



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**“INFLUENCIA DE HORARIOS RESTRINGIDOS DE
ALIMENTO EN UN MODELO ANIMAL DE TRABAJO
NOCTURNO”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA EL M en C.

ROBERTO CARLOS SALGADO DELGADO

TUTORA. DRA. CAROLINA ESCOBAR BRIONES.





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.

ESTA TESIS FUE REALIZADA EN EL LABORATORIO DE RITMOS BIOLÓGICOS Y METABOLISMO DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNAM, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. CAROLINA ESCOBAR BRIONES Y FINANCIADA POR CONACYT M-43950, DGAPA IN-203907 y Serviere Monde, France AGRADESCO LA BECA OTORGADA PARA LA REALIZACIÓN DE ESTE PROYECTO.

A mi familia

A mi padre: gracias por tu cariño, tus consejos, tus enseñanzas, tu apoyo, 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, por ser quien todos los días sin importar que suceda a tu alrededor sacas adelante a la familia, porque sin tu apoyo nunca hubiera podido llegar hasta donde estoy; gracias mamá. Te quiero mucho.

A mis queridos hermanos: Fol, Marco y Nancy, por todas esas risas, regaños, peleas y por ser parte importante en mi vida. Los quiero mucho.

A mi querido abuelito; porque me contagia su fortaleza que me ayudo a seguir adelante

A Nadia: Porque llegaste en el momento mas deseado de mi vida.

A todos los que de una u otra forma contribuyeron para la elaboración de esta tesis

AGRADECIMIENTOS

A mi maestra; la Dra. Carolina Escobar Briones, por brindarme la oportunidad de iniciar en este maravilloso mundo de las neurociencias, por su amistad, su confianza y todo su apoyo siempre entusiasta e incondicional en la realización de este trabajo, además por todos los consejos académicos y personales que me ayudaron a crecer como persona.

Al Dr Ruud M. Buijs; por todos los comentarios y criticas que siempre aportaron grandes ideas, pero sobre todo por su valiosa amistad. Muchas gracias.

Al Dr. Manuel Ángeles Castellanos; por sus comentarios y apoyo para la realización de este trabajo, pero sobre todo por su amistad y por lo tragos que nos dieron grandes ideas. Gracias camarada.

A mi comité tutorial por todo el tiempo dedicado a esta tesis y sus valiosos comentarios y sugerencias que enriquecieron este trabajo.

Dr. Leon Cintra McGlone
Dr. Jose Ramon Eguibar Cuenca

A mi jurado de examen de grado; por su tiempo para revisar este trabajo y por sus excelentes comentarios y sugerencias que me ayudaron a mejorar esta tesis.

Dra. María Sitges Berrondo
Dra. Beatriz Fuentes Pardo
Dra. Margarita Martínez Gómez
Dr. Mauricio Díaz Muñoz
Dra. Carolina Escobar Briones.

A mis compañeros de laboratorio; Maricarmen, Katia, Juanga, Susanita y Araceli, por hacer mas divertido todo el tiempo durante las horas de trabajo, por escuchar mis quejas y alentarme en los momentos mas dificiles. A todos muchas gracias.

A la UNAM, por permitirme ser parte de ella y a la Facultad de Medicina por todos los recursos que puso a ami alcance en esta etapa de mi desarrollo.

Esta tesis se realizó gracias al apoyo de los proyectos CONACYT M-43950 y 82462 PAPIIT-UNAM IN-203907 y Serviere Monde, France. Además del apoyo de las becas del programa de doctorado en ciencias biomédicas CONACYT y fundación TELMEX.

**“Quien no haya experimentado la irresistible atracción
de la ciencia, no podrá comprender su tiranía.”
Mary Shelley.**

INDICE

AGRADECIMIENTOS	4
RESUMEN	7
ABSTRACT	9
ABREVIATURAS	11
INTRODUCCION	12
LOS RITMOS BIOLÓGICOS: UN POCO DE HISTORIA	12
¿QUÉ ES UN RITMO BIOLÓGICO?	14
¿CÓMO SE ESTUDIAN LOS RITMOS?	16
RITMOS CIRCADIANOS	17
EL NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO: RELOJ CIRCADIANO MAESTRO	19
ORGANIZACIÓN MOLECULAR DEL RELOJ CIRCADIANO	21
LA SINCRONIZACIÓN	23
SINCRONIZACIÓN FÓTICA Y NO FÓTICA.	25
ORDEN TEMPORAL INTERNO	28
LA IMPORTANCIA DE ESTAR SINCRONIZADO	30
PROBLEMAS DE SALUD ASOCIADOS A LA DESINCRONIZACIÓN.	
DESINCRONIZACIÓN POR VIAJES AÉREOS	
TRANSMERIDIONALES (JET LAG).	30
LA DESINCRONIZACIÓN EN TRABAJADORES	
EN TURNOS Y NOCTURNOS.	32
DESARROLLO DE MODELOS ANIMALES PARA ESTUDIAR LA	
FISIOLOGÍA DE LA DESINCRONIZACIÓN.	
35	
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	36
OBJETIVOS GENERALES	37
HIPÓTESIS GENERALES	37
ETAPA 1	
CARACTERIZACIÓN DEL MODELO DE TRABAJO NOCTURNO	38
• OBJETIVOS	38
• HIPÓTESIS	38
• MATERIALES Y MÉTODOS	38
• RESULTADOS	45
• DISCUSIÓN	52

ETAPA 2.	
ANÁLISIS INMUNOCITOQUÍMICO DE NÚCLEOS HIPOTALÁMICOS IMPLICADOS EN EL METABOLISMO Y LA VIGILIA, EN ANIMALES SOMETIDOS A TRABAJO DURANTE SU FASE DE DESCANSO.	56
• OBJETIVOS	56
• HIPÓTESIS	56
• MATERIALES Y MÉTODOS	56
• RESULTADOS	59
• DISCUSIÓN	65
ETAPA 3.	
EL ALIMENTO EN LA ETAPA DE DESCANSO, COMO POSIBLE CAUSA DE LA DESINCRONIZACIÓN INTERNA.	69
• OBJETIVOS	69
• HIPÓTESIS	69
• MATERIALES Y MÉTODOS	69
• RESULTADOS	72
• DISCUSIÓN	85
DISCUSIÓN GENERAL	90
REFERENCIAS	93
ANEXOS	104

RESUMEN

Todos los organismos presentan fluctuaciones diarias conductuales y fisiológicas asociadas a la alternancia luz-oscuridad y reguladas por un sistema circadiano multi-oscilatorio. El núcleo supraquiasmático (NSQ) es el oscilador principal dentro de este sistema, cuya función es dar un orden temporal y mantener acoplados a los osciladores periféricos. Estas oscilaciones circadianas son controladas por "genes de reloj" tales como el gen Período (Per). En individuos que laboran en horarios nocturnos, rotatorios se observan alteraciones en los ritmos circadianos, generadas por un desacoplamiento de osciladores con el NSQ, conocido como desincronización interna, que predispone al organismo a una serie de enfermedades.

En este trabajo se caracterizaron en un modelo de horarios nocturnos de trabajo en ratas, los mecanismos involucrados en la desincronización interna. Para ello, las ratas se colocaron en un sistema de registro conductual por 15 días como línea base, posteriormente se colocaron en ruedas de actividad forzada, obligándolas a mantenerse despiertas y moverse (trabajar) en su fase de reposo durante 8 horas diarias de lunes a viernes por 4 semanas. Después de cada sesión de trabajo forzado se regresaron a sus cajas habitación en el sistema de registro. Los resultados del análisis conductual de actividad locomotora, consumo de alimento y agua muestran que las ratas sometidas a horarios nocturnos de trabajo tienen un decremento de la actividad nocturna al comparar los días basales con los días de trabajo forzado. Además las ratas muestran una actividad arrítmica durante los fines de semana. El registro del consumo de alimento, mostró cambios en sus hábitos alimenticios; alimentándose ahora en el día (mientras trabajan). Por otro lado los resultados muestran una pérdida del ritmo de glucosa plasmática y los triacilglicéridos se mostraron en antifase con respecto a las ratas control con el pico asociado a las horas de alimentación durante el trabajo. En contraste los niveles de corticosterona no se modificaron. Con respecto a los genes reloj, el ritmo de expresión de Per1 y Per 2 en el NSQ no se modificó.

Para determinar el origen de la desincronización observada en los ritmos metabólicos y conductuales, analizamos si algunos de los núcleos hipotálamicos implicados en el metabolismo, como el núcleo dorsomedial hipotalámico (DMH), paraventricular del hipotálamo (PVN), El núcleo arqueado (ARQ), paraventricular del tálamo (PVT) y en mantener la vigilia como el núcleo hipotalámico lateral (HL) y área perifornical (PeF) están alterados por la actividad forzada durante la fase de descanso, promoviendo la desincronización interna desde un nivel central. Para esto, caracterizamos los ritmos diurnos de la inmunoreactividad de c-Fos como marcador de actividad neuronal y de la proteína PER1 como marcador de ritmicidad. Observando un cambio de fase en la actividad y en el ritmo de la mayoría de los núcleos hipotalámicos estudiados, asociados ahora a la actividad durante la etapa de descanso.

Para demostrar el efecto del nuevo horario de alimentación sobre la modificación de los ritmos metabólicos y conductuales formamos grupos de trabajadores con restricción al acceso de comida; uno ad libitum (T-AL), otro sólo de día (T-CD) y sólo de noche (T-CN). Para descartar la influencia de la actividad apareada al alimento se registraron otros tres grupos sin trabajar, uno que come ad libitum (C-AL), otro que come sólo de día (C-CD) y otro en su fase de oscuridad (C-CN). De los grupos forzados a trabajar, las ratas T-AL y T-CD mostraron un decremento de actividad nocturna y una actividad arrítmica durante los fines de semana, similar al reportado previamente para el

trabajador nocturno, además el ritmo de temperatura y algunas variables metabólicas mostraron cambios de fase hacia la fase de luz, mientras se alimentan. Por el contrario, las ratas T-CN no presentaron alteraciones en sus ritmos metabólicos ni conductuales y mostraron patrones rítmicos similares a las ratas control. En los grupos que no trabajaron y que se manipuló la hora de comida C-AL, y C-CN no se observaron alteraciones metabólicas y conductuales, sin embargo las ratas C-CD no mostraron alteraciones conductuales pero sí una antifase en el ritmo de TAG, similar a las T-CD y T-AL. Lo que apoya nuestra hipótesis de que el alimento durante el trabajo nocturno puede ser la causa de la desincronización interna y que la regulación de los horarios de alimentación puede ser una buena estrategia para normalizar la desincronización causada por el trabajo nocturno.

ABSTRACT

All the organism present behavioural and physiological daily rhythms associates to the alternation light-darkness and regular by a multi-oscillatory circadian system. The suprachiasmatic nucleus (SCN) is the main oscillator inside this system, whose function is to give a temporary order and to maintain adapted to the peripheral oscillators. These circadian oscillations are controlled for “clock genes” such as gene Period (Per). In people that work in nocturnal o rotating schedules, are observed alterations in the circadian rhythms, generated by a uncoupling of oscillators with the SCN, known like internal desynchronization, that predispose to the organism to a series of illnesses.

In this work were characterized in a model of night work in rats, the mechanisms involved in the internal desynchronization. For it, the rats were required to be active in a rotating wheel for 8 h daily during their sleeping phase. After 8 h in the drums rats were returned to their home cages and remained undisturbed until next day. This procedure was carried out for 4–5 weeks from Monday to Friday. The results of the locomotor activity, food and water ingestion showed that the rats submitted to night work have a decrement of nocturnal activity in comparison with the control and your base line. Besides the rats show arrhythmicity during the weekends.

On the other hand, the forced activity during the sleeping phase (W-SP) alters not only activity, but also the temporal pattern of food intake. In consequence W-SP rats showed a loss of glucose rhythmicity and a reversed rhythm of triacylglycerols, associated peak to the hours of diet during the work. In contrast the rhythm of corticosterone was not modified. But exhibited showed increase of plasma corticosterone associated with the start of the working session. With regard to the clock genes, the rhythm of expression of Per1 and Per 2 in the SCN was not modified.

To determine the origin of the internal desynchronization observed in the metabolic and behavioural rhythms, we analyze in hypothalamic nuclei implied in the metabolism, like the dorsomedial nucleus (DMH), paraventricular nucleus (PVN), arcuate nucleus (ARQ), paraventricular nucleus of thalamus (PVT) and in maintain the wakefulness as the lateral hypothalamic nucleus (HL) and perifornical area (PeF) they are altered by the forced activity during the rest phase, promoting the internal desynchronization a central level. For this, we characterize the diurnal rhythms of the immunoreactivity of c-Fos as scoreboard of activity neuronal and of the PER1 protein like scoreboard of rhythmicity. A change of phase was observed in the c-Fos expression and the rhythm of PER 1 in the majority of the hypothalamic nuclei, associates now to the activity during the rest phase.

To show the effect of the new schedule of diet in the modification of the behavioural and metabolic rhythms, we form groups of workers with restriction to food; one ad libitum (T-AL), another food only during the day (T-CD) and only at night (T-CN). To rule out the influence of the activity coupled to the food other three groups were registered without work, one with food ad libitum (C-AL), another with food only during the day (C-CD) and another in the night (C-CN). Of the groups forced to work, the T-AL and T-CD showed a diminution of nocturnal activity and arrhythmicity during the weekends, similar to reporting previously for the nocturnal worker, besides the rhythm of temperature and some metabolic variables showed phase changes toward the light phase, while they are fed. On the contrary, the rats T-CN did not present alterations in their behavioural and metabolic rhythms and they showed similar

rhythmic to the control rats. In the groups that did not work and the hour of food was manipulated C-AL, and C-CN not metabolic and behavioural alterations were observed, nevertheless the rats C-CD did not show behavioural alterations but yes an antiphase in the TAG rhythm, similar to the T-CD and T-AL. What supports our hypothesis that the food during the nocturnal work may be is the cause of the internal desynchronization and the regulation of the food schedules may be a good strategy to normalize the desynchronization caused by the nightwork.

ABREVIATURAS

- 3V:** Tercer ventrículo
- AL:** *ad libitum*
- ANOVA:** Análisis de Varianza.
- ARQ:** Núcleo Arqueado
- C-AL:** Control con alimento *ad libitum*
- C-CD:** Control con comida sólo de día
- C-CN:** Control con comida sólo de Noche
- DMH:** Hipotálamo dorsomedial
- FOS-IR:** Inmunoreactivas a Fos.
- HL:** Hipotálamo lateral
- LO:** Ciclo luz/oscuridad
- NSQ:** Núcleo Supraquiasmático
- PeF:** Núcleo perifornical
- PER1:** Proteína del Genc periodo 1
- PER 2:** Proteína del Genc periodo 2
- PVN:** Núcleo Paraventricular del hipotálamo
- PVT:** Núcleo Paraventricular del tálamo
- SNC:** Sistema nervioso central
- T-AL:** Trabajo en su fase de descanso con alimento *ad libitum*
- T-CD:** Trabajo en su fase de descanso con alimento sólo de día
- T-CN:** Trabajo en su fase de descanso con alimento sólo de noche
- TAG:** Triacilglicéridos
- TFD:** Trabajo en su fase de descanso
- TFA:** Trabajo en su fase de actividad
- VMH:** Hipotálamo Ventromedial
- ZT:** Zeitgeber time

INTRODUCCIÓN

LOS RITMOS BIOLÓGICOS: UN POCO DE HISTORIA

Los médicos y filósofos de la Grecia antigua ya observaban cambios regulares en las funciones del organismo, fenómeno que ahora conocemos como “ritmos biológicos”. Hipócrates aconsejaba a los interesados en la medicina “investigar las estaciones del año y lo que ocurre en ellas”. Como consejo práctico, sugería “administrar las purgas de arriba hacia abajo en el verano y de abajo hacia arriba en el invierno”. Unos cuantos siglos más tarde, la expedición de Alejandro Magno llevó consigo numerosas plantas y animales exóticos y Andróstenes, uno de los cronistas de la expedición, relató que las hojas y pétalos de la planta del tamarindo se movían a lo largo del día, como “saludando al sol”. Es curioso que la historia de las observaciones de los ritmos biológicos se inició en plantas. El naturalista Karl Linné fue el creador del sistema de taxonomía de plantas publicado en 1735, y realizó una de las primeras aplicaciones prácticas de los ritmos biológicos, basándose en la regularidad de la apertura y cierre de los pétalos de diversas flores y en 1745 creó un mapa de flores para un reloj de jardín. Cada especie de flor seleccionada se abría o cerraba a una hora determinada, desde las seis de la mañana hasta las seis de la tarde, de manera que al comprobar qué especie floral tenía los pétalos abiertos o cerrados se podía saber la hora (Fig.1). (Golombeck D, 2007).

