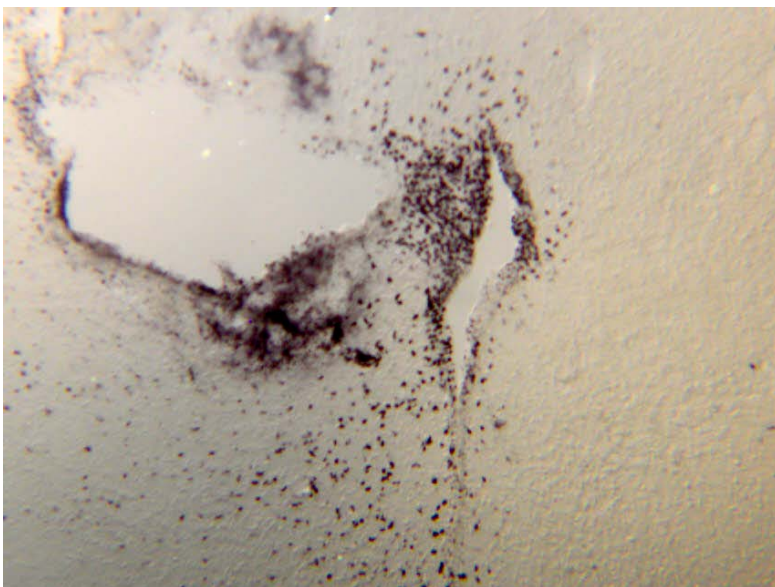


Fig 4.1 Ejemplo de la localización de la cánula en el PVN utilizada para la inyección de NPY.

4.1 Corteza infralímbica

La corteza infralímbica del grupo experimental presentó una mayor activación bilateral estadísticamente significativa ($P=0.0091$, $U=0.0$) al ser comparado mediante la prueba de U de Mann Withney con el control.

Al comparar las medias entre el lado con inyección de NPY y el lado intacto con una T para muestras relacionadas, se observó una activación mayor en el lado no inyectado, que fue estadísticamente significativa ($P=0.0053$, $t=3.792$ $df=8$) en comparación con el lado que recibió la inyección.

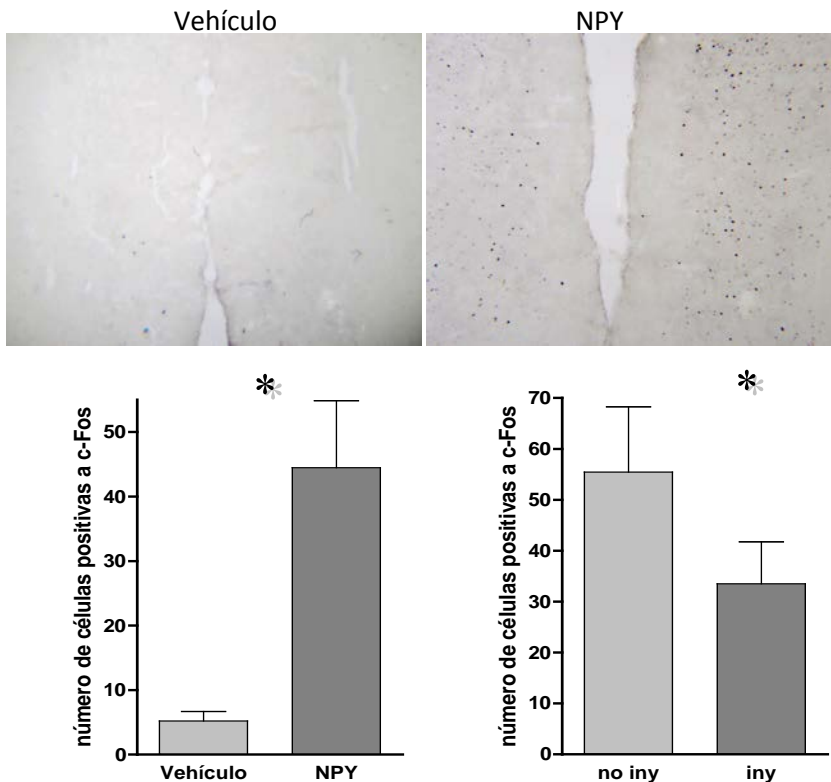


Figura 4.1.1 Resultados del análisis de la activación de la corteza infralímbica. En la parte superior se muestra imágenes de la corteza infralímbica de un animal control (izquierda) y de un animal con inyección de NPY (derecha). La gráfica de la izquierda muestra la comparación entre grupos ($P=0.0091$, $U=0.0$) y la gráfica a la derecha muestra la comparación entre lados ($P=0.0053$, $t=3.792$ $df=8$). El asterisco indica que la diferencia es estadísticamente significativa.

4.2 Corteza prelímbica

La corteza prelímbica del grupo experimental presentó una mayor activación bilateral estadísticamente significativa ($P=0.0182$, $U=1.00$) al ser comparado con el control mediante la prueba de U de Mann Whitney.

Al comparar las medias entre el lado con inyección de NPY y el lado intacto con la prueba T para muestras relacionadas, se observó una activación mayor en el lado no inyectado, que fue estadísticamente significativa ($P=0.0334$, $t=2.565$ $df=8$) en comparación con el lado que recibió la inyección.

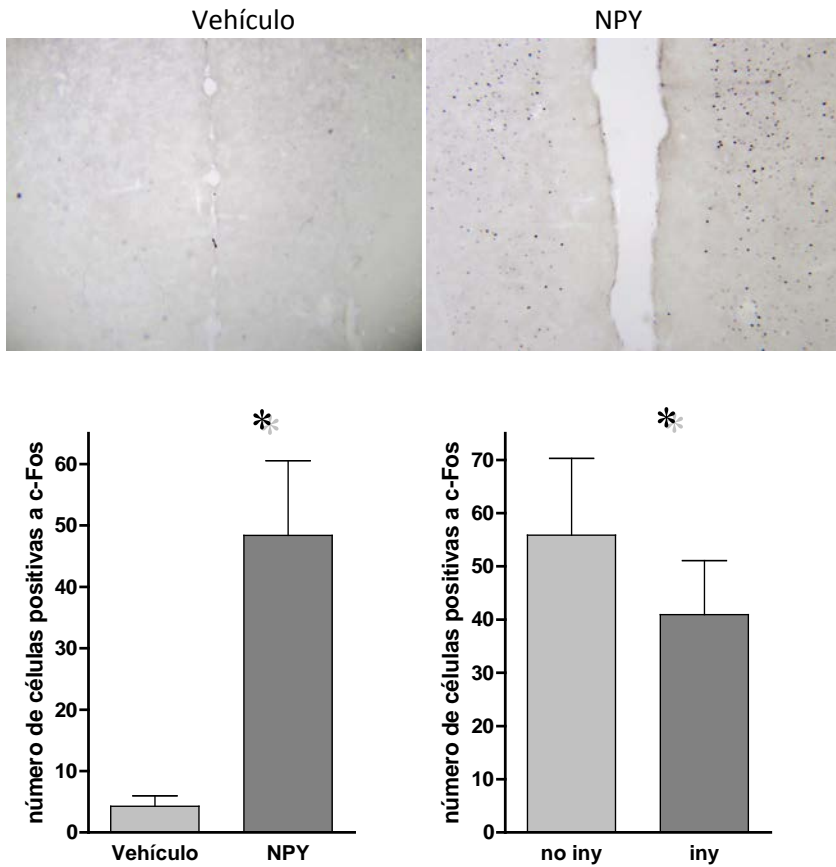


Figura 4.2.1 Resultados del análisis de la activación de la corteza prelímbica. En la parte superior se muestra imágenes de la corteza prelímbica de un animal control (izquierda) y de un animal con inyección de NPY (derecha). La gráfica de la izquierda muestra la comparación entre grupos ($P=0.0182$, $U=1.00$) y la gráfica de la derecha muestra la comparación entre lados ($P=0.0334$, $t=2.565$ $df=8$). El asterisco indica que la diferencia es estadísticamente significativa.

4.3 Corteza del cíngulo

La corteza del cíngulo del grupo experimental presentó activación bilateral estadísticamente significativa ($P < 0.0160$, $U = 0.0$) al ser comparado con el control mediante la prueba de U de Mann Whitney.

Al comparar las medias entre el lado con inyección de NPY y el lado intacto con una prueba de Wilcoxon para muestras relacionadas, se observó una tendencia a una activación mayor en el lado no inyectado, que no fue estadísticamente significativa ($P = 0.0742$, $W = 31.0$) en comparación con el lado que recibió la inyección.

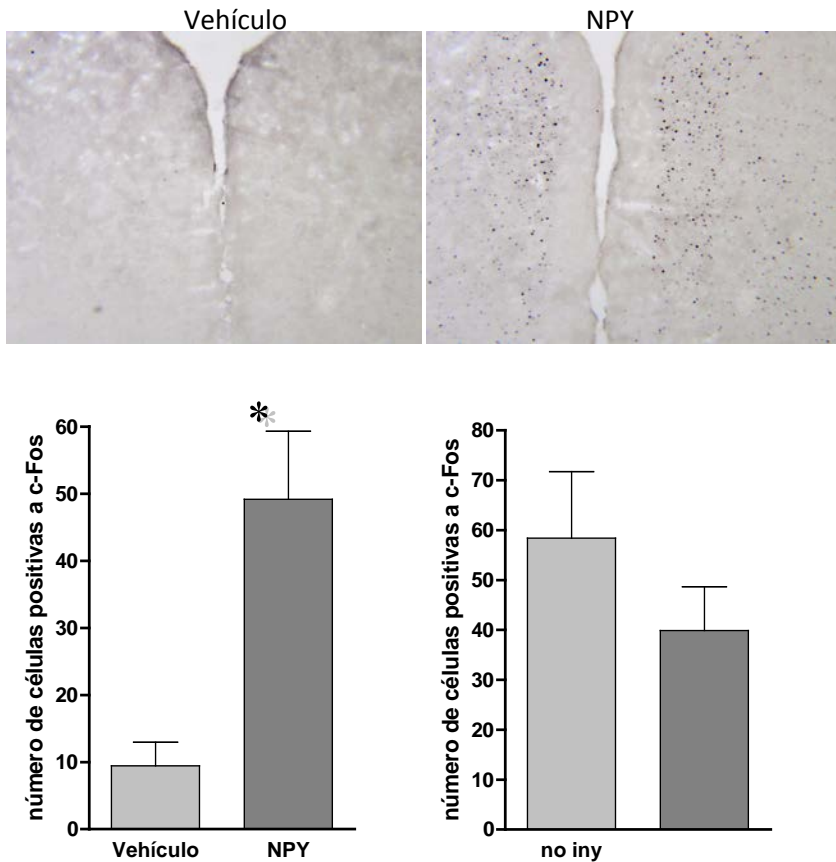


Figura 4.3.1 Resultados del análisis de la activación de la corteza del cíngulo. En la parte superior se muestra imágenes de la corteza del cíngulo de un animal control (izquierda) y de un animal con inyección de NPY (derecha). La gráfica de la izquierda muestra la comparación entre grupos ($P < 0.0160$, $U = 0.0$) y la gráfica de

la derecha muestra la comparación entre lados ($P=0.0742$, $W=31.0$). El asterisco indica que la diferencia es estadísticamente significativa.

4.4 Corteza insular

La activación de la corteza insular del grupo experimental no presentó diferencias estadísticamente significativas ($P=0.600$ $U=10.0$) al ser comparado con el control mediante la prueba de U de Mann Whitney, sin embargo, se observa un ligero incremento de células inmunoreactivas en el grupo experimental.

Adicionalmente, al comparar las medias entre el lado con inyección de NPY y el lado intacto con una prueba T para muestras relacionadas, se observó una activación mayor en el lado no inyectado, que fue estadísticamente significativa ($P=0.0009$, $t=5.136$ $df=8$) en comparación con el lado que recibió la inyección.