El primer experimento cronobiológico conocido fue en 1729 por el astrónomo francés Jacques d’Ortous DeMairan, el notó que una planta sensitiva de su jardín (*Mimosa pudica*) abría sus hojas durante el día y las cerraba durante la noche. Encerró la planta en un armario oscuro y para su sorpresa la planta continuó abriendo y cerrando sus hojas con el mismo ciclo que mostraba en su exterior. (Fig.2). Por primera vez se demostró que los ritmos circadianos eran capaces de mantenerse aun en ausencia de señales temporales del ambiente. (Gruart A. 2001)

Poco a poco hemos entendido que los cambios cíclicos del ambiente influyen sobre nuestra fisiología. Las observaciones de los ritmos biológicos se han extendido de las plantas a los animales y al ser humano, de tal manera que en el conocimiento de la medicina tradicional se incorporó la aplicación de algunas hierbas por la noche y no en el día, en luna llena pero no otras noches (Gruart A 2002 y Golombeck D. 2001).



Figura.1. El reloj floral de Linneo. Con este reloj se puede saber la hora (entre las 6 AM y las 6 PM) de acuerdo a qué flores están abiertas o cerradas en el campo.

La cronobiología es la disciplina que estudia los ritmos biológicos y se ha desarrollado desde hace ya más de 2 siglos. En un principio se pensó que las variaciones cíclicas de los organismos dependían solamente de los cambios cíclicos del medio ambiente. Es decir, eran una simple respuesta y por lo tanto, se pensaba que los ritmos tenían únicamente un origen exógeno.

Sin embargo, desde el siglo XVIII De Marian, demostró que los cambios o variaciones rítmicas de algunas plantas y flores se mantenían aún en ambientes de oscuridad continua, es decir sin señales externas que indiquen el paso del tiempo (Fig.2). Con estas observaciones se propuso que los ritmos biológicos no dependen sólo de señales externas, sino que tienen un origen endógeno y que pueden responder a señales ambientales (Pittendrigh. 1981).

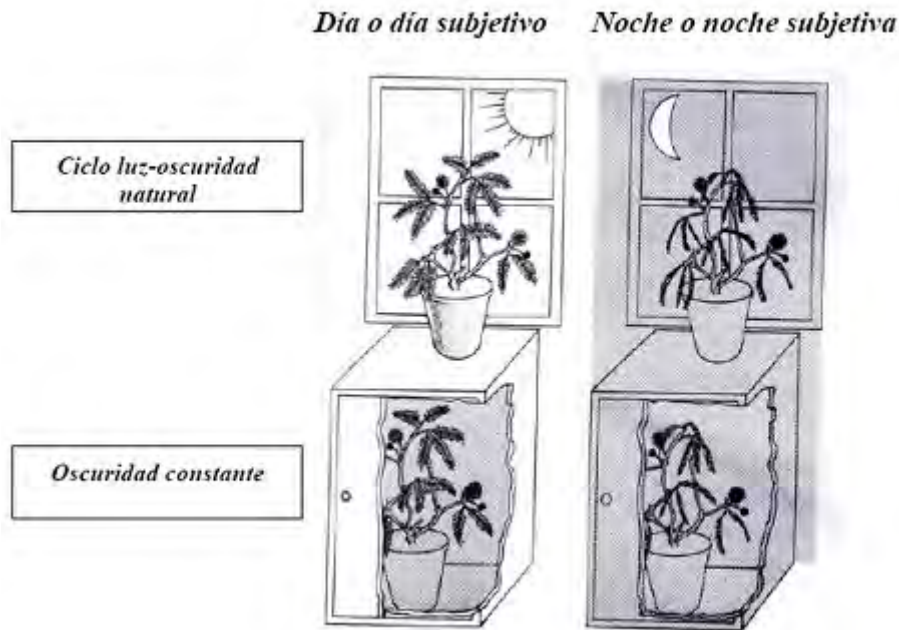


Figura 2. El experimento de DeMairan, que demostró por primera vez la existencia de ritmos circadianos endógenos. Al tener una planta de *Mimosa pudica* expuesta a un ciclo de luz y oscuridad, las hojas se mueven siguiendo al sol. Sin embargo al eliminar la influencia de la luz solar colocando la planta en oscuridad constante, las hojas continúan moviéndose. (Modificado de Moore Ede y col.. 1972).

A principios de 1900 se desarrolló el concepto de memoria temporal. Se pensaba que los organismos poseían un mecanismo para generar cierta organización temporal en sus procesos. Posteriormente, Aschoff (1965) con base en resultados de sus experimentos eliminaron la idea de una memoria temporal demostrando la capacidad endógena que los organismos tienen para medir el tiempo, y por lo tanto la necesidad de un sistema de medición temporal, “el reloj biológico”.

¿QUE ES UN RITMO BIOLÓGICO?

Existe una gran cantidad de estímulos en el medio ambiente que pueden afectar al organismo. Entre ellos, el ciclo luz-oscuridad (la alternancia día-noche), el cual está determinado por el movimiento de rotación de la Tierra (Fig.3) y genera oscilaciones diarias de temperatura, de presión atmosférica, y de humedad. En consecuencia la organización temporal es una característica fundamental adaptativa de los organismos

(Pittendrigh. 1993), que se manifiesta a través de cambios cíclicos en los eventos fisiológicos y conductuales

Jürgen Aschoff (1981) define un ritmo biológico como la recurrencia de un fenómeno biológico en intervalos regulares de tiempo. Los ritmos biológicos tienen un carácter hereditario, es decir, su expresión está genéticamente determinada (Gruart A. y col. 2002). Todos los animales, las plantas, y probablemente todos los organismos muestran variaciones rítmicas en su fisiología (tasa metabólica, producción de calor, floración, etc) que suelen asociarse con los ciclos ambientales (Fig.3).

Los ritmos biológicos capacitan a los organismos para estimar el paso del tiempo, para anticiparse y prepararse a demandas que surgen de los cambios ambientales cíclicos relevantes para su supervivencia. De esta manera permiten mostrar niveles máximos de una variable fisiológica cuando las condiciones en el medio ambiente requieren una respuesta aumentada. En todos los taxa de los organismos eucariontes así como algunos procariontes y hongos se han documentado diferentes ritmos biológicos con períodos que van desde fracciones de segundo hasta años. Los organismos unicelulares también exhiben ritmos en la velocidad de fotosíntesis, metabolismo oxidativo, fototaxis, por mencionar algunos (Dunlap J. y col. 2004).

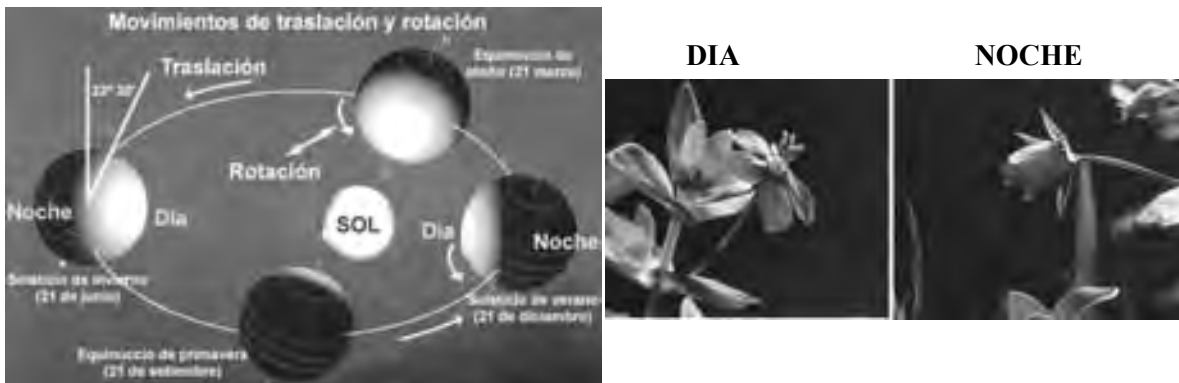


Figura 3. En A. Representación esquemática del movimiento de rotación y translación de la tierra; evento que genera los cambios diarios del día/noche y las estaciones del año respectivamente. En B. Ejemplo de un cambio conformacional de una planta, relacionado con el estímulo fotico que recibe en el día. Este cambio le ayuda a la planta por ejemplo a aprovechar la luz solar del día o a protegerse del frío nocturno.

En 1981 se clasificó a los ritmos biológicos en tres grupos de acuerdo con la frecuencia de su oscilación. Los ritmos ultradianos, son ritmos de alta frecuencia y se presentan más de una vez en un día, los ritmos circadianos, que tienen una frecuencia cercana a las 24 horas y los ritmos infradianos que son de baja frecuencia, es decir se presentan

menos de una vez en 24 hrs (Gruart A. y col. 2002). Algunos ejemplos de ritmos clasificados con este criterio se ven en la Tabla 1.

Los ritmos biológicos más estudiados y más frecuentes en los organismos vivos son los ritmos circadianos, que se ajustan a las variaciones cíclicas del día y la noche.

TABLA 1. Periodo de los ritmos biológicos clasificados de acuerdo a su frecuencia.

<i>Tipo de ritmo</i>	<i>Período</i>	<i>Ejemplo</i>
Ultradiano	0.1 seg	Electroencefalograma
	1 seg	Ritmo cardíaco
	6 seg	Ritmo respiratorio
	60 min	Secreciones hormonales
	90 min	Alternancia de estados de sueño
Circadiano	24 h	Actividad- reposo Temperatura corporal
Infradiano	28 días	Ciclo menstrual
	365 días	Hibernación

¿COMO SE ESTUDIAN LOS RITMOS?

Para evaluar los ritmos biológicos, se consideran una serie de variables como el periodo, la frecuencia, la amplitud, el mesor, la fase y la relación o ángulos de fase (Fig.4).

- **El periodo** de un ritmo biológico se refiere al tiempo necesario para que se repita un mismo fenómeno y es generado por el reloj biológico.
- **La frecuencia** es el número de ciclos con el mismo periodo que se repiten en una unidad de tiempo.
- **La amplitud** se define como la diferencia que existe entre el valor máximo y el valor mínimo de un parámetro fluctuante.

El mesor es el promedio de todos los valores observados de un ciclo en estudio, esto es importante en la normalización de los datos convirtiéndolos en porcentaje de variación en relación con el valor promedio.

- La **fase** se refiere al momento (hora, día o mes) en que ocurre un hecho característico dentro del ciclo, es un punto en el periodo del ritmo o el valor del

fenómeno en cada instante del ciclo. Al evento característico seleccionado para estimar la fase le llamamos *marcador de fase*.

- **La acrofase:** indica para un ritmo circadiano, el momento del día en el que la variable presenta su valor máximo.
- **Relación o ángulo de fase** se refiere a la comparación de dos ritmos distintos, biológicos o uno biológico y uno ambiental.
-

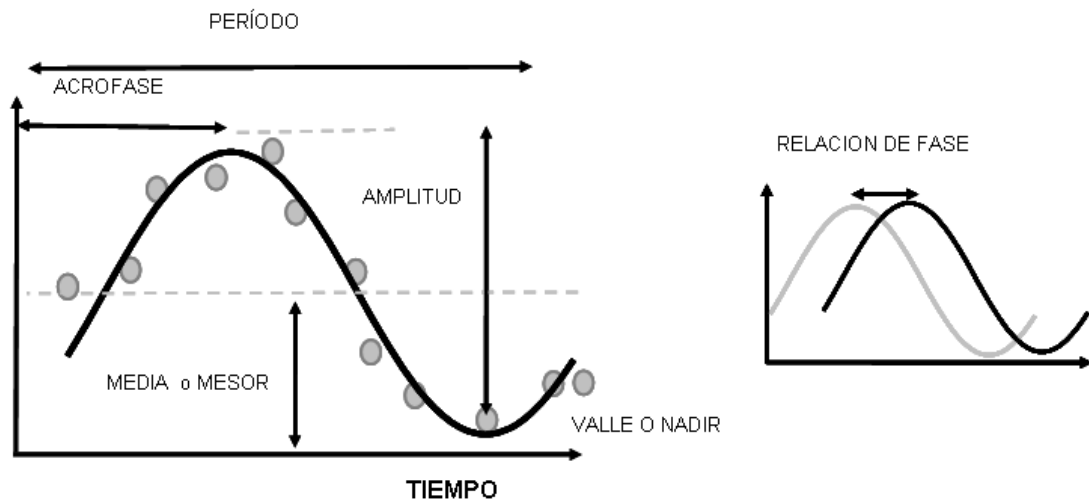


Figura 4. Representación gráfica de los parámetros característicos de un ritmo. A la izquierda, se utiliza el ajuste de una serie temporal a una función sinusoidal (cosinor). A la derecha se representa la comparación de dos ritmos distintos por sus acrofasas.

RITMOS CIRCADIANOS

A pesar de que existen una serie de fluctuaciones ambientales con diferentes periodicidades, es evidente que los cambios geofísicos que suceden cada 24 hrs. asociados a la alternancia de día-noche tienen gran influencia sobre los procesos biológicos (Moore-Ede y col. 1982).

Los ritmos circadianos tanto conductuales como fisiológicos, 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 a 24 hrs. (circa=cercano; diano=día).

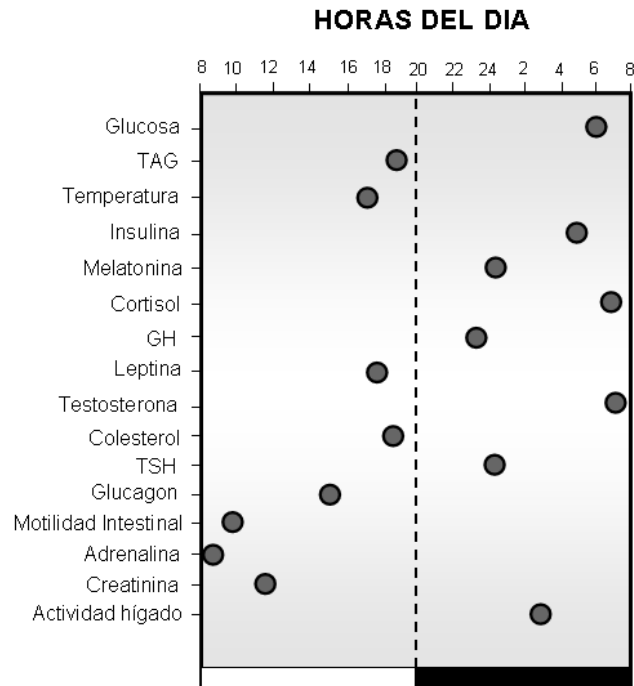


Figura 5. Esquema representativo de diferentes variables metabólicas en humanos.