Vehículo



NPY

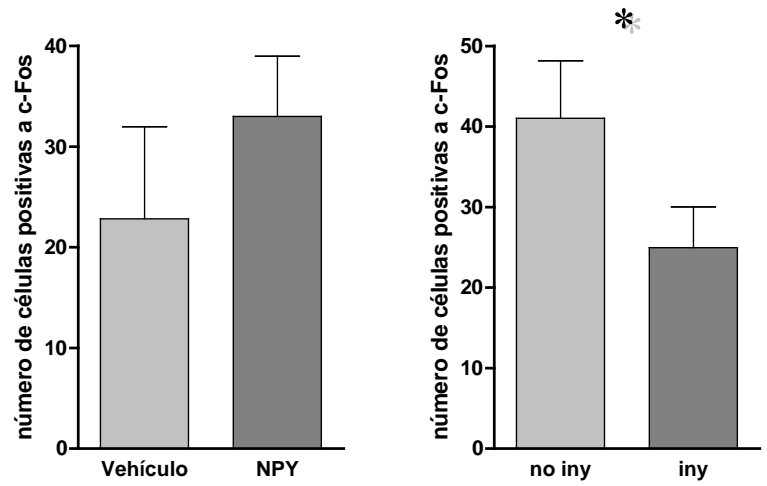
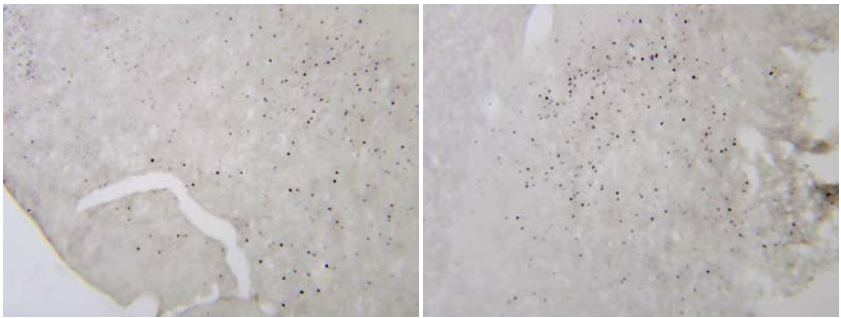


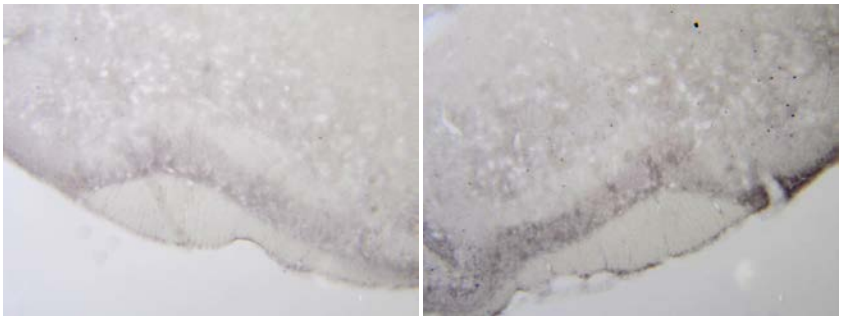
Figura 4.4.1 Resultados del análisis de la activación de la corteza insular. En la parte superior se muestra imágenes de la corteza insular bilateral de un animal control, en la parte media se muestra imágenes bilaterales de la corteza insular de un animal con inyección de NPY (derecha). La gráfica de la izquierda muestra la comparación entre grupos ($P=0.600$ $U=10.0$) y la gráfica de la derecha la comparación entre lados ($P=0.0009$, $t=5.136$ $df=8$). El asterisco indica que la diferencia es estadísticamente significativa.

4.5 Corteza piriforme

La corteza piriforme del grupo experimental no presentó activación bilateral estadísticamente significativa ($P=0.7273$, $U=11.0$) al ser comparado con el control mediante la prueba de U de Mann Whitney, sin embargo, se observa una ligera tendencia al incremento de células inmunoreactivas en el grupo experimental.

Al comparar las medias entre el lado con inyección de NPY y el lado intacto con la prueba de Wilcoxon para muestras relacionadas, se observó una activación mayor en el lado no inyectado, que fue estadísticamente significativa ($P=0.0391$, $W=35.0$) en comparación con el lado que recibió la inyección.

Vehículo



NPY

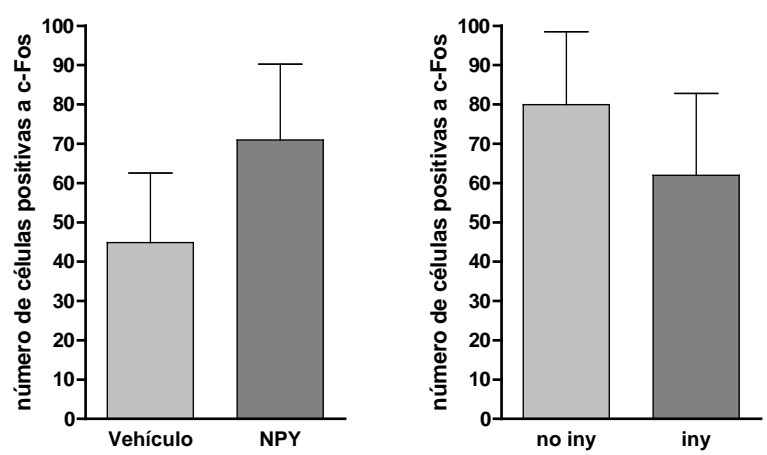
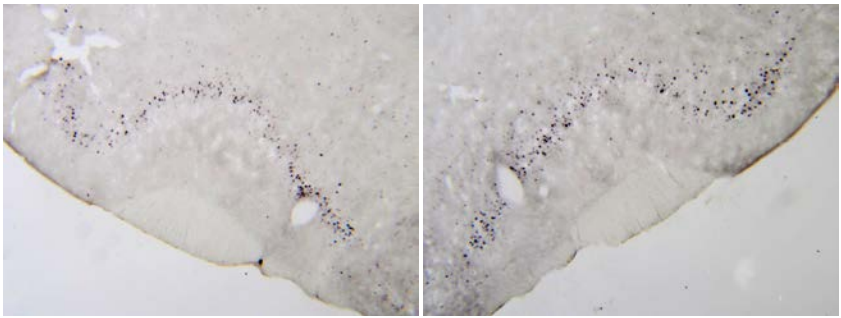


Figura 4.5.1 Resultados del análisis de la activación la corteza piriforme. En la parte superior se muestra imágenes la corteza piriforme de un animal control, en la parte media se muestra imágenes de un animal con inyección de NPY (derecha). La gráfica de la izquierda muestra la comparación entre grupos ($P=0.7273$, $U=11.0$) y la gráfica de la derecha la comparación entre lados. El asterisco indica que la diferencia es estadísticamente significativa.

4.6 Núcleo del tracto solitario

El NTS del grupo experimental no presentó diferencias significativas en la activación total en comparación con el grupo control ($P=0.8636$, $U=12.00$), sin embargo, se observa que el número de células positivas a c-Fos es ligeramente más alto en el grupo experimental.

Al comparar las medias entre el lado con inyección de NPY y el lado intacto, se observó una activación mayor en el lado no inyectado, que fue estadísticamente significativa ($P=0.0326$, $t=2.581$ $df=8$) en comparación con el lado que recibió la inyección.

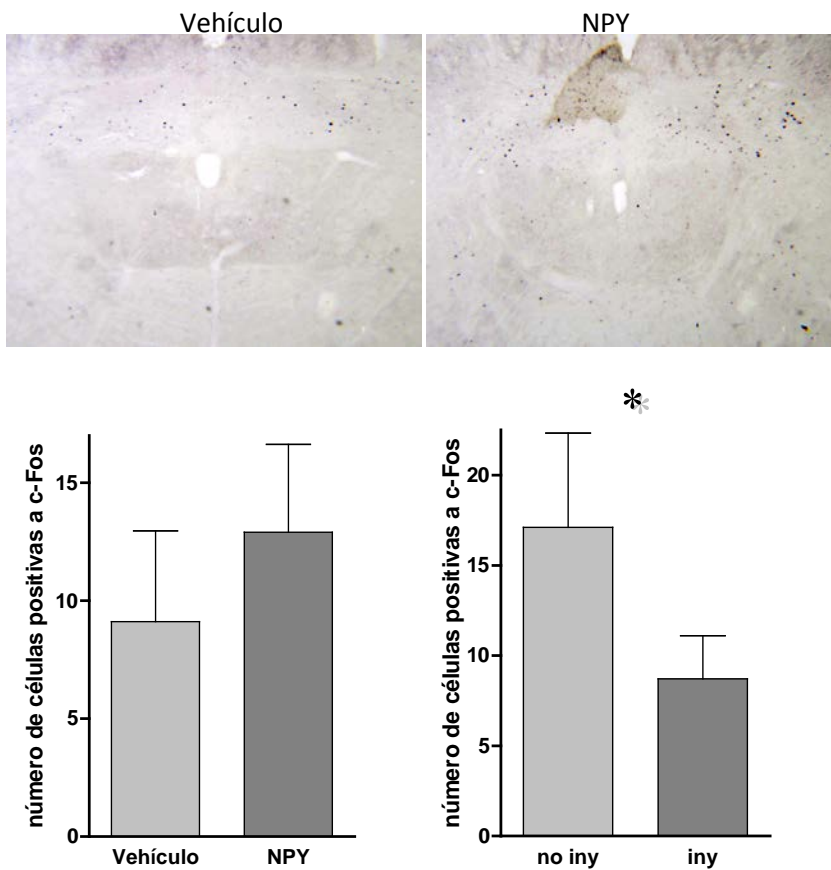


Figura 4.6.1 Resultados del análisis de la activación del núcleo del tracto solitario. En la parte superior se muestra imágenes del NTS de un animal control (izquierda) y de un animal con inyección de NPY (derecha). La gráfica de la izquierda muestra

la comparación entre grupos y la gráfica de la derecha la comparación entre lados.
El asterisco indica que la diferencia es estadísticamente significativa.

5. Discusión

Los resultados de los análisis muestran que tras una inyección de NPY, un estímulo que induce la conducta de alimentación, hay un incremento en la actividad de diversas regiones que tienen participación en la conducta alimenticia. Aunque la mayoría de las estructuras analizadas muestran un incremento en la expresión de c-Fos, la corteza infralímbica, prelímbica y el cíngulo muestran una mayor activación en comparación al control, que es estadísticamente significativa.

En el caso de la corteza piriforme, la corteza insular y el núcleo del tracto solitario, a pesar de mostrar una tendencia a un incremento en la actividad en comparación con el control, no resultaron estadísticamente significativas al compararlas con el grupo al que se le inyectó vehículo.

En todos los casos excepto en la corteza del cíngulo, las comparaciones entre lados resultaron estadísticamente significativas.

5.1 Consideraciones técnicas

Se debe tener en cuenta que la posición de la cánula puede tener un efecto en el patrón de actividad producido tras la inyección. Debido al tamaño de la cánula o a ligeras desviaciones durante la implantación de la cánula, en algunos casos la inyección no estuvo restringida únicamente al PVN, y abarcó parte de alguno de los núcleos adyacentes. Cuando esto sucedió, el número de células inmunoreactivas disminuyó ligeramente y el patrón de actividad parece más difuso. Se ha reportado que la posición de la cánula en áreas cercanas o incluso dentro del mismo PVN puede modificar la respuesta emitida por el animal (Dailey et al., 2009) y por lo tanto muy probablemente haya cambios en las regiones que expresan c-Fos, así como en el nivel de expresión. Por esta razón, se eligieron solamente los animales que tuvieron la cánula situada exactamente en el PVN.

Cuando la cánula fue colocada fuera del PVN, el patrón de activación en general a lo largo del cerebro fue diferente, por lo que esos animales no fueron incluidos en el estudio. Contrario a las expectativas, se observó únicamente un pequeño incremento en la activación del NTS que se encuentra contralateral al sitio de la inyección.

Adicionalmente, es importante considerar que el poder de la prueba estadística se ve afectado por el tamaño de la muestra, y que probablemente algunas diferencias llegarían a ser estadísticamente significativas si se aumentara el número de animales por grupo, en especial el grupo control.

5.2 Comparación entre lados

Todas las comparaciones entre ambos lados de un mismo núcleo resultaron estadísticamente significativas, excepto la corteza del cíngulo, sin embargo, contrario a lo esperado, el incremento en la expresión de c-Fos se observó en el lado contrario al sitio donde fue inyectado el neuropéptido Y. Esto puede deberse a que las proyecciones descendentes desde el PVN no permanecen ipsilaterales, y presentan decusaciones al nivel de la sustancia gris periacueductal, en el tegmentum pontino, en la médula oblongada rostral, en la médula oblongada caudal, a la altura del núcleo del tracto solitario y por último en los segmentos torácicos de la médula espinal que cruzan en la lámina X (Thót et al., 1999). Los datos de este estudio sugieren que el efecto mayor se dé en las fibras descendentes del PVN que cruzan hacia el lado contralateral a la inyección a la altura de los segmentos torácicos, por lo que a partir de ese punto se observe una mayor activación en toda la vía ascendente hasta llegar a la corteza. Debido a que las proyecciones del PVN son principalmente descendentes y terminan principalmente en el tallo cerebral y la médula espinal, y que en general las fibras no cruzan de manera importante antes de la médula caudal, en una etapa posterior del proyecto se analizó también la activación de la médula espinal. De manera interesante, la activación principal se observó en el sitio contralateral a la

inyección, en la capa sensorial de la porción cervical de la médula espinal, lo que sugiere que la inyección de NPY en el PVN activa ésta área específicamente. Futuras investigaciones usando inyecciones de trazadores neuronales en el PVN ayudarán a confirmar esta hipótesis. No se encontraron datos en la literatura que aclararan de manera eficaz las proyecciones ascendentes en relación a nuestra hipótesis de esta capa sensorial, sin embargo, los resultados de este trabajo sugieren que puede estar altamente restringido al mismo lado del cerebro.