Los círculos representan las acrofases de cada una de las variables. El recuadro blanco y negro representa al día y la noche respectivamente.

La expresión de tales ritmos continúa aún cuando los organismos estén temporalmente aislados de información periódica del medio, fenómeno conocido como oscilación espontánea, siendo una clara evidencia de un proceso autónomo de medición de tiempo circadiano. En seres humanos el ciclo sueño-vigilia es un ritmo circadiano, junto con el cual se ven acompañados una serie de cambios fisiológicos también con características circadianas, como por ejemplo oscilaciones de la temperatura corporal, la cual disminuye durante la noche junto con un incremento en la liberación de la hormona melatonina (Weitzman E. 1976). También se han descrito ritmos de la liberación de hormona luteinizante, de los niveles de cortisol plasmático, de leptina, de la hormona de crecimiento, de insulina y glucosa por mencionar algunos (Fig.5). (La Fleur y col 1999; Buijs y col 2001; Buijs y Kalsbeek, 2001; Van Cauter y cols. 1992, Kalsbeek y col 2001; Perreau-Lenz y cols 2004).

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 en la periferia tienen la capacidad de oscilar tanto a nivel central como periférico y que estos

osciladores periféricos se encuentran organizados 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 (Fig.6).



Figura 6. Sistema circadiano en mamíferos. Constituido por el 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.

EL NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO: RELOJ CIRCADIANO MAESTRO.

Se considera reloj biológico al sistema que tiene la capacidad de generar una organización temporal rítmica en el organismo así como de imponer un periodo y una fase a los procesos internos. En la actualidad se conoce muy bien que el núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo, es el principal reloj biológico/circadiano en los mamíferos el cual genera y transmite su ritmicidad a otras zonas del cerebro y de ahí al resto del organismo.

El NSQ se encuentra en la parte anterior ventral del hipotálamo inmediatamente arriba del quiasma óptico. Este se compone de aproximadamente 15,000 neuronas de las cuales, la mayoría generan y mantienen oscilaciones circadianas autosostenidas en su actividad eléctrica ([Welsh D](#), y col.1995), en la captura de glucosa ([Schwartz W](#). y col. 1987) y en la expresión de genes ([Yamaguchi S](#), y col. 2003), características que lo definen como reloj. Por lo tanto el NSQ es el responsable de la generación de la

mayoría (si no es que de todos) de los ritmos bioquímicos, fisiológicos y conductuales en los mamíferos.

La función del NSQ como un reloj biológico se demostró cuando Moore y Eichler (1972) realizaron la destrucción de esta estructura y observaron que el ritmo de corticosterona se perdía. Simultáneamente Stephan y Zucker (1972) descubrieron que lesiones del NSQ eliminaban la ritmicidad circadiana de actividad locomotora y de ingestión de agua (Fig.7).

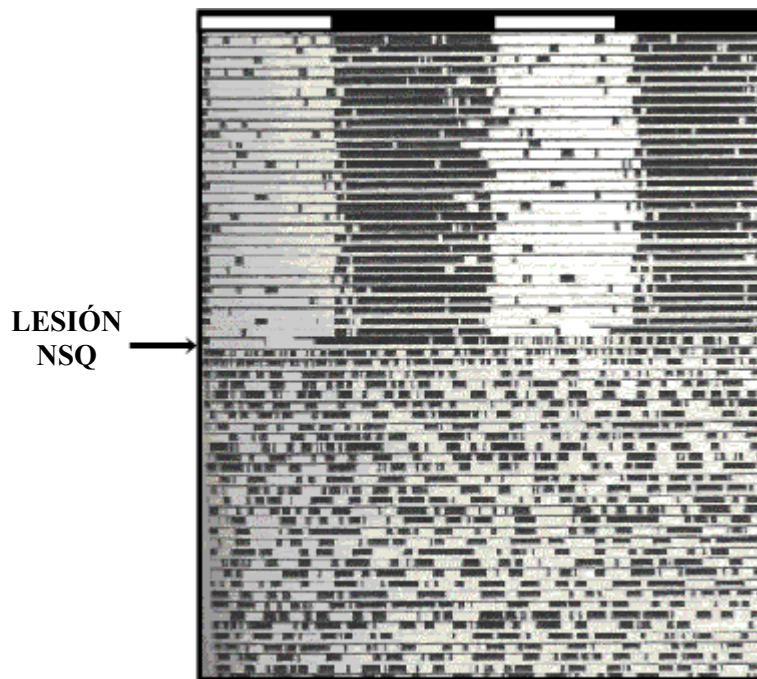


Figura 7. Actograma de doble representación de actividad locomotora de un hámster. En la mitad superior del actograma se muestra la organización temporal de la conducta con un periodo de 24 horas. La flecha indica el momento de la lesión del NSQ. Después de la lesión del NSQ, la organización conductual se vuelve totalmente arrítmica, distribuyendo su conducta de manera azarosa sin ninguna organización temporal. (Tomada de Moore, 1998).

Otra manipulación experimental que ha demostrado la capacidad del NSQ como reloj biológico circadiano, es que los animales con lesión del NSQ muestran una actividad locomotora arrítmica y cuando se realiza un transplante de tejido fetal hipotálamico con neuronas del NSQ, se observa una recuperación de su ritmo en la conducta locomotora (Fig.8) (Aguilar-Roblero y col. 1986).

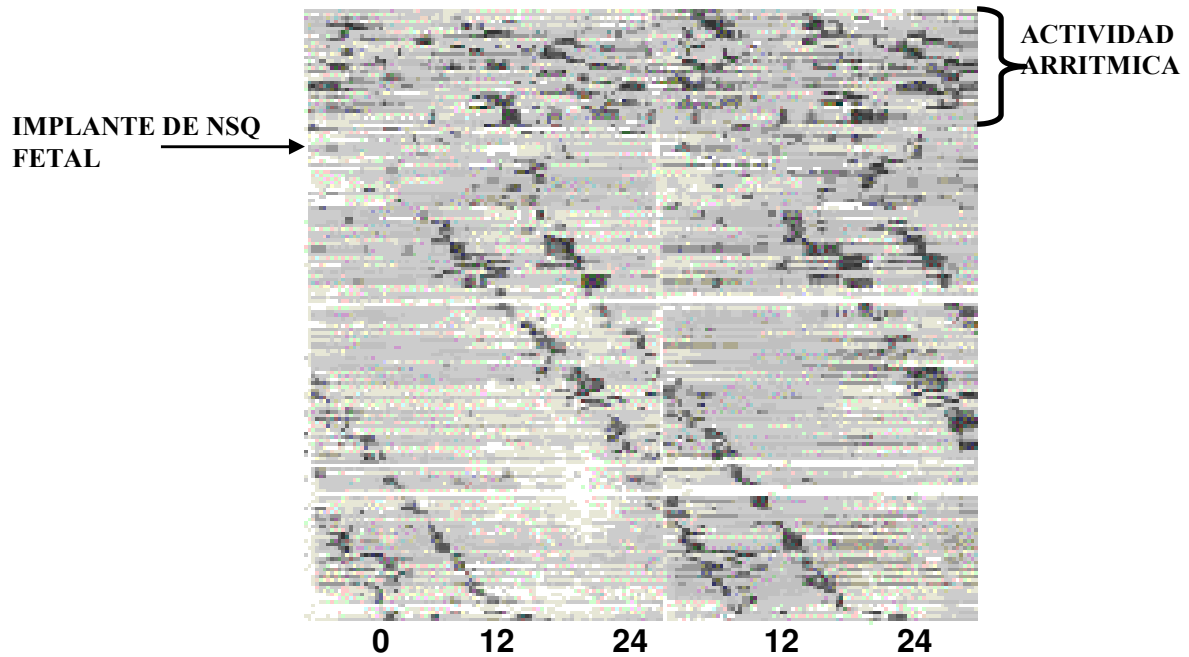


Figura 8. Actograma de doble representación de la actividad locomotora de un Hamster. En la parte superior del actograma se observa la actividad arrítmica producto de una lesión del NSQ. La flecha indica el momento en que se implantó tejido fetal del hipotálamo anterior. Observándose la recuperación de la actividad locomotora en forma rítmica y con un periodo estable. (Tomada de Aguilar-Roblero y col., 1994)

ORGANIZACIÓN MOLECULAR DEL RELOJ CIRCADIANO.

Ya sabemos que el NSQ genera y transmite su ritmicidad a otras zonas del cerebro y de ahí al resto del organismo. Pero, ¿cómo puede cada célula del NSQ mantener oscilaciones de manera autónoma? La identificación de genes específicos dentro del núcleo de cada célula ha dado la respuesta.

La investigación se inició en la mosca de la fruta y condujo al descubrimiento del gen *periodo* (Per) lo cual ha sido muy fructífero y 30 años después nos ha colocado enfrente de los engranes moleculares del reloj, no sólo de las moscas, sino de todos los organismos vivos.

Las investigaciones han abarcado ya toda la escala filogenética; se han identificado genes circadianos en bacterias, algas, hongos, plantas y animales, incluyendo a nuestra especie (Dunlap J 1999). Para que un gen entre en esta categoría, su RNA mensajero y/o las proteínas que produce dicho RNA no deben expresarse de una manera homogénea a

lo largo del tiempo, sino que durante ciertas horas deben presentar una máxima expresión y a otras horas no se deben detectar. Esto quiere decir que su producción sigue un ciclo de aproximadamente 24 horas alternando períodos de expresión con períodos de quiescencia.

Finalmente entre 1998-1999 con base en el conocimiento de los genes circadianos de la *Drosophila* se propuso un modelo general de funcionamiento de reloj biológico a nivel molecular.

Este modelo establece que el reloj consiste en un grupo de genes “A” que expresan su RNAm y proteínas, las cuáles sucesivamente estimulan la activación de otros genes, “B”, y otras proteínas las cuáles a su vez inhiben la expresión de los genes que les dieron origen, ósea los “A”. Podríamos decir que el modelo tiene dos elementos positivos “A” y dos negativos “B”. Los elementos positivos son los genes *Clock* y *Bmall* y los negativos son *periodo* y *Cryptochrome (cry)*. Las proteínas de estos dos últimos, denominadas respectivamente *PERIODO* y *CRYPTOCROME* entran al núcleo de la célula e inhiben la expresión de *Clock* y *Bmall*. Eventualmente las proteínas *PER* y *CRY* se degradan y dejan de ejercer su acción represora sobre los genes positivos, lo que posibilita que estos vuelvan a expresarse. Este proceso demora aproximadamente 24 horas, esto es, genera un ciclo circadiano (Fig.9). De manera general el modelo consiste de un asa de retroalimentación negativa de transcripción-traducción autorregulatoria. Por lo tanto se trata de un *feed-back* autorregulatorio negativo en donde la expresión de algo producirá su misma represión tiempo después.

Este modelo es el esquema general de funcionamiento en todas las especies que hasta ahora se han estudiado, de acuerdo a las especies cambian los nombres de los genes y de sus proteínas, pero el mecanismo de *feed-back* negativo se mantiene a través de la escala filogenética.

El estudio del reloj biológico a nivel molecular nos ayuda a profundizar más en su funcionamiento, además de trazarnos el circuito que es la base de la función biológica del ritmo. Se espera que el conocimiento de los genes reloj, nos sea útil para combatir los trastornos de sueño, depresión, obesidad, causados cuando el reloj no trabaja bien o se modifica por actividades de la vida moderna como el Jet lag o el trabajo nocturno.

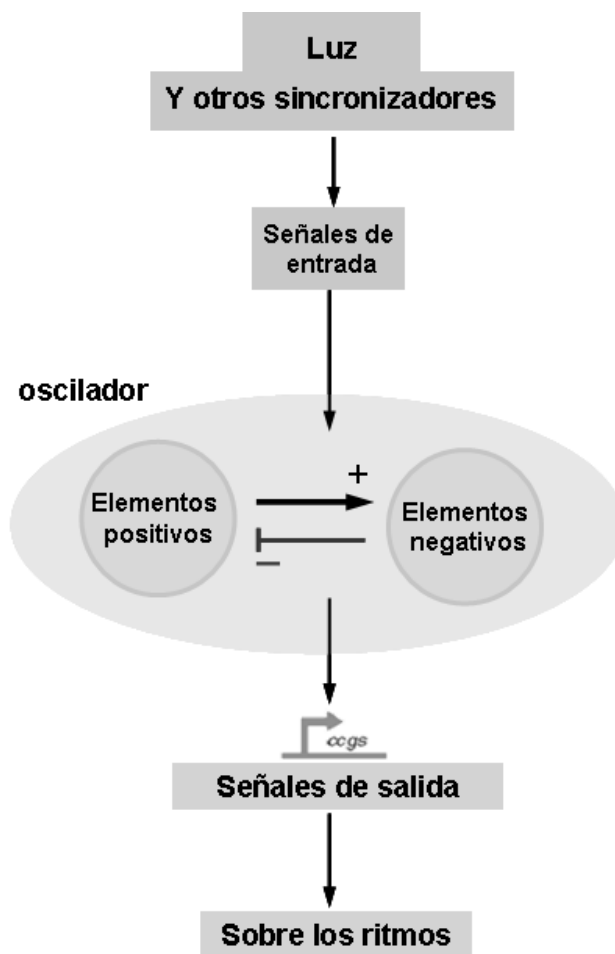


Figura 9. Circuitos del control de tiempo circadiano. El reloj biológico consiste de circuitos de retroalimentación negativa que pueden ser sincronizados por señales ambientales a través de vías de entrada produciendo otros ritmos a través de vías de salida. La regulación circadiana de la expresión de genes controlados por reloj (GCR) a través de las señales de salida desempeñan un papel importante en la generación de los ritmos.

LA SINCRONIZACIÓN

Para que un ritmo biológico tenga relevancia adaptativa debe presentarse en concordancia con los ciclos ambientales. No es suficiente que en el organismo existan oscilaciones, se requiere que estas oscilaciones modifiquen sus funciones o conducta de acuerdo a las fluctuaciones externas. Para ello se requiere la sincronización del reloj biológico con las señales externas.

Una oscilación circadiana puede ser sincronizada por una señal periódica externa, cíclica, predecible, ajustando el periodo y fase del ritmo endógeno, un ejemplo es la alternancia de luz/oscuridad generada por el movimiento de rotación de la Tierra.

El fenómeno de sincronización requiere que el sistema (el reloj o sus osciladores) adopte una relación de fase específica con el sincronizador, para lo que es necesaria la sensibilización de los osciladores endógenos a señales ambientales específicas y la habituación a otras. Para que el oscilador sea sensible, estas señales de tiempo deben de ser periódicas y predecibles para el organismo, lo cual provoca un ajuste del periodo del sistema circadiano al de la señal externa, llamada Zeitgeber (dador de tiempo) o sincronizador (Pittendrigh, 1981).

En ausencia de una señal de sincronización, que resulta de condiciones de oscuridad constante el ritmo de actividad locomotora de la rata oscila con un periodo poco mayor de 24 horas, que al imponer un ciclo externo de alternancia luz/oscuridad de 12/12 horas le impondrá un periodo de 24 horas sincronizando la fase de inicio de la actividad locomotora (Fig.10).