Otros estudios demuestran que un gran número de neuronas a todo lo largo de la médula espinal mandan axones directamente al hipotálamo y otras áreas del sistema límbico, una gran proporción de estas neuronas que han sido examinadas fisiológicamente son poderosamente activadas por estímulos nocivos. Sus axones parecen ser capaces de proveer información nocieptiva al tálamo e hipotálamo, tanto ipsilateral como contralateral (Giesler et al., 1994).

Por último, es necesario tener en cuenta que varias de las regiones en las que se observó una diferencia significativa en la actividad neuronal proyectan a la médula espinal produciendo diferentes cambios, entre ellos la corteza infralímbica. Se ha demostrado que esta corteza además de proyectar a núcleos en el tallo cerebral como el NTS, proyecta a la lámina I y a la comuna preganglionar simpática, y cuando es estimulada eléctricamente se ve modificada la motilidad gástrica, por lo que se ha sugerido que puede ser una corteza mora visceral (Hurley et al., 1991, Fisk, 2000). La corteza del cíngulo, debido a que la actividad de esta región se ha relacionado con dolor crónico (Donahue et al., 2001), ya que induce una inhibición graduada de la respuesta de las neuronas de la cresta dorsal de la médula espinal a estímulos mecánicos nocivos (Senapati et al., 2005).

Por lo que la actividad de estas regiones también pudiera estar regulando la expresión de c-Fos en la médula espinal.

5.3 Comparación entre grupos.

- Corteza infralímbica y prelímbica

Se ha demostrado que la actividad de la corteza infralímbica y prelímbica aumenta en circunstancias en las que el animal espera recibir alimento, como es el caso de los animales que anticipan una comida palatable (Mendoza et al., 2005, Blancas Velázquez, 2010), o cuando el animal es atraído hacia un alimento, aumentando la tasa de disparo (Valdés et al. 2006). Ambas proyectan al NTS y han sido relacionadas con la motilidad gástrica (Fisk et al., 2000). El incremento en la expresión de Fos en ésta área puede estar relacionado con un aumento de activación general (arousal), y al impulso orientado a la obtención de alimento. Además, puede propiciar cambios en el sistema intestinal que posiblemente estén relacionados con la preparación para la ingesta de alimento. Este mismo impulso puede ser producido por la administración de NPY dentro del PVN, aumentando la conducta orientada a la obtención de la comida.

- Corteza del cíngulo

Esta región de la corteza es considerada principalmente como parte del sistema de integración visomotor (Vargo et al., 1988). Sin embargo, datos recientes indican que la corteza del cíngulo tiene un papel importante en la toma de decisiones basada en recompensas, y parece ser una región crítica en el establecimiento de las propiedades reforzantes de conductas guiadas visualmente (Bush et al. 2002), por lo que la actividad en esta región puede ser el resultado del proceso de búsqueda de alimento mediante el sistema visual, además de ser parte de un circuito de búsqueda y evaluación de recompensas.

- Corteza insular.

La corteza insular tiene entradas de información provenientes del gusto y de las vísceras, además, parece tener neuronas que aumentan su tasa de disparo en anticipación a la conducta de ingesta (Yamamoto et al. 1988), aunque la mayoría responden a estímulos relacionados con el sabor y la textura de los alimentos durante el consumo de éstos, como resultado de que el grupo control no aumentó su consumo de alimento y de que la comida fue removida del grupo experimental, podrían esperarse niveles similares de actividad en esta zona, que fuera solo ligeramente mayor en el grupo que recibió la inyección. Debido a que la información que recibe del NTS está organizada organotópicamente, el patrón y nivel de activación puede estar estrechamente relacionado.

- Corteza piriforme.

La información de tipo olfatoria es sumamente importante para la alimentación de los animales (Rudell, et al. 2011), esta información entra por el bulbo olfatorio y desde ahí pasa directamente a la corteza piriforme, la principal corteza primaria olfatoria. Desde ahí la información es transmitida a áreas de asociación polimodal como la corteza orbitofrontal y la corteza insular, donde se integran con información gustativa, visceral y somatosensorial (Berthoud, 2002). Se ha demostrado además que después de varios días de entrenamiento a una comida palatable, su actividad aumenta en anticipación (Blancas Velázquez, 2010), lo que concuerda con su participación en la búsqueda de alimento.

- Núcleo del tracto solitario

El núcleo del tracto solitario es un sitio en el converge información proveniente tanto de la periferia como cortical, estudios con trazadores neuronales han demostrado que recibe información directamente de la corteza insular, de la corteza prelímbica y de la corteza del cíngulo (Van der Kooy et al., 1992, kamper et al., 2009); sin

embargo, a pesar de la alta activación de estas zonas, la actividad de este núcleo es muy baja. Se ha reportado que la expresión de c-Fos se ve aumentada por la actividad del PVN, que ejerce una gran influencia excitatoria en el NTS, o por la distensión estomacal (Nobrega, et al. 1990, Traub et al., 1996), por lo que el NTS puede tener un papel más importante en la terminación de la alimentación mediante señales de saciedad. La baja expresión de c-Fos puede deberse a que el estómago no se encontraba lleno al momento del experimento, o a que el PVN se encontraba inhibido, por lo que las únicas fuentes de estimulación eran las entradas corticales, que proyectan bilateralmente al NTS y que pueden ser una señal débil en comparación con la entrada de información visceral o proveniente del hipotálamo.

Estos datos pueden sugerir que el inicio de la conducta alimenticia requiere de cambios que modifiquen el nivel de respuesta a estímulos sensoriales, del que pueden formar parte la corteza insular, la corteza piriforme y el núcleo del tracto solitario, ya que reciben principalmente información del gusto y olfato; y cambios en regiones relacionadas con el estado motivacional, del que pueden formar parte la corteza infralímbica y prelímbica, mas relacionados con la preparación para la ingesta y el inicio de conductas asociadas a la obtención del alimento.