La sincronización se distingue de otros fenómenos como el aprendizaje porque los sincronizadores actúan en ausencia de otras señales externas que le indique al organismo la llegada del sincronizador, se sigue presentando la actividad cíclica endógena aún en ausencia del estímulo y presenta límites determinados de sincronización (Moore, Sulzman y Fuller, 1982; citado en Shettleworth, 1998). Esto significa que, un reloj que oscila con ritmos cercanos a 24 horas solamente puede sincronizarse a ciclos con un periodo parecido.

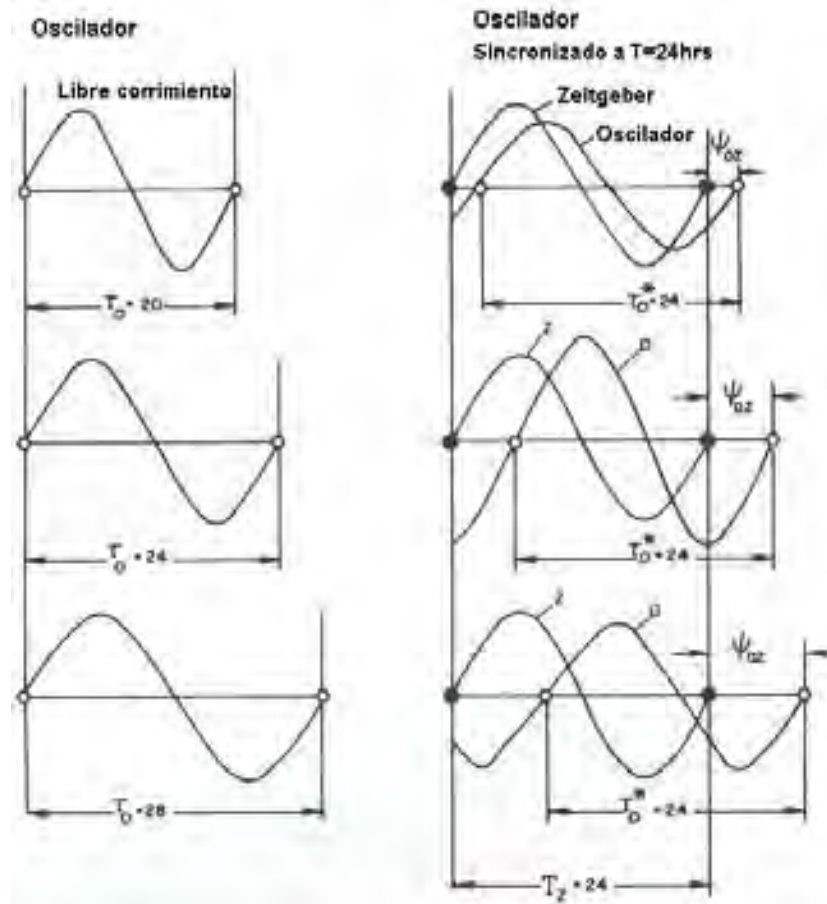


Figura 10. Diagrama que muestra el fenómeno de la sincronización. A la izquierda se muestran 3 oscilaciones con periodos distintos (T_0), las cuales se exponen a un sincronizador con un periodo de 24 hrs. (T_z), representado en la Fig.derecha. Al sincronizarse todas comienzan a oscilar con un periodo de 24 hrs. y cada uno con relación de fase (ψ_{oz}) distinta hacia el sincronizador (modificada de Pittendrigh, 1981).

SINCRONIZACIÓN FÓTICA Y NO FÓTICA.

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 medioambientales 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 (Aschoff 1965). 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 (Aschoff, 1981). 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 atraso (el animal inicia más tarde de lo esperado) o un adelanto (el animal inicia más temprano) dependiendo de si la luz se aplicó al inicio o al final de la noche circadiana respectivamente (Meijer, 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/calmodulina, MAP cinasas) 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 (Repper y Weber, 2001, Cermakian y Sassone Corsi, 2002). (Fig.11)

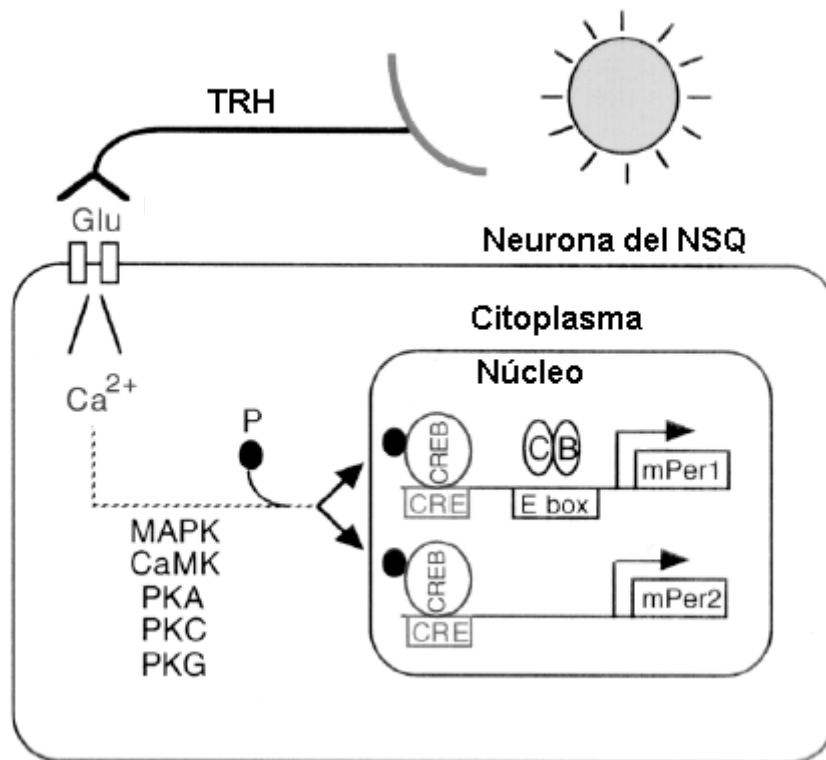


Figura 11. La estimulación luminosa activa células ganglionares de la retina las cuales a su vez liberan glutamato en la terminal sináptica del tracto retino hipotálmico (TRH) estimulado receptores de dicho neurotransmisor (NMDA) en las neuronas del NSQ. Esto promueve un incremento en las concentraciones de calcio intracelular (Ca²⁺) y una activación de cascadas de ciertas moléculas (MAPK, CaMK, PKA, etc) que posteriormente lleva a la expresión de genes reloj como Per. (Modificado de Repper y Weber y col. 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 temperatura, la administración de algunos fármacos, la privación de sueño y el alimento en condiciones especiales, por mencionar algunos. (Hasting y col 1998; Hastings y col 1992; Mrososvsky, 1995, 1996; Antle y Mistlbrger, 2000; Mendoza y col 2004).

A los estímulos que son capaces de sincronizar la actividad del NSQ y por lo tanto también aquellas conductas o parámetros fisiológicos dependientes de este núcleo y que no son luminosos, se les llama no-fóticos. Estos estímulos que generalmente son sincronizadores secundarios o débiles, adquieren mayor intensidad en ausencia del ciclo luz-oscuridad, y son capaces de alterar el ritmo endógeno del organismo y la actividad del NSQ sólo en condiciones de oscuridad constante (Mrososvsky, 1995).

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 (Mrosovsky, 1995,1996). Por otro lado, a nivel molecular los estímulos no-fóticos producen una supresión de genes como del *per*, a 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 2000; Maywood y Mrosovsky, 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 hojuela intergeniculada lateral del talamo (HIL), a través del tracto geniculo-hipotalámico, utilizando como principal neurotransmisor el neuropeptido Y (NPY), como de los núcleos del rafe a través de una vía serotoninérgica y del PVT utilizando el glutamato como neurotransmisor (Meyer-Bernstein y Morin 1996; Mrosovsky 1996). Por ejemplo, las lesiones ya sea del 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).

EL ORDEN TEMPORAL INTERNO

El NSQ al transmitir a todo el organismo su señal de tiempo, mantiene sincronizadas todas las funciones y la conducta para que oscilen con un orden de acuerdo a las fluctuaciones externas del día y la noche. Con ello se mantiene un “orden temporal interno” que permite el buen funcionamiento del cuerpo (Buijs y col. 2003). Desde un punto de vista cronobiológico, el estado de salud se define como la correcta relación de fases tanto entre los ritmos del propio organismo como entre éstos y el ciclo ambiental (Figs.12 y 13).

En condiciones normales de sincronización con un *zeitgeber* (sincronizador) fuerte como el ciclo luz/oscuridad de 24 hrs., cada ritmo circadiano del organismo asume una relación de fase estable con la señal de tiempo externa y las diversas variables fisiológicas mantienen una relación de fases estable entre sí, aún en ausencia de estas señales de tiempo, que se conoce como “oscilación libre o libre curso” (ausentes de *zeitgebers*; ejemplo la oscuridad constante). Esta sincronía interna entre variables se mantiene por el reloj biológico, el NSQ. Estudios en humanos indican que en ausencia de sincronizadores, los ritmos de sueño/vigilia, de temperatura corporal, y concentración plasmática de cortisol mantienen la misma periodicidad y relaciones de fases estables durante períodos prolongados (Minors y col. 1981 y Mistlberger y col.

2005). Al no depender de la presencia de un *zeitgeber*, este hecho sugiere la existencia de fuertes mecanismos de acople interno por parte del reloj hacia los demás tejidos osciladores.

El ser humano es esencialmente diurno, está preferentemente activo durante el día, tomando las horas de descanso durante la noche.

Las señales temporales que sincronizan al reloj biológico del ser humano son muy variadas. Las más evidentes son claves periódicas (de 24 horas) del ambiente, de las cuales la principal es el ciclo de día/noche y la temperatura; sin embargo también influyen sobre el reloj como sincronizadores, señales artificiales como la organización de horarios de trabajo, el esparcimiento, y otros compromisos sociales; así como la propia actividad física y cognitiva del individuo. Los horarios de comidas también son propuestos como claves de tiempo para los osciladores cerebrales y periféricos debido a los cambios metabólicos producidas por la comida y necesarios para la síntesis de los neurotransmisores involucrados en la transmisión sináptica (Stephan, 2002; [Winget](#), y col; 1984). Por lo tanto, vivimos inmersos en una compleja estructura social que condiciona nuestra vida diaria.

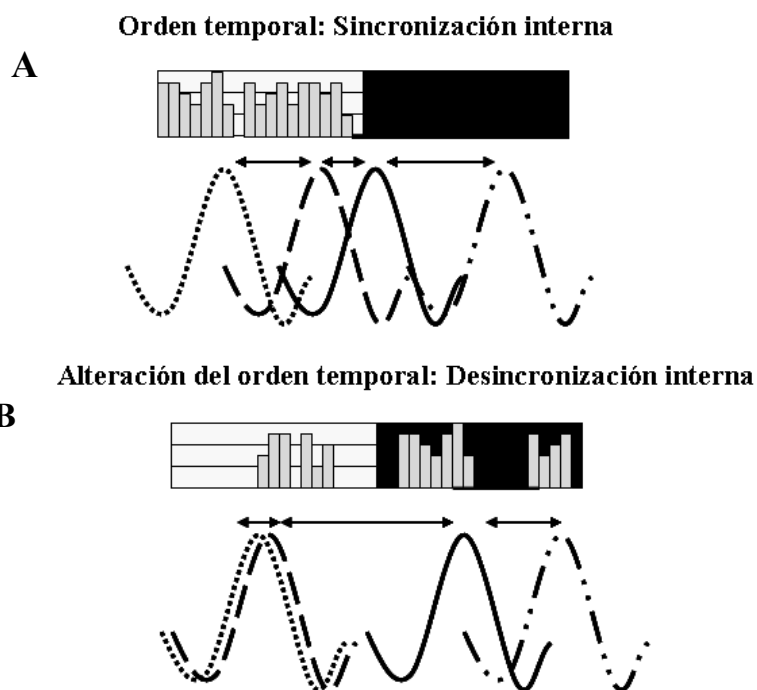


Figura 12. Representación esquemática de distintas variables metabólicas. En A. Un organismo con actividad diurna bajo condiciones normales de sincronización con un ciclo de luz / oscuridad de 24 hrs. Cada ritmo circadiano del organismo mantiene una relación de fases estable con la señal de tiempo externa y las diversas variables fisiológicas mantienen una relación de fases estable entre sí. En B se observa el mismo organismo pero con una alteración del orden temporal, ahora obligándolo a estar activo en la noche, se observa una pérdida de relación de fases entre la señal de tiempo y con diversas variables fisiológicas. Cada oscilación representa una variable fisiológica.

LA IMPORTANCIA DE ESTAR SINCRONIZADO

El desarrollo de tecnología en comunicación, en la industria de alimentos así como en la prestación de bienes y servicios ha creado una relativa independencia del ambiente “natural”, lo cual ha creado prioridad a estímulos artificiales que influyen sobre el reloj biológico. Un ejemplo de como la vida moderna provoca situaciones que producen alteraciones en la sincronización son los cambios bruscos en el ambiente (vuelos de larga duración, turnos de trabajo rotatorios, trabajo nocturno, etc.) que genera señales conflictivas y por lo mismo alteraciones sobre el reloj biológico y la expresión de los ritmos circadianos (Fig.13). Estas situaciones provocan dos fenómenos, la desincronización externa, que consiste en una pérdida de la relación entre los ritmos endógenos y los externos; y una desincronización interna, que consiste en una pérdida del orden temporal, por una pérdida de acoplamiento entre el NSQ y sus osciladores periféricos. Este desajuste del orden temporal interno afecta al organismo de manera transitoria y aún así deja secuelas crónicas en la salud de las personas.

Algunas condiciones que provocan desincronización interna y externa son los viajes transmeridionales, los horarios de trabajo rotatorios, que ya se mencionaron y la vejez.

PROBLEMAS DE SALUD ASOCIADOS A LA DESINCRONIZACIÓN

DESINCRONIZACIÓN POR VIAJES AÉREOS TRANSMERIDIONALES (Jet Lag)

Los que habitamos este planeta sabemos que los tiempos y hábitos que desarrollamos están condicionados por nuestra localización geográfica. Aquellos que hayan volado cruzando meridianos debieron ajustar sus relojes pulsera para ser coherentes con el lugar de destino, adelantando o atrasando las agujas del reloj. Paralelamente, el reloj biológico experimenta la necesidad de realizar el mismo ajuste. Este ajuste frente a los cambios ambientales no es inmediato, y las distintas variables circadianas comprometidas en los procesos de oscilación del cuerpo exhibirán respuestas de fase diferentes: por ejemplo, los ritmos de frecuencia cardíaca, presión arterial, actividad locomotora, catecolaminas plasmáticas, entre otros, se sincronizarán más rápidamente que los ritmos de temperatura, melatonina, desechos urinarios y cortisol plasmático (Klein y col.;1991; Gander y col.; 1985 y [Yamaguchi](#) y col.2003).

La diferente capacidad de ajuste de cada órgano causa temporalmente una pérdida del orden temporal interno entre los osciladores periféricos, y gradualmente se restablecen las relaciones de fase de los ritmos entre sí, con el NSQ y con el nuevo horario (Graeber 1989, Moline y col. 1992). Por lo tanto el *jet-lag* resultante de viajes transmeridionales es definido como un conjunto de síntomas causados principalmente por una alteración del patrón de sueño, que ocurre cuando ciertos ritmos biológicos se encuentran fuera de fase entre sí y fuera de fase con el ciclo del día y la noche (Schwartz y col. 1987; Spiegel y col. 1996; Dawson y col. 1995, [Reddy](#) y col.1995).

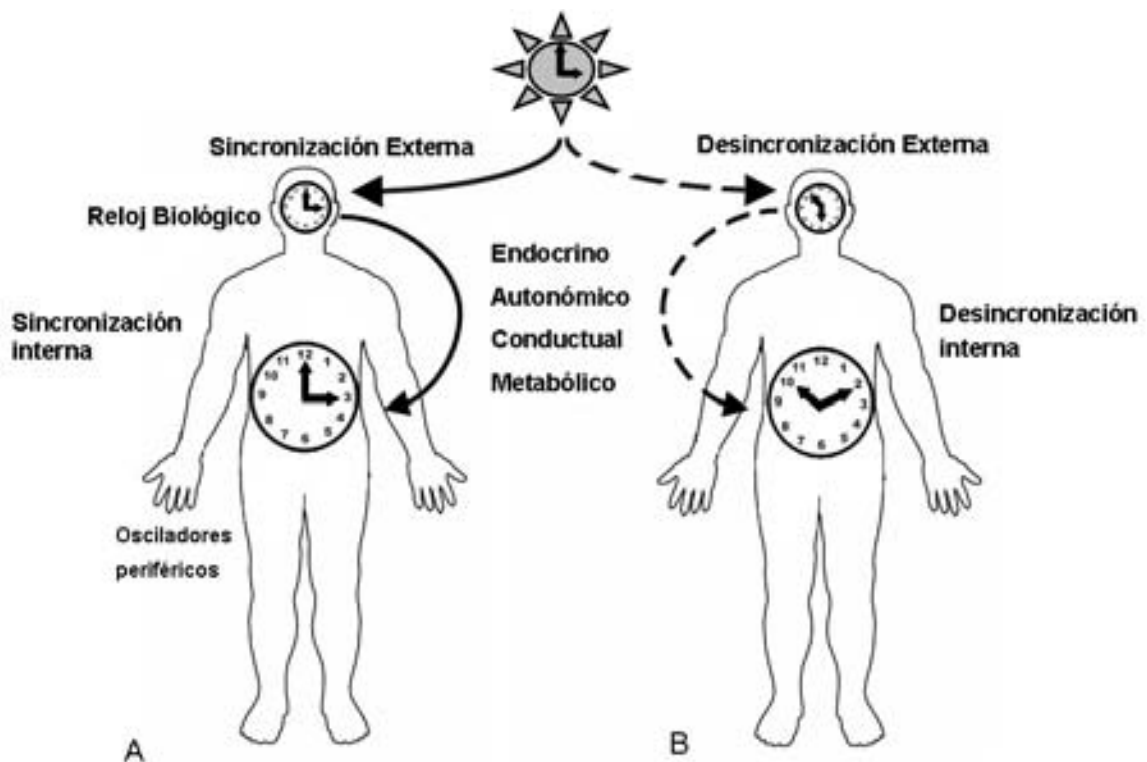


Figura 13. Representación esquemática de un individuo sincronizado con su ambiente (sano) (A) y otro desincronizado (enfermo) (B). En A, la línea continua representa una correcta relación de fase del reloj biológico (NSQ) con el medio ambiente conocida como sincronización externa y la correcta relación de fase del reloj con sus osciladores periféricos conocida como sincronización interna. En B. La línea discontinua representa un individuo con desincronización externa, es decir no existe una relación de fases del NSQ con el medio ambiente. En la desincronización interna se plantea que existe una correcta relación entre el reloj y el medio externo, pero una alteración en la salida de señales rítmicas del reloj hacia el resto del organismo, que da como consecuencia un desacoplamiento del organismo con su propio reloj.

Las consecuencias de los vuelos transmeridianos son el mayor cansancio durante el día, menor grado de concentración y alerta, desorientación, “destemporalización”, así como irritabilidad y depresión ([Mrosovsky](#) y col. 1996, [Deacon](#) y col. 1996). Son frecuentes

también los desórdenes gastrointestinales derivados de la ingestión de alimentos en un horario inusual, tales como indigestión, diarrea, constipación, acidez estomacal y riesgo de úlceras gástricas y duodenales. Las consecuencias más graves se observan en personas que viajan constantemente y que el tiempo entre un viaje y otro no permite la resincronización interna. Estas personas se caracterizan por estados crónicos de cansancio, dificultad en la concentración y menor grado de alerta durante el día, así como amnesia temporal, debilidad general y ansiedad (Spiegel y col. 1996).

LA DESINCRONIZACIÓN EN TRABAJADORES EN TURNOS Y NOCTURNOS.

Desde hace varios siglos, ya existían jornadas de trabajo diurnas y nocturnas, especialmente en las actividades industriales extractivas y de los servicios de salud. En 1556, el médico Georg Bauer, describió en su libro “De Re Metallica”, las dificultades de salud por las que pasaban los mineros del tercer turno (o turno nocturno) (Akerstedt y col. 2004, Folkard y col. 1993). Escrito hace 443 años, este libro relata una situación que ocurre actualmente sólo que ahora en proporciones mayores (Chiesa, 1999).

El trabajo rotatorio o en turnos es una modalidad de organización laboral imprescindible para cualquier sociedad moderna. Se estima que en la actualidad un 20% de la población laboral realiza algún tipo de trabajo en turnos en variadas áreas, que comprenden tanto al sector de servicios como al industrial (Lavie, 2001). Las proyecciones indican que para la segunda década del siglo XXI aproximadamente un 40% de la población activa realizará alguna forma de trabajo en turnos. (Klerman y col. 1998).

El trabajo por turnos supone el trabajo fuera de las horas normales del día; es decir, fuera de las horas de 7 de la mañana a 6 de la tarde, el período durante del cual muchas personas trabajan regularmente 7 a 8 horas. Los trabajadores por turnos pueden trabajar por la tarde, a la mitad de la noche, trabajar horas extras o días muy largos (Mellor, 1996). También pueden trabajar algunas veces en horario normal. Muchos trabajadores por turnos tienen horarios rotatorios, lo que supone cambios de las horas de trabajo de la mañana a la tarde o del día a la noche. Estos cambios ocurren en días diferentes de una semana o en un mes. Los policías y los bomberos, por ejemplo, a menudo tienen calendarios de trabajo que rotan. Otros trabajadores pueden trabajar un turno "permanente" y trabajar solamente por la noche o por la tarde (Klerman, y col. 1998).

Desde el punto de vista cronobiológico, y cualquiera que sea el esquema de trabajo en turnos que se adopte, se produce siempre una reducción de las horas de sueño y una alteración de los ritmos circadianos. Esto lleva a una situación de estrés crónico en el trabajador de turnos rotatorios, el que reconoce 3 orígenes: (a) la alteración de los ritmos circadianos; (b) la fatiga y la alteración del sueño; (c) las alteraciones de la vida de relación doméstica y social.

Con relación a los ritmos circadianos, el turno de trabajo requiere, en general, que un individuo esté alerta en un momento inadecuado de su ciclo sueño-vigilia que puede resultar en un estado en el cual los ritmos circadianos del individuo pierdan su sincronía (Spitzer, y col. 1997; [Nagano](#), y col. 2003). Esta desincronización se debe a que el proceso de ajuste del sistema circadiano al cambio repentino de horario en el nuevo turno es lento y requiere una semana aproximadamente (un día por cada hora de diferencia entre turnos) por lo que el trabajador está en general desincronizado durante el turno nocturno. La presencia de sincronizadores externos (el día y la noche) en antagonismo con el requerimiento impuesto por los turnos (una sociedad diurna para individuos que quieren conciliar el sueño durante el día), afecta negativamente a la adaptación.

Un 60-70% de los trabajadores en turnos se queja de alteraciones del sueño y de fatiga aumentada durante el turno nocturno. Es común, que el trabajador lo atribuya a la falta de sueño. Una consecuencia extrema de la privación de sueño es la llamada "parálisis nocturna", episodios de 1-2 minutos de duración, en los cuales los individuos están conscientes de lo que ocurre a su alrededor pero son incapaces de actuar. La somnolencia y fatiga explican tanto incidentes menores como accidentes de trabajo graves (de clara predominancia nocturna), así como tragedias industriales del tipo de Chernobyl o el derrame petrolero del Exxon Valdez.

El sueño en un trabajador en turnos puede estar alterado tanto por factores endógenos como exógenos. Los factores endógenos provienen del sistema circadiano, preparado para el despertar en el momento que el trabajador de turno nocturno pretende tener su descanso. (Haus, y col. 2006, Van Cauter, y col. 2007). Es común, que el trabajador atribuya su falta de descanso al ruido del tráfico, los gritos de los niños, etc., sin percibir que, en realidad, es su sistema circadiano que indica dormir de noche, el responsable del sueño inadecuado durante el día. Esto conduce a una inadecuación social y doméstica, al impedir al trabajador cumplir adecuadamente con sus obligaciones familiares y

sociales. En este sentido, los conflictos sociales y familiares, por ejemplo la incidencia de divorcios, es significativamente mayor en personas que realizan trabajo en turnos. Con relación a las secuelas en la salud producidas por el trabajo en turnos, existe un aumento significativo en el número de consultas médicas y bajas por enfermedad en este grupo de trabajadores (Fig.14). Las quejas más comunes son el cansancio, la fatiga, irritabilidad, aumento del consumo de medicamentos, alteraciones menstruales, etc. Otras alteraciones específicas más comunes son la ganancia de peso, (Healy, y col. 1995;), las alteraciones gastrointestinales, (Hastings M. y col. 2003) comprendiendo a las gastritis en todas sus variantes y a la úlcera gastroduodenal y en segundo término, las alteraciones cardiovasculares (Boggild y col. 1999) y cáncer de mama en mujeres (Knutson y col. 2007; Ribeiro y col. 1998; Davis 2001, Spiegel y col. 2002). (Fig.14). En distintos estudios, a partir de los 5 años de exposición al trabajo en turnos, estas alteraciones aparecen con mayor incidencia que en la población general. La demanda social creciente del trabajo en turnos, hace necesario tomar decisiones sobre las características y tipos de turnos a realizar, pero hasta el momento sigue siendo un grave problema laboral.

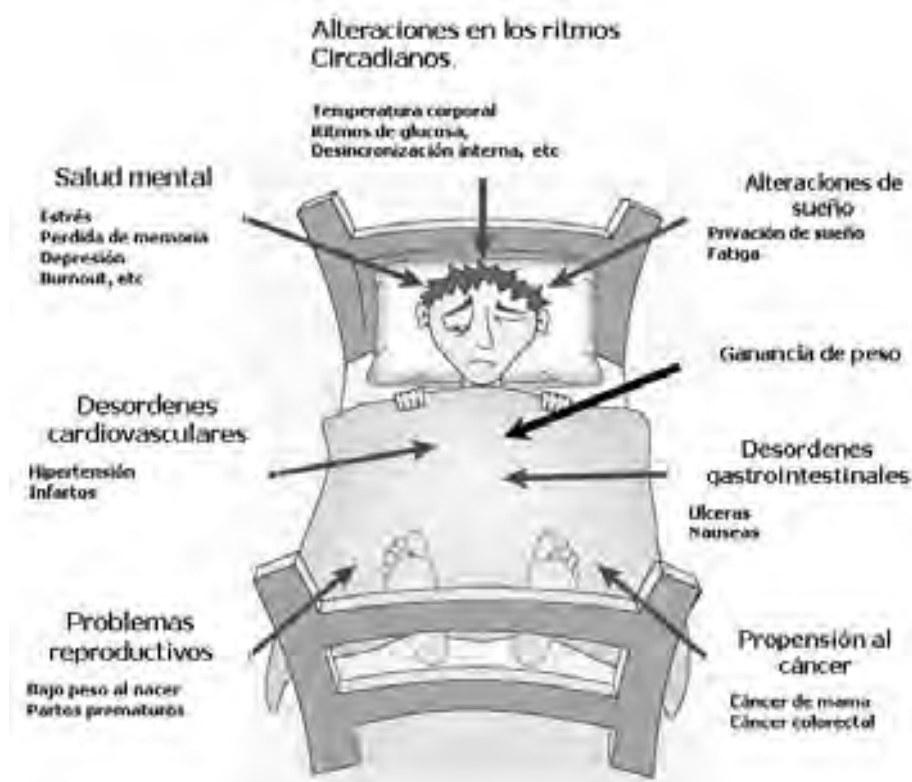


Figura 14. Las secuelas en la salud producidas por el trabajo en turnos son variadas. Esta Fig.resume las alteraciones en la salud más comunes. (Modificado. Russell G. Nature Reviews, vol 6 may 2005).

DESARROLLO DE MODELOS ANIMALES PARA ESTUDIAR LA FISIOLOGÍA DEL TRABAJADOR NOCTURNO

Las distintas investigaciones en humanos a lo largo de los años, han constatado que el trabajo en turnos es un factor psicosocial desfavorable para el bienestar del trabajador. Estas observaciones no han permitido entender qué alteraciones existen en el mecanismo del reloj, que propicien la pérdida de acoplamiento entre el medio ambiente y el reloj o de éste con los osciladores periféricos, lo cual desencadena la desincronización interna que puede llevar a una enfermedad.

Por tal motivo varios grupos han tratado de crear modelos animales que permitan estudiar y entender mejor los mecanismos que llevan al desacoplamiento de los ritmos causadas por el trabajo nocturno y para probar estrategias que disminuyan o eviten sus efectos.

Barger L. y col. 2006, desarrolló un modelo de trabajadores en turno y de viajeros transmeridionales (Jet lag), basándose en estudios previos donde probó si el ejercicio facilita la adaptación circadiana. Para esto propuso un modelo donde por 5 días las ratas estuvieron bajo un ciclo L/O 12:12 y posteriormente invirtió este ciclo, ahora O/L 12:12 simbolizando un cambio repentino en el trabajo o un viaje transmeridional. En este nuevo periodo de luz, al organismo se le obligaba por 7 días a realizar ejercicio en una rueda de actividad 3 veces al día por una hora. Demostró que el ejercicio puede atrasar significativamente la fase del reloj maestro y esto puede ayudar a facilitar la adaptación circadiana en aquellas modalidades que requieran un atraso de fase en su ciclo sueño-vigilia.

[Tsai LL](#), y col 2005, 2007 siguieron otra estrategia con el objetivo de generar una desincronización interna crónica. Su método consistió en alternar un ciclo invertido O/D 12:12 por 3 días (Martes-jueves) con 3 días en un ciclo L/O 12:12 (Viernes-Domingo), seguido de un día en oscuridad constante (lunes). Esto se realizó por 13 semanas para generar una desincronización interna. Sus resultados mostraron un incremento en la ganancia de peso y en la ingesta de alimento ([Tsai LL](#), y col., 2007). De forma similar [Bartol-Munier](#) y col. (2006) siguieron un diseño crónico con cambios de fase similares y observaron cambios en el alimento ingerido, pero sin ganancia de peso y reportaron reducción en la actividad, sugiriendo esto como parte de una desincronización circadiana crónica.

Existen muchos trabajos más que han abordado el trabajo nocturno, (Ribeiro, y col. 1998; Reid y Dawson 2001) en todos ellos se utilizan estrategias de cambios del ciclo luz oscuridad Esta estrategia, que representa principalmente una condición de jet-lag ha llevado a resultados poco consistentes y muchas veces contradictorios, dependiendo de la forma en que se realizan los cambios del ciclo luz-oscuridad.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los modelos animales para estudiar los efectos del trabajo nocturno utilizados hasta el momento utilizan estrategias de cambios del ciclo luz oscuridad y no reflejan las condiciones reales del trabajador nocturno. Pocos trabajos han abordado el mantener activos a los animales para simular la situación real del trabajador nocturno.