5.4 NPY y el PVN

Se ha reportado que el NPY es la sustancia orexigénica más potente conocida, actuando principalmente sobre el PVN (Stanley et al, 1985, Taylor et al, 2007), de manera independiente al efecto del AGRP, el péptido con el que colocaliza en el ARC (Aponte et al., 2011). Datos obtenidos mediante electrofisiología indican que el efecto del NPY sobre las neuronas del PVN es disminuir la tasa de disparo, por lo que la actividad de las neuronas del PVN se ve inhibida, (Ghamari-Langroudi et al., 2011). Esto también se ha observado con la inyección de otras sustancias orexigénicas, con las que simultáneamente se observa una disminución de la

actividad del núcleo del tracto solitario (Nobrega et al, 1990). Los datos obtenidos son consistentes con estos reportes previos, ya que la cantidad de neuronas marcadas tanto en el PVN como en el NTS es muy baja.

La mayor densidad de proyecciones del PVN al tallo cerebral son al NTS (Geerling, et al., 2010), y se ha reportado que las neuronas oxitocinérgicas del PVN son las que tienen más relación con la hiperfagia y obesidad (Kirschgessner et al, 1988). En la capas superficiales de la médula espinal, también se han identificado colaterales axonales provenientes del PVN que contienen oxitocina y participan en la modulación de las respuestas nociceptivas (Condés-Lara et al., 2007, Rojas Piloni et al., 2010). Trabajos previos sugieren que el PVN ejerce una inhibición tónica descendente en la médula espinal, modulando la entrada de información proveniente del estómago (Traub et al, 1996), que podría estar dada por la actividad de estas neuronas provenientes del PVN.

Si la inhibición del PVN causa la pérdida de la inhibición tónica de las capas superficiales de la médula espinal (cresta dorsal), se debe observar un aumento en la cantidad de c-fos tras la inyección de NPY. Al analizar algunas secciones de médula espinal, se encontró un incremento unilateral de c-fos en la cresta dorsal, en el lado contrario al sitio de inyección (Fig 5.1).

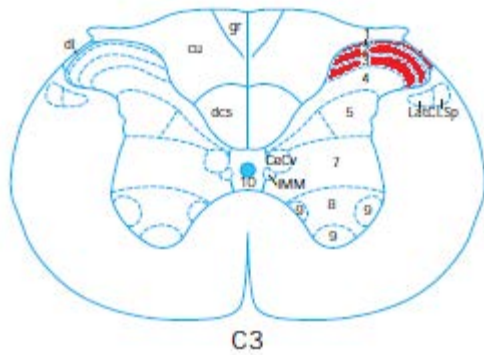
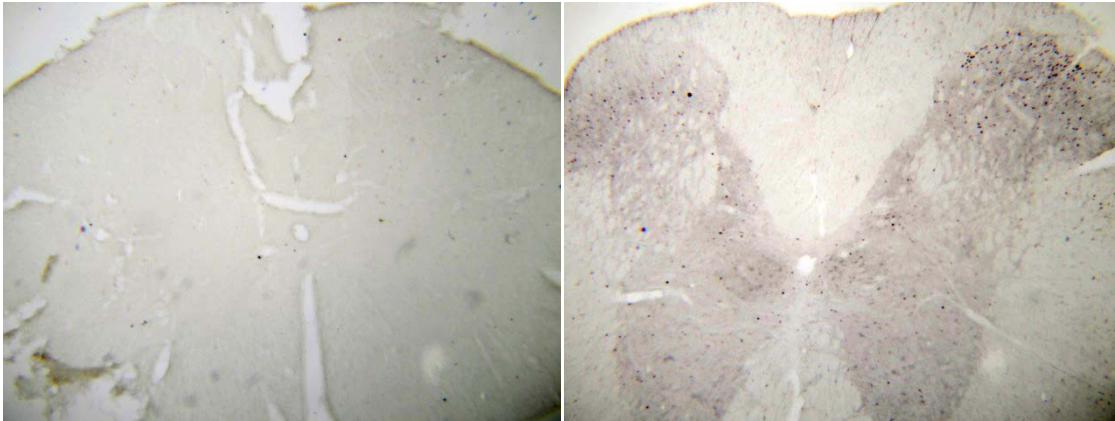


Fig 5.4.1 En la parte superior se izquierda se muestra una sección de la médula espinal de un animal que fue inyectado con vehículo, la imagen de la derecha es una sección de médula espinal de un animal que recibió NPY. La imagen de la parte inferior es un esquema que ilustra el nivel del corte (Cervical 3) y la localización de la mayor cantidad de células que expresaron c-Fos (Tomado y modificado de Paxinos et al., 2007).

Debido a que el objetivo de este trabajo no era analizar la médula espinal, no se obtuvieron las muestras necesarias para poder realizar un análisis estadístico de ésta área.

6. Conclusiones

El NPY inhibe la actividad del PVN, lo que puede ocasionar un decremento en la actividad de las neuronas excitatorias que van hacia el NTS, disminuyendo su actividad, y una disminución de la inhibición tónica que ejerce sobre la médula espinal a través de sus proyecciones descendentes de oxitocina. Esta desinhibición probablemente es la causa del aumento en la actividad en la cresta dorsal, llevando a una mayor activación de las áreas corticales que reciben información de este sitio del lado contrario a la inyección. Aún no está claro si las neuronas de la médula espinal que muestran un aumento reciben directamente inervación del PVN, por lo que el circuito de las vías entre el PVN-médula espinal-corteza deberá ser investigado en experimentos posteriores, así como los neurotransmisores que participan en este circuito.