Este proyecto tuvo como objetivo desarrollar un modelo de trabajo nocturno en ratas semejante a las condiciones del trabajador nocturno, para ello se utilizaron ruedas de actividad forzada en las cuales las ratas trabajaron. Se forzaron a estar activas 8 horas diarias de lunes a viernes. Con este modelo se pretendió determinar los mecanismos que subyacen a la desincronización temporal metabólica y conductual y con la actividad del NSQ, para establecer su relación de fase con el ciclo de luz/oscuridad y del NSQ con sus efectores.

Con este modelo se pretendió observar un fenómeno de desincronización interna similar al que se observa en los trabajadores nocturnos para estudiar los mecanismos que desencadenan dicha desincronización.

Finalmente con este modelo se probaron estrategias para prevenir la desincronización interna, en especial se manipularon los horarios de alimentación como una estrategia para reacoplar los ritmos conductuales y metabólicos y aminorar o evitar disfunciones metabólicas en el trabajador nocturno.

OBJETIVOS GENERALES

- Crear un modelo de trabajo nocturno utilizando una rueda de actividad forzada para mantener activos a los animales durante su etapa de descanso; sin alterar su ciclo L/O.
- Caracterizar el fenómeno de desincronización interna en ratas bajo el paradigma de trabajo nocturno por medio de la comparación de la relación de fase entre:
 - sus ritmos circadianos, metabólicos y conductuales.
 - el ritmo del NSQ y el ciclo L/O
 - El ritmo del NSQ con sus efectores
- Determinar el o los factores que propician la desincronización interna entre el NSQ y sus efectores.
- Probar horarios restringidos de alimento como una estrategia, para disminuir las alteraciones que provoca el trabajo nocturno.

HIPÓTESIS GENERALES

- La exposición diaria por 8 horas a la rueda de actividad forzada provocará una desincronización interna en roedores, semejante a las que se observan en un trabajador nocturno.
- La actividad forzada durante la fase de descanso, provocará que el NSQ:
 - Pierda su relación de fase con el ciclo L/O.
 - Pierda su relación de fase con sus efectores
- El alimento será una potente señal que ocasiona una desincronización interna entre ritmos metabólicos y conductuales bajo esta manipulación.
- Restringir los horarios de alimento será una buena estrategia para resincronizar ritmos metabólicos y conductuales y disminuir las alteraciones que provoca el trabajo nocturno.

ETAPA 1

CARACTERIZACIÓN DEL MODELO DE TRABAJO NOCTURNO

Con la idea de poder determinar si el trabajo en una rueda de actividad forzada durante la etapa de descanso genera alteraciones fisiológicas y/o conductuales en la rata, se plantearon las siguientes hipótesis y objetivos:

OBJETIVOS

- Probar sí en la rata, la actividad forzada durante su etapa de descanso, por 8 horas diarias utilizando una rueda de actividad, genera alteraciones similares a las reportadas en un trabajador nocturno.
- Caracterizar en este modelo animal de horarios nocturnos de trabajo, sus ritmos circadianos, metabólicos y conductuales.

HIPÓTESIS

- La exposición diaria por 8 horas a la rueda de actividad forzada provocará una desincronización interna en roedores, semejante a las que se observan en un trabajador nocturno.
- La actividad forzada durante la fase de descanso, provocara que el NSQ:
 - Pierda su relación de fase con el ciclo L/O.
 - Pierda su relación de fase con sus efectores

MATERIALES Y METODOS

ANIMALES

Se utilizaron ratas Wistar macho con un peso inicial de 140-160gr., mantenidas en un cuarto de registro aisladas en cajas habitación individuales de acrílico (50x30x20 cm) en condiciones de temperatura controlada ($22 \pm 1^{\circ}\text{C}$) y bajo un ciclo de luz / oscuridad (L/O) 12:12, donde el encendido de la luz fue a las 7 AM (Zeitgeber time, ZT0) y el apagado a las 19 horas (ZT12). Todos los grupos tuvieron libre acceso al agua y alimento (Rodent Laboratory Chow 5001).

PROCEDIMIENTO PARA EL REGISTRO AUTOMATIZADO DE CONDUCTA.

Las ratas utilizadas en todas las etapas de este trabajo se alojaron individualmente en un cuarto aislado, sono amortiguado, en cajas de acrílico transparente. A estas cajas se les

ha adaptado un sistema de registro conductual automatizado que consiste de sensores de presión colocados bajo las cajas, con los que se registra el movimiento de los animales (Fig.15). Los movimientos crean pulsos de conducta que se colectan en una computadora que almacena unidades de 1-5 minutos. Este mismo sistema programa la duración e inicio del fotoperíodo.

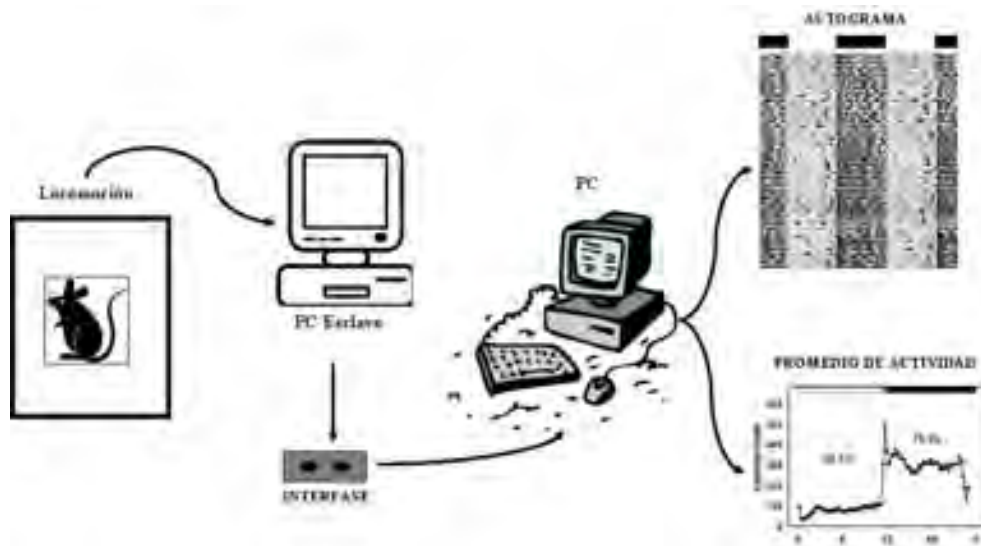


Figura 15. Sistema de registro conductual para ratas. A estas cajas se les ha adaptado sensores de presión colocados bajo las cajas, con los que se registra el movimiento de los animales. Los pulsos de conducta se colectan por una computadora que almacena unidades de 1-5 minutos. Otra computadora contiene los programas de análisis necesarios para realizar los estudios de cronobiología y estudiar la conducta del animal.

ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO DE TRABAJO NOCTURNO: DISEÑO EXPERIMENTAL

Se asignaron al azar las ratas en 3 grupos.

El grupo control: Se mantuvo en registro conductual en el cuarto de registro sin manipulación durante 5 semanas.

Grupo de trabajo durante la fase de descanso (TFD) (modelo de trabajo nocturno).

Después de una semana de línea base, se inició la fase de trabajo. Para ello, se sacó a cada rata de su jaula habitación y se le colocó en una rueda de actividad cerrada y conectada a un motor que genera oscilaciones lentas y constantes (1 revolución / 2.5 minutos) obligándolas a moverse (trabajar) 8 horas diarias durante la fase de luz (etapa de descanso) de 9 a.m. a 5 p.m. (ZT2. ZT10) de lunes a viernes (Fig.16) Este procedimiento se siguió por 4-5 semanas. Después de las 8 horas de trabajo los animales

se regresaban a su jaula hasta el siguiente día. Los fines de semana se mantuvieron sin manipulación dentro de sus cajas habitación de registro (Fig. 17).

Grupo de trabajo durante su fase de actividad (TFA) (modelo de trabajo diurno): Este grupo tuvo como finalidad ser control de trabajo y permitió determinar que los efectos encontrados no se debieran a la rueda misma sino a la actividad durante el reposo. Después de una semana de línea base se inició la fase de trabajo de la misma forma que el grupo anterior de lunes a viernes, pero la estancia en la rueda se llevó a cabo durante la noche de 9 p.m. a 5 a.m. (ZT14, ZT22), que corresponde a la fase de actividad de las ratas. Igualmente, durante el trabajo tuvieron libre acceso al alimento y agua.



Figura 16. Rueda de actividad forzada. La rueda cuenta con cuatro divisiones, en cada división se mantiene una rata. Las rotaciones lentas de estas ruedas mantienen activas a las ratas durante las 8 horas de trabajo, en estas ruedas tienen la oportunidad de alimentarse y tomar agua *ad libitum*.

Se sometieron a esta rutina de actividad durante 4-5 semanas, similar a lo que realiza un trabajador diurno. Este grupo permitió descartar si los efectos observados en el grupo TFD se debían a su estancia en la rueda o a la actividad forzada asociada a la fase de reposo (Fig.17).

MONITOREO DE PESO CORPORAL E INGESTA DE ALIMENTO

Los animales se pesaron al inicio del estudio y una vez por semana (jueves) durante las semanas que duró la rutina de trabajo, a la misma hora. El alimento se pesó 2 veces a la semana (lunes y viernes) a las 7 de la mañana para medir el consumo de alimento nocturno y para medir el consumo de alimento durante el día a las 7 de la noche.

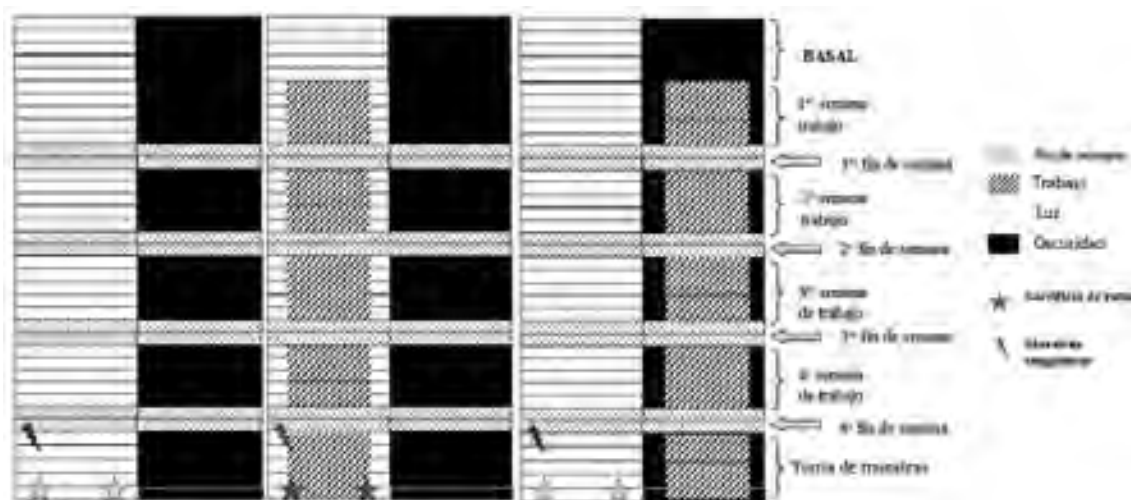


Figura 17. Diseño experimental y procedimiento de trabajo. La actividad en la rueda (cuadros con líneas diagonales) se siguió por 5 semanas 8 horas durante el día para el grupo TFD (izquierda) y durante la noche para el grupo TFA (derecha). Después de 5 días de trabajo, los animales se dejaban sin manipulación los fines de semana y el lunes siguiente se repitió el protocolo. Al final de la cuarta semana de trabajo se canularon los animales y se tomaron muestras de sangre (rayo) durante la 5ª semana de trabajo y al final de esta se sacrificaron todos los animales (estrella).

DETERMINACIÓN DE RITMOS METABÓLICOS Y HORMONALES

Al finalizar la cuarta semana de trabajo (jueves o viernes) y para determinar los ritmos metabólicos y hormonales en suero se les colocó a todas las ratas una cánula en la vena yugular externa, de acuerdo a Steffens (1969). Los animales fueron anestesiados con Zoletil 100 (Virbac 0,01 ml/100g) y canulados en la vena yugular interna con una cánula yugular pediátrica de silicón de polietileno (0,025 de diametro interno y 0,047 de diametro externo; Silastic Brand) llena de heparina (200 U/ml) como anticoagulante. La cánula fue fijada en la espalda entre ambas escápulas (omóplatos) y se tapó con una pequeña aguja.

Las ratas se dejaron en recuperación durante el fin de semana y el siguiente lunes el protocolo de trabajo se retomó. Al final de la 5ª semana de trabajo, se obtuvieron muestras de sangre distribuidas en dos días (el jueves y el viernes) cubriendo un ciclo de 24 h con intervalos de 3 h entre muestras (ZT0, ZT3, ZT6, ZT9, ZT12, ZT15, ZT18, ZT21). Las muestras de sangre (250µl) se colectaron en tubos Eppendorf (1.8 ml) que contenían un gel separador del coágulo (Vacutainer), se obtuvo el suero por centrifugación, 5 minutos a 3000 rpm y se guardaron alícuotas de 50-100µl a -45°C para su análisis posterior.

Las alícuotas fueron procesadas con métodos colorimétricos para la determinación de glucosa, triacilglicéridos (TAG) y con RIA para determinar corticosterona.

Se elaboraron perfiles temporales diarios por medio de promedios por grupo de cada punto temporal, que fueron comparados entre grupos y con relación al ciclo de L/O.

DETERMINACIÓN DE GLUCOSA, TAG Y CORTICOSTERONA

La glucosa fue estimada con una muestra de 10- μ l usando un Kit comercial de colorimetría (No. 70478; Hycel de México), en el que se basó la reacción entre la glucosa y *fenol-4amimofenazona* como cromógeno y fue medido a 500nm, con un espectrofotómetro (Novaspec II Visible, Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge, England).

Los TAG fueron evaluados con un kit comercial (no. B01-4512-01, SERA-PAK plus, Bayer, Sees, Francia) por cuantificación de *4-aminoantipiridina* a 500 nm, lo que es proporcional al glicerol producido por hidrólisis enzimática de una muestra de 10 μ l.

La corticosterona fue determinada con radioinmunoanálisis con un Kit comercial (Coat-A-Count Rat corticosterone; TKR1; DPC, Los Ángeles CA, USA), basado en la competencia de los sitios del anticuerpo entre ¹²⁵I-marcado y el suero de corticosterona. Esta reacción de unión es detectada por un contador gamma (Compañía Cobra II, Packard) y convertida con una curva estándar al suero de corticosterona. Los perfiles temporales diarios fueron comparados entre grupos y con relación al ciclo de luz- oscuridad.

INMUNOHISTOQUÍMICA PARA PER1 Y PER2

Las ratas (N=32 por grupo) fueron anestesiadas con una sobredosis de pentobarbital sódico (Sedal-Vet 65 mg/ml), y perfundidas transcardialmente (ventrículo izquierdo) con 250 ml. de solución salina (0.9%), seguido por 250 ml de paraformaldehído al 4% en buffer fosfato (PBS, 0.1 M, pH 7.2). Al finalizar la perfusión, se extrajeron los cerebros y se postfijaron en paraformaldehído al 4% durante 1 hora. Las ratas fueron perfundidas en 8 puntos temporales (ZT0, ZT3, ZT6, ZT9, ZT12, ZT15, ZT18 y ZT 21) para completar un ciclo de 24 h y determinar la ritmicidad de la proteína PER1 y PER2.