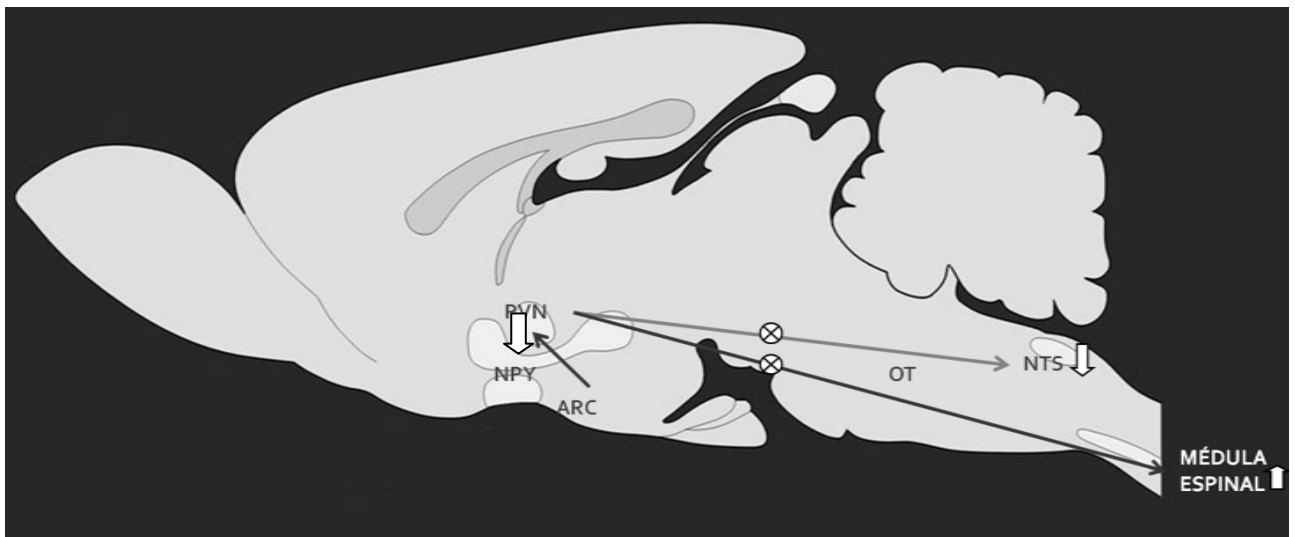


Fig 6.1. Esquema del posible rol del NPY dentro del PVN. Las flechas gris oscuro representan vías inhibitorias, las flechas gris claro representan vías excitatorias, las flechas blancas indican si hay un incremento o una disminución de la actividad de esa área, los círculos cruzados indican la inhibición de la vía.

7. Perspectivas

Futuras investigaciones deberán incluir el uso de trazadores neuronales para confirmar las conexiones entre el núcleo paraventricular del hipotálamo y la porción dorsal de la médula espinal, así como las vías ascendentes entre la cresta dorsal de la médula espinal y el tálamo o directamente en la corteza

El uso de técnicas de inmunohistoquímica para identificar los neurotransmisores en el sitio blanco del PVN también podría aportar información importante sobre el mecanismo del inicio del consumo de alimento.

Además, es importante seguir investigando el papel de la médula espinal en la ingesta de alimento en condiciones fisiológicas, ya que ésta podría ser una vía importante para llevar información proveniente de las vísceras al sistema nervioso central.

8. Referencias

Adan, R.A.H., Vanderschuren, L.J.M.J. and la Fleur, S.E. (2008). Anti-obesity drugs and neural circuits of feeding. *Trends in Pharmacological Sciences*, 29, pp. 208-217.

Aponte, Y., Atasoy, D. and Sternson, S.M. (2011). AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nature Neuroscience*, 14, pp. 351-355.

Barsh, G.S. and Schwatz, M.W. (2002). Genetic approaches to studying energy balance: perception and integration. *Nature Reviews*, 3, pp. 589-600.

Berk, M.L. Finkelstein, J. A. (1981). Afferent projections to the preoptic area and hypothalamic regions in the rat brain. *Neuroscience*, 6, pp. 1601-1624.

Berthoud, H.S. (2002). Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neuroscience and Behavioral Reviews*, 26, 393-428.

Blancas Velázquez, A.S. (2010). Modificación conductual y de modificación neuronal en ratas expuestas a un estímulo apetitoso: implicaciones para las conductas adictivas .Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Psicología. Recuperado de http://132.248.9.195:8080/tesdig2/Procesados_tesis_2010/abril/0656854/Index.html

Blouet, C., Schwartz, G.J. (2010). Hypothalamic nutrient sensing in the control of energy homeostasis. *Behavioral Brain Research*, 209, pp.1-12.

Buijs, R.M., Kalsbeek, A. (2001). Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nature Neuroscience Review* 2, pp. 521-526.

Bush, G., Vogt, B.A., Holmes, J., Dale, A.M., Greve, D., Jenike, M.A. and Rosen, B.R. (2002). Dorsal anterior cingulate cortex: A role in reward based decision making. PNAS, 99, 523-528

Condés-Lara, M., Martínez-Lorenzana, G., Rojas-Piloni, G., Rodríguez-Jiménez, J. (2007). Branched oxytocinergic innervations from the paraventricular hypothalamic nuclei to superficial layers in the spinal cord. Brain Research, 1160, pp. 20-29.

Dayley J. and Bartness, T.J. (2009). Appetitive and consummatory ingestive behaviors stimulated by PVH and preforinical area NPY injections. American Journal of Regulatory, Integrative and comparative Physiology, 296, pp. R877-R892.

Geerling, J.C., Shin, J-W, Chimenti, P.C. and Loewy, A.D. (2010). Paraventricular hypothalamic nucleus: axonal projections to the brainstem. The journal of comparative neurology, 518, pp. 1460-1499.

Ghamari-Langroudi, M., Srisai, D. and Cone, R.D. (2011). Multinodal regulation of the arcuate/paraventricular nucleus circuit by leptin. PNAS, 108, pp. 355-360.

Giesler, G.J., Katter, J.T. and Dado, R.J. (1994). Direct spinal pathways to the limbic system for nociceptive information. TINS, 17, pp. 244-250.

Grill, H.J. and Kaplan, J.M. (2001). Interoceptive and integrative contributions of forebrain and brainstem to energy balance control. International Journal of obesity, 25, pp. s73-s77

Fisk, G.D., and Wyss, J.M. (2000). Descending projections of infralimbic cortex that mediate stimulation-evoked changes in arterial pressure. Brain Research, 859, pp. 83-95.

Hurley, K.M., Herbert, H., Moga, M.M. and Saper, C.B. (1991). Efferent projections of the infralimbic cortex of the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 308, pp. 249, 276.

Jo Y.H., Su Y., Gutierrez-Juarez R., Chua Jr S. (2009). Oleic acid directly regulates POMC neuron excitability in the hypothalamus. *Journal of Neurophysiology*, 101, pp. 2305-2316.

Kalsbeek, A., Palm, I.F., La Fleur S.E., Scheer, F.A.J.L., Perreau-Lenz, S., Ruitter, M., Kreier, F., Cailotto, C., and Buijs, R.M., (2006). SCN outputs and the hypothalamic balance of life. *Journal of biological rhythms*, 21, pp. 458-469. doi: 10.1177/0748730406293854.

Kalsbeek, A., Bruinstroop, E., Yi, C.X., Klieverik, L.P., La Fleur, S.E. and Fliers, E. (2010). Hypothalamic control of energy metabolism via the autonomic nervous system. *Annals of the New York Academy of Science*, 1212, pp. 114-129. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05800.

Kampe, J., Tschöp, M.H., Hollis, J.H. and Olfeld, B.J. (2009). An anatomic basis for the communication of hypothalamic and mesolimbic circuitry in the regulation of energy balance. *European Journal of Neuroscience*, 30, pp. 415-430. doi:10.1111/j.1460-9568.2009.06818.x

Kirchgessner, A.L., Scalfani, A., Nilaver, G. (1988) Histochemical identification of a PVN-hindbrain feeding pathway. *Physiology and Behavior*, 42, pp. 529-543.

Leibowitz, S.F., Sladek, C., Spencer, L. and Tempel, D. (1988). Neuropeptide Y, epinephrine and Norepinephrine in the paraventricular nucleus: Stimulation of feeding and release of corticosterone, vasopressin and glucose. *Brain Research Bulletin*, 21, pp. 905-912.

Mendoza, J., Angeles-Castellanos, M. and Escobar, C. (2005) Entrainment by palatable meal induces food anticipatory activity and c-Fos expression in reward-related areas of the brain. *Neuroscience*, 133, pp. 293, 303.

Nobrega, J.N. and Coscina, D.V. (1990). Regional changes in brain 14C-2-deoxyglucose uptake after feeding-inducing intrahypothalamic norepinephrine injections. *Brain Research Bulletin*, 24, pp. 249-255.

Oomura Y., Ono T., Ooyama H., Wayner M.J. (1969). Glucose and osmosensitive neurons of the rat hypothalamus. *Nature*, 222, pp. 282–284.

Palkovits, M. (1999). Interconnections between the neuroendocrine hypothalamus and the central autonomic system. *Frontiers in neuroendocrinology*, 20, pp. 270-295.

Paxinos, G. (Ed.). (2004). *The Rat Nervous System*. China: Elsevier Academic Press.

Paxinos, G., Watson, C. (2007). *The rat nervous system in stereotaxic coordinates*. China: Elsevier Academic Press.

Purves, D. (Ed.). (2004). *Neuroscience*, [Versión de Library of Congress].

Rojas-Piloni, R., Mejía Rodríguez R., Martínez-Lorenza, G., Condés-Lara, M. (2010). Oxytocin, but no vasopressin, modulates nociceptive responses in dorsal horn neurons. *Neuroscience Letters*, 476, pp. 32-35.

Rudell, J.B., Rechs, A. J., Kelman, T.J., Ross-Inta, C.M., Hao, S. Gietzen, D.W. (2011). The anterior piriform cortex is sufficient for detecting depletion of an indispensable aminoacid, showing independent cortical sensory function. *Journal of Neuroscience*, 31, 1583-1590.

Senapati, A., Lagraize, S. C., Huntington, P. J., Wilson, H.D., Fuchs, P. N. and Peng, Y. B. (2005). Electrical stimulation of the anterior cingulate cortex reduces responses of rat dorsal horn neurons to mechanical stimuli. *Journal of Neurophysiology*, 94, 845-851.

Skibicka, K. P. (2009). Energy balance effects of central melanocortin, cocaine and amphetamine related transcript and leptin: moving outside of the hypothalamic box. *Scholarly Commons*. University of Pennsylvania.

Song Z., Levin B. E., McArdle J. J., Bakhos N., Routh V. H. (2001). Convergence of pre and postsynaptic influences on glucosensing neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus. *Diabetes*, 50, pp. 2673–2681.

Squire, L. R. (Ed.). (2008). *Fundamental Neuroscience* (4th ed). Canada: Elsevier.

Stanley, B.G. and Lebowitz S.F. (1985). Neuropeptide Y injected in the paraventricular hypothalamus: A powerful stimulant of feeding behavior. *PNAS*, 82, pp. 3940-3943.

Stricker, E.M. and Woods, S. C. (Ed) (2004). *Neurobiology of food and fluid intake*. U.S.A. Kluwer Academic/ Plenum Publishers

Taylor, K., Lester, E., Hudson, B., Ritter, S. (2007). Hypothalamic and hindbrain NPY, AGRP and NE increase consummatory feeding responses. *Physiology and Behavior*, 90, pp. 744-750.

Traub, R.J., Sengupta, J.N. and Gebhart, G.F. (1996). Differential c-Fos expression in the nucleus of the solitary tract and spinal cord following noxious gastric distention in the rat. *Neuroscience*, 74, pp. 873-884.

Thót, Z. E., Gallatz, K., Fodor, M., and Palkovitz, M. (1999). Decussations of the descending paraventricular pathways to the brainstem and spinal cord autonomic centers. *The journal of comparative neurology*, 414, pp. 255-266.

Valdés, J. L., Maldonado, P., Recabarren, M., Fuentes, R. and Torrealba, F. (2006). The infralimbic cortical area commands the behavioral and vegetative arousal during appetitive behavior in the rat. *European Journal of Neuroscience*, 23, pp. 1352-1364.

Van der Kooy, D., McGinty, J. F., Koda, L. Y., Gerfen, C. R. and Bloom, F. E. (1982). Visceral cortex: A direct connection from prefrontal cortex to the solitary nucleus in rat. *Neuroscience Letters*, 33, pp. 123-137.

Van Eden, C.G. and Buijs, R.M. (2000). Functional neuroanatomy of the prefrontal cortex: autonomic interactions. *Progress in Brain Research*, 126, pp. 49-62.

Vargo, J.M., Corwin, J.V. and Reep, R.L. (1988). Hemispheric asymmetry in neglect produced by unilateral lesions of dorsomedial prefrontal cortex in rats. *Experimental Neurology*, 102, pp. 199-209.

Wang R., Cruciani-Guglielmacci, C., Migrenne, S., Magnan, C., Cotero, V.E., Routh, V.H. (2006). Effects of oleic acid on distinct populations of neurons in the hypothalamic arcuate nucleus are dependent on extracellular glucose levels. *J Neurophysiol*, 95, pp. 1491–1498.

Watts, A. G. (2000). Understanding the neural control of ingestive behaviors: helping to separate cause from effect with dehydration-associated anorexia. *Hormones and Behavior*, 37, pp. 261-283.

Yamamoto, T., Matsuo, R., Kiyomitsu, Y. and Kitamura, R. (1988). Sensory inputs from the oral region to the cerebral cortex in behaving rats: an analysis of unit

responses in cortical somatosensory and taste areas during ingestive behavior. *Journal of Neurophysiology*, 60, pp. 1303-1321.

Zhang, X., Fogel, R. and Renehan, W. E. (1999). Stimulation of the paraventricular nucleus modulates the activity of gut-sensitive neurons in the vagal complex. *American Journal of Gastrointestinal and Liver Physiology*, 277, pp. 70-90.