Los cerebros fueron removidos, posfijados por 1 h y crióprotegidos sucesivamente en una solución de sacarosa al 10, 20 y 30% en PB al 0.1 M por 24 horas. Los cerebros se congelaron y se cortaron en secciones coronales de 40 μm con un crióstato a -18°C y se colectaron en 4 series. De estas series una se incubó por 72 horas a 4°C con un anticuerpo primario para la proteína PER1 hecho en cabra (Santa Cruz biotechnology, USA) diluido 1:1000 en PBS pH 7.2 con 1% suero de conejo y 0.3% tritón X-100 (PBSRT). Una segunda serie se incubó 48 hrs. con un anticuerpo para la proteína PER2 hecho en conejo (Alpha Diagnostic International) diluido 1:500 en PBS pH 7.6 con 1% de suero de cabra y 0.3% tritón X-100 (PBSGT).

Después de la incubación las secciones se lavaron 3 veces por 10 minutos en PBS, y posteriormente se incubaron por 2h con un anticuerpo secundario biotinilado 1:200 (Anti-cabra hecho en conejo para PER1 y anti-conejo hecho en cabra para PER2; Vector laboratorios) en PBSRT o PBSGT respectivamente. Al finalizar las dos hrs. de incubación, los cortes se lavaron 3 veces por 10 minutos en PBS y se incubaron en una solución de avidina-biotina peroxidasa al 0.9% (Vectastain Elite ABC Kit; vector Labs, USA) por 2 horas. La incubación para PER1 fue hecha a temperatura ambiente mientras que para PER2 se incubó a 4°C .

Al finalizar la incubación los cortes nuevamente se lavaron 3 veces por 10 minutos en PBS y al finalizar el último lavado, los cortes se visualizaron con diaminobenzidina (0.5 mg/ml, en buffer de trizma 7.2) y peróxido de hidrógeno al 30% (35 μl /100 ml). Cada corte fue montado en láminas (porta-objetos) gelatinizadas y deshidratadas en una serie de alcoholes y aclaradas con xilol para posteriormente ser cubiertas con cubreobjetos y Permout (Fisher Chemicals).

CONTEO CELULAR

Para cuantificar la expresión de PER1 y PER2 en el NSQ, se escogieron 3 secciones representativas de este núcleo de acuerdo con el atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (1998), una sección anterior (bregma 0,92); una sección medial (bregma 1,20) y una sección posterior (bregma 1,40). Las imágenes fueron examinadas bajo un microscopio (Nikon Eclipse E600; Nikon, Tokio, Japón) y capturados en una ampliación 10X que utiliza un sistema computarizado de análisis de imagen (de la serie Meta Vue 4.5, Universal Imaging Corporation, Downingtown, PA, USA). Los núcleos

inmunoreactivos fueron contados bilateralmente por un observador que fue ciego a las condiciones experimentales. Para evitar el número de falsos positivos, se determinó la densidad óptica del fondo en una región cercana que carece PER1 o PER2. Las células inmunorreactivas que alcanzaron o superaron tres veces la densidad óptica del fondo fueron contadas, mientras las células por debajo de este umbral fueron descartadas. La media de los valores por punto temporal se representa con curvas temporales y se compararon con un ANOVA de dos vías para los factores grupo y tiempo.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos se ordenaron por grupos y tiempo y se representan como medias \pm el error estándar (sem). El incremento en peso corporal fue analizado con una ANOVA de una vía. La ingestión de alimento fue analizada con una ANOVA de dos vías para los factores: grupo y semanas (5).

La concentración de glucosa sérica, TAG y corticosterona, así como el número de células positivas a PER1 y PER2 fueron evaluadas con una ANOVA de dos vías para los factores grupo (3 niveles) y tiempo (8 niveles), como un factor de medidas repetidas para las medidas metabólicas y para medidas independientes para PER1 y PER2. Todos los análisis fueron seguidos de una comparación post-hoc múltiple de Tukey ($P < 0,05$). El análisis estadístico fue realizado con el programa Statistica para la versión de Windows 4,5 (StatSoft, 1993).

RESULTADOS

RITMOS CONDUCTUALES

Las ratas control, así como las ratas TFD y TFA en su línea base exhibieron ritmos claros sincronizados al ciclo L/O. La actividad nocturna representada para todos los grupos fue de 75-80%, mientras que la actividad diurna representó entre 20 y 25% de la actividad total diaria (Fig.18)

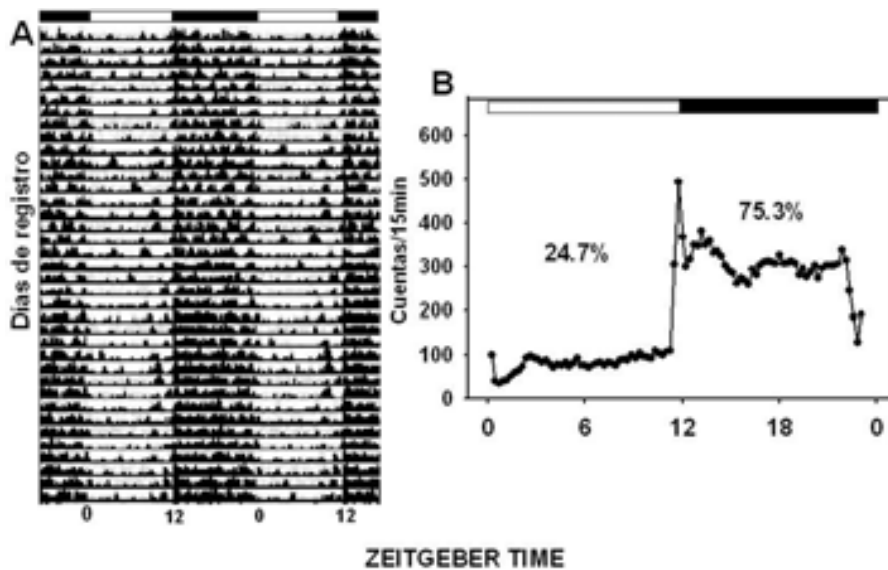


Figura 18. Actograma representativo en doble representación de la actividad general de una rata control con alimento y agua *ad libitum*. (A). En el actograma, cada línea representa un día de registro. En (B) promedio de actividad de 16 ratas control y el porcentaje de actividad diurna y nocturna. Se observan claramente ritmos diarios sincronizados al ciclo LD. La barra blanca y negra representa el ciclo LD.

Las ratas TFD (forzadas a trabajar durante su fase de descanso) exhibieron a lo largo de las semanas de trabajo un progresivo decremento en su actividad nocturna como se observa en el actograma (Fig.19) y en los perfiles de actividad obtenidos para los días de trabajo y sus correspondientes fines de semana. Después de la cuarta semana de trabajo, durante el fin de semana la actividad nocturna representó una proporción de 54,5% de la actividad total diaria mientras que la actividad diurna había aumentado a 45,5%, sin observarse un ritmo diurno significativo (Fig.19).

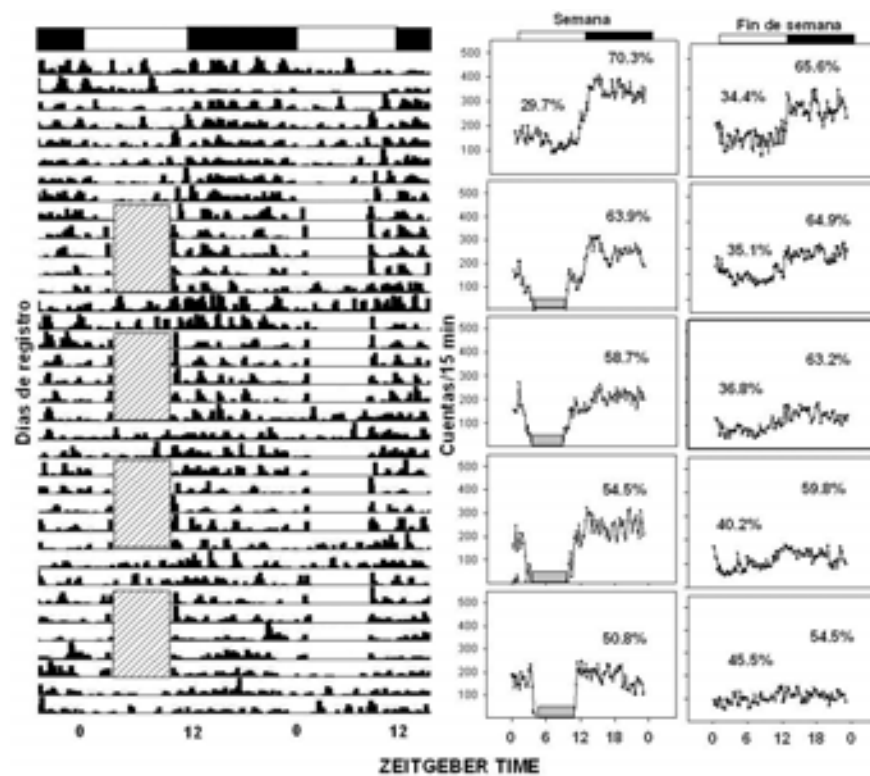


Figura 19. Actograma representativo en doble representación de ratas TFD (Izquierda). Los primeros 9 días corresponden a la línea base, seguida de 4 semanas bajo condiciones de trabajo. Del lado derecho se presenta el promedio de actividad para la línea base (Parte superior) seguida de cada semana de trabajo (numero 1-4) y los fines de semana (a la derecha). Las ratas TFD (n=16) exhiben a lo largo de las semanas un progresivo decremento de su actividad nocturna. El tiempo en la rueda de actividad, esta representado por los cuadros con líneas diagonales. Más indicaciones en Fig.18

Las ratas TFA (trabajaron durante su fase de actividad), mantuvieron un patrón temporal de actividad similar a su línea base y su actograma y promedio de actividad mostraron patrones similares al grupo control (Fig.20). Durante los días de trabajo, la actividad diurna mantuvo proporciones similares a las que se observaron en la línea base (20-25%) y durante los fines de semana, las ratas exhibieron una robusta ritmicidad con una alta proporción de actividad nocturna (Fig.20).

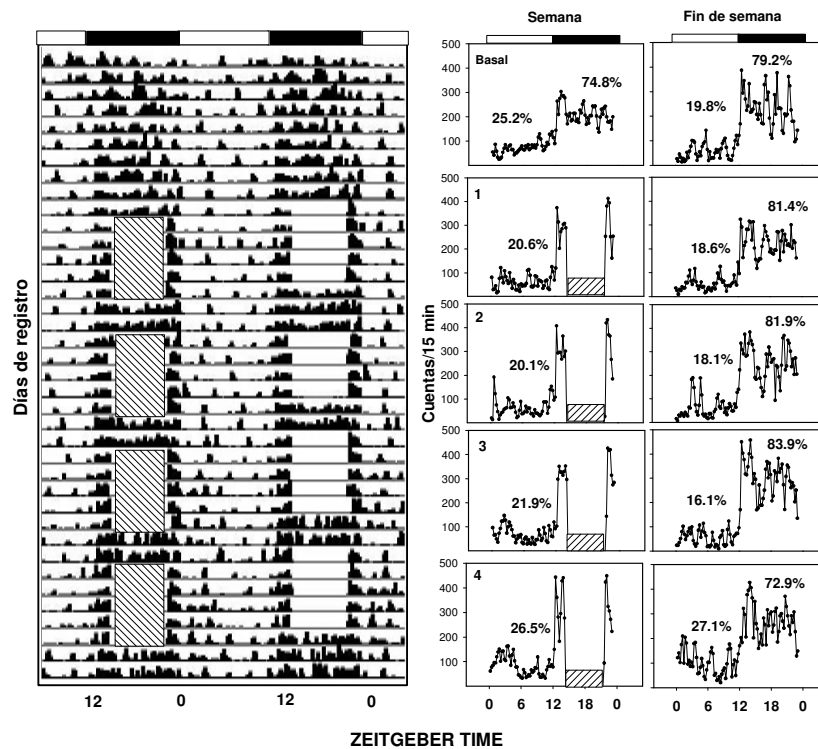


Figura 20. Actograma representativo en doble representación de ratas TFA (Izquierda). A la derecha se presenta el promedio de actividad para la línea base (Parte superior) seguida de cada semana de trabajo (numero 1-4) y los fines de semana correspondientes (a la derecha). Las ratas (n=12) mantuvieron similares proporciones de actividad diaria a las observadas en la línea base y las semanas de trabajo (1-4). Durante los fines de semana las ratas exhibieron una robusta ritmicidad con una alta proporción de actividad nocturna. El tiempo en la rueda de actividad, está representado por los cuadros con líneas diagonales. Más indicaciones en Fig. 18.

INGESTIÓN DE ALIMENTO Y PESO CORPORAL.

Durante la línea base los tres grupos mostraron una patrón similar diario en el consumo de alimento, caracterizado por una proporción baja en el consumo de alimento durante la fase luz (alrededor de 20%) y una proporción más alta de ingestión de alimento durante la fase oscura que osciló entre 79-87 % . Las ratas control mantuvieron esta proporción a lo largo de las 4 semanas (Fig.21 arriba).

Interesantemente, desde la primera semana de trabajo el grupo TFD disminuyó su consumo nocturno de alimento y a lo largo de las 4 semanas de trabajo aumentó progresivamente su consumo diurno mientras trabajaban en la rueda de actividad. Para la cuarta semana de trabajo, las ratas TFD habían invertido sus patrones de alimentación y ahora comían predominantemente durante sus horas "de trabajo" en la fase de luz (Fig.21 centro). En contraste, las ratas TFA mantuvieron su patrón nocturno de alimentación (durante sus horas "de trabajo") y la proporción en el consumo de alimento fue semejante al observado en el grupo control (Fig.21 abajo).

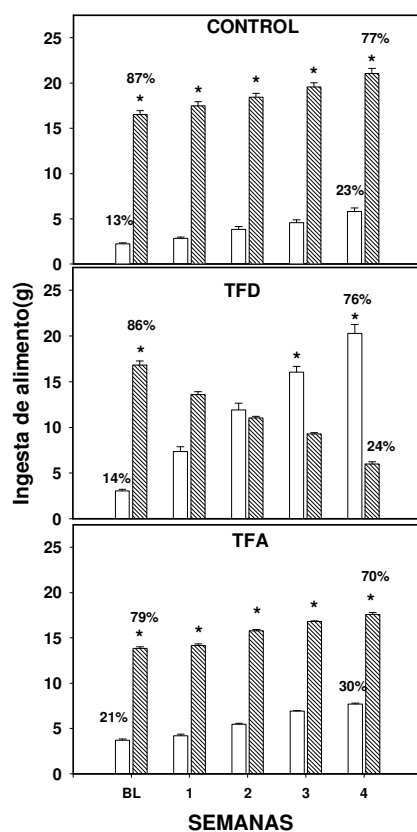


Figura 21. Promedio de la ingesta de alimento de ratas control, TFD y TFA durante el día (Barras blancas) y durante la noche (barras rayadas). Durante la línea base (BL) los tres grupos mostraron un patrón de consumo similar, caracterizado por un bajo consumo durante el día y alto consumo durante la noche. Esta proporción fue progresivamente revertida a lo largo de las 4 semanas de trabajo para el grupo TFD. Asteriscos indican una diferencia estadística entre los valores del día y la noche. ($P < 0.05$).

La ingestión de alimento total por día fue semejante en todos los grupos, sin embargo las ratas sometidas a la actividad forzada durante el día ganaron más peso que los controles y que el grupo de TFA. Este efecto fue estadísticamente significativo a partir de la 3^a y 4^a semana de "trabajo" (Ver tabla 2). La actividad igualmente forzada durante la noche tuvo como resultado una disminución en la ganancia de peso en el grupo TFA. Al final del estudio los controles habían aumentado su peso en 124.40 ± 7.74 g, las ratas TFD en 142.90 ± 5.36 g y las TFA en 97 ± 1.3 g, que representó +7% para el grupo TFD y -10% para el grupo TFA comparados con el grupo control. El ANOVA indicó una diferencia significativa entre grupos ($F_{(2,29)} = 12.41$; $p < 0.0001$) y la prueba post hoc indicó que el grupo TFA fue significativamente diferente del grupo control y TFD ($P < 0.03$).

TABLA 2. Promedio de peso corporal ganado por semana, para las ratas mantenidas sin interrumpir (control), o las expuestas a la actividad forzada por 8 horas diarias.

	Basal	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Ganancia de peso
CONTROL	198 ± 2.2	228 ± 2.1	256 ± 1.1	289 ± 1.3	320 ± 3.1	124 ± 7.7
TFD	196 ± 2.6	232 ± 3.2	251 ± 3.6	299 ± 1.6 ⁺⁺	340 ± 2.7 ⁺⁺	142 ± 5.3
TFA	193 ± 1.4	220 ± 1.1	248 ± 2.1	277 ± 1.5 [*]	290 ± 2.6 [*]	97 ± 1.3

* Indica diferencias estadística significativas de los grupos TFD y TFA con el grupo Control; + indica diferencias significativas entre el grupo TFD y el grupo TFA.

RITMOS METABÓLICOS Y HORMONALES

Para determinar los ritmos de glucosa, TAG, y corticosterona, dos series adicionales de ratas (el grupo control n=10; TFD n=10 y TFA n=8) fueron expuestas al mismo protocolo de actividad forzada y en la semana 5 de trabajo, se colectaron las muestras de sangre a través de la vena yugular con una cánula cada 3 hrs. hasta completar un ciclo de 24hrs.

Las ratas control y TFA exhibieron un ritmo diario de glucosa con un pico durante la transición de la fase de luz a la fase de oscuridad, mientras que en las ratas TFD no se observó ritmicidad. (Fig.22; A). El ANOVA de dos vías, no indicó diferencia significativa entre grupos ($F_{(2,28)} = 2.62$; $P < N/S$), pero confirmó una diferencia significativa en el tiempo ($F_{(7,196)} = 19.03$; $P < 0.0001$) y para la interacción de ambos factores ($F_{(14,196)} = 8.15$; $P < 0.0001$).

Las ratas control mostraron un ritmo diurno de TAG sérico con un pico en ZT15, 3 horas después de comienzo de actividad. En las ratas TFD la acrofase cambió a la fase de luz, ahora en ZT6, que corresponde a 4 horas después colocar a las ratas en la rueda de actividad (Fig.22; B). En contraste el grupo TFA mostró un ritmo diario de TAG en la fase oscura con un cambio hacia ZT18, que también correspondió a 4 hrs. después del comienzo de la actividad en la rueda. El ANOVA de dos vías no indicó diferencia significativa entre grupos ($F_{(2,15)} = 0,008$, $P < N/S$), pero confirmó una diferencia significativa en el tiempo ($F_{(7,105)} = 3.15$; $P < 0.01$) y en la interacción de ambos factores ($F_{(14,105)} = 3.32$; $P < 0.001$).

El grupo control y los grupos de actividad forzada (TFD y TFA) exhibieron el aumento diario esperado para corticosterona el cual se presenta al inicio de la noche. Además en ambos grupos de ratas trabajadoras, TFD y TFA, se observó un incremento de corticosterona al comienzo de la actividad en la rueda, teniendo como resultado un patrón diario modificado (Fig.22; C,D,E). El ANOVA de dos vías no indicó diferencias significativas entre grupos ($F_{(2,20)} = 1.64$; $P < N/S$), pero confirmó una diferencia significativa en el tiempo ($F_{(7,140)} = 33.50$; $P < 0.0001$) y en la interacción de ambos factores ($F_{(14,140)} = 7.81$; $P < 0.001$). Tal diferencia estadística puede deberse al aumento adicional durante las horas de trabajo (Fig.22; E).

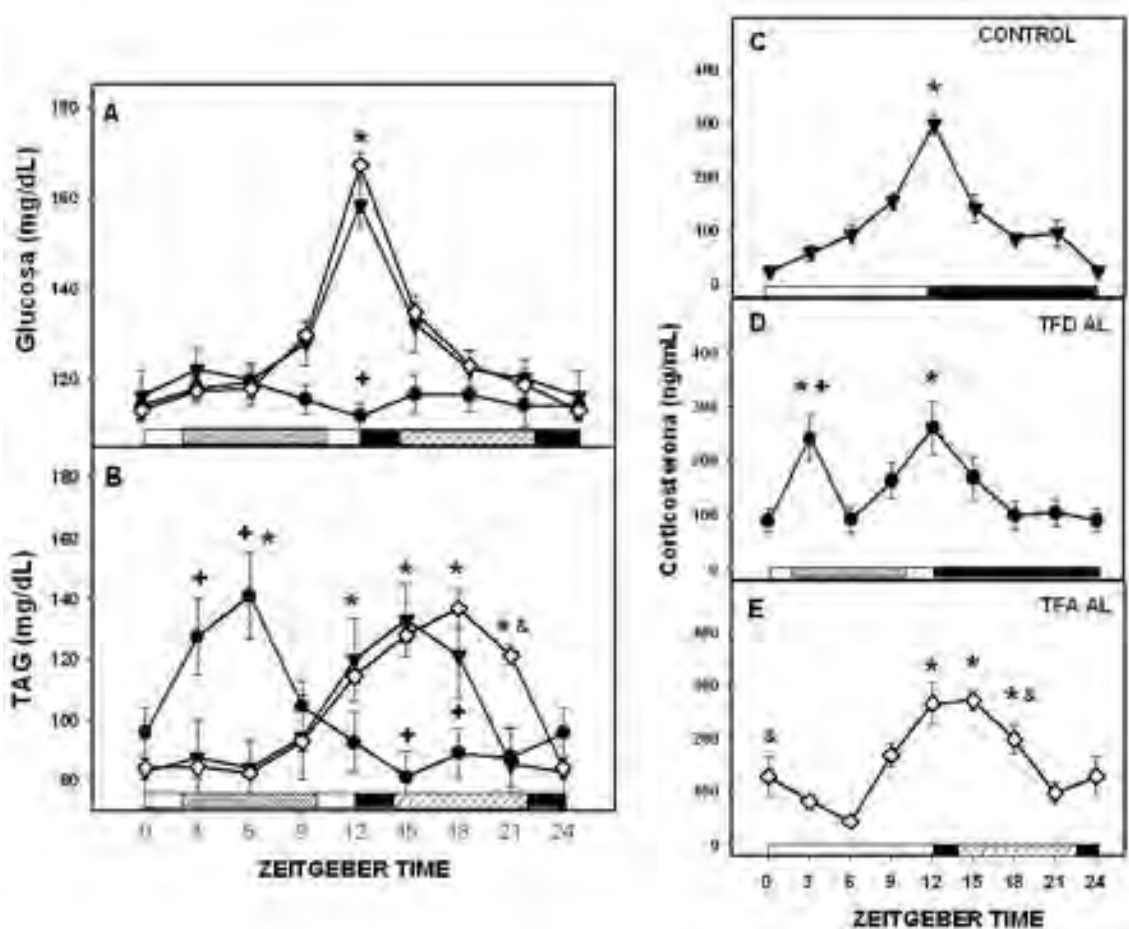


Figura 22. Perfil temporal (medias \pm SEM), para glucosa (A), TAG (B) y Corticosterona (C,D,E). Ritmos metabólicos y hormonales posteriores a 4 semanas de trabajo en ratas control (Triangulos invertidos, $n=10$), ratas TFD (Circulos, $n=10$) y ratas TFA (diamantes, $n=8$). Las barras blancas y negras representan el ciclo LD, las barras con rayas diagonales representan el tiempo de actividad en la rueda. Asteriscos indican diferencia estadística entre los valores altos y bajos del mismo grupo (+) indica diferencias estadísticas entre puntos temporales equivalentes entre los TFD y los otros dos grupos; (&) indican diferencias estadísticas entre puntos temporales equivalentes entre TFA y los otros dos grupos ($P < 0.01$).

INMUNOHISTOQUIMICA PARA PER 1 Y PER 2

Para determinar la expresión temporal de PER1 y PER2 en el NSQ, un grupo diferente de ratas control y TFD (n=32 por grupo), que experimentaron las mismas condiciones descritas arriba, fueron perfundidas al final de la 5th semana de trabajo en uno de 8 puntos temporales para completar un ciclo de 24 hrs. Debido a que no observamos cambios en la conducta y metabolismo en el grupo TFA, este grupo no se incluyó en esta fase.

El grupo control y TFD mostraron un ritmo claro en la expresión de la proteína PER1 y PER2 en el NSQ. El grupo control mostró en ambas proteínas, valores máximos en ZT12 (Fig.23). En el grupo TFD, el pico de PER1 fue observado en ZT9 y el pico de PER2 en ZT12, sin embargo el ANOVA de dos vías no indicó diferencia estadística entre grupos, ni en la interacción de grupo X tiempo; pero indicó un efecto estadístico en el tiempo para ambos grupos ($F_{(7,42)} = 7.23$; $p < 0.001$ para PER1 y $F_{(7,16)} = 57.38$; $p < 0.0001$ para PER2).

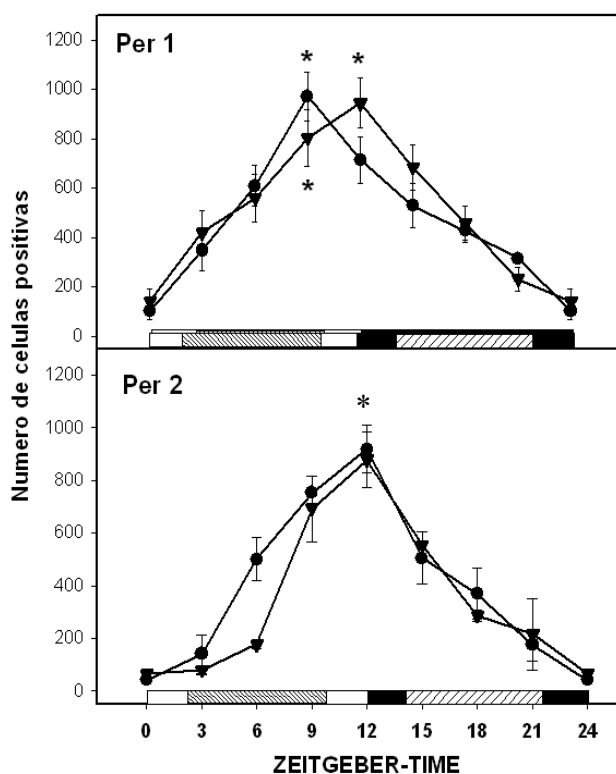


Figura 23. Perfil temporal (medias ± SEM), de células positivas para la proteína PER 1 y PER 2 en el NSQ de ratas control (Triángulos invertidos, n=32 por grupo) y TFD (Círculos negros, n=32 por grupo). El asterisco indica diferencia estadística entre valores altos y los bajos del mismo grupo ($P < 0.05$).

DISCUSION

En esta etapa del estudio proporcionamos evidencia de que la actividad forzada durante las horas de descanso (TFD) altera no sólo la conducta sino también los patrones temporales de consumo de alimento y oscilaciones metabólicas.

En las ratas TFD la ingesta de alimento se desplazó hacia las horas de actividad forzada, y que la actividad nocturna disminuyó progresivamente. Este efecto no se debió al agotamiento físico, ya que este patrón de actividad también se observó durante los fines de semana, cuando las ratas permanecieron inalteradas en sus cajas, y además no fue observado en las ratas obligadas a moverse durante su fase de actividad (TFA). Asociado con la modificación de los patrones de alimentación las ratas TFD presentaron una pérdida de los ritmos de glucosa y los ritmos de triacilglicéridos se observaron invertidos con respecto a su control. En contraste, el aumento de la corticosterona nocturna y los picos de expresión de los genes reloj PER1 y PER2 en el NSQ se mantuvieron sincronizados al ciclo L/O. Estas observaciones indican que en los animales sometidos a un régimen de trabajo durante su período de sueño se induce una desincronización interna en el que la alimentación y las funciones metabólicas se desvinculan del mensaje del reloj biológico

En ratas TFD los patrones de actividad diaria se caracterizan por la reducción en la actividad nocturna, manteniéndose esta reducción durante los fines de semana, cuando quedan inalteradas en su caja. También con otras manipulaciones en las que los animales se ven obligados a estar activos durante el día con una rueda de actividad, se observa una reducción de la actividad nocturna similar a la descrita por nosotros (Mrosovsky, 1996; Hut y col., 1999; Mistlberger, 1994). La persistencia de este efecto durante los fines de semana confirma que los efectores están desacoplados de la transmisión de señales horarias por el SNC y que 2 días de fin de semana no son suficientes para recuperar y reajustar su ritmicidad. Esa perturbación confirma lo que sucede en humanos, ya que los trabajadores nocturnos no pueden reajustar su actividad a las señales horarias del ciclo L/O en tan solo 2 días.

Aunque la ingestión diaria total de alimento fue similar en todos los grupos, las ratas TFD, presentaban un aumento en su peso corporal en mayor proporción que los controles, mientras que las ratas TFA se mantuvieron con un menor peso corporal que

los controles. Un factor que influye en esta propensión puede ser una disminución de la actividad en las ratas TFD, mientras que la actividad aumentó en el grupo TFA. Este factor junto con la alimentación en el momento equivocado, fuera de fase con las señales del NSQ, podría haber fomentado el aumento de peso corporal. Una perturbación similar y propensión para el sobrepeso se ha descrito en los trabajadores nocturnos y rotatorios (Karlsson, y col., 2001, Karlsson, y col. 2005) y alteraciones en los patrones de sueño en humanos también se ha vinculado a una propensión a la obesidad (Pearson, 2006; Gangwisch y col., 2005).

Un estudio reciente informó que las ratas expuestas a cambios regulares del ciclo L/O aumentan su peso corporal (Tsai y col., 2005); sin embargo, a largo plazo, el ejercicio diario en combinación con los cambios del ciclo L/O invierte esta ganancia de peso (Tsai y Tsai, 2007). En el trabajo de Tsai-Tsai, los animales se vieron obligados a realizar ejercicio en una rueda durante 12 h diarias, cubriendo una distancia de 2,2 km. En nuestro estudio, las ratas no estaban sometidas a un ejercicio extenso, la rotación de las ruedas usadas era lenta ocasionando que las ratas sólo caminaran 20,6 m/h con un total de 165 m / 8 h.

Las ratas TFD no mostraron un ritmo diurno de glucosa, además que se observó un cambio en los ritmos de triacilglicéridos (TAG) ahora presentados en el día. El ritmo de glucosa en la sangre depende del NSQ (La Fleur y col., 2001), pero este puede ser alterado por una privación de sueño aguda (Knutsson y col., 2007; Simon y col., 2000; Van Cauter y col., 2007) y modificado por los horarios de alimentación (Escobar y col., 1998). Dado que se observó una alteración en la ritmicidad en las ratas TFD, podemos asumir que el cambio de actividad está asociado con una redistribución o perturbación de los patrones de sueño. Por otro lado el pico de secreción de la hormona de crecimiento está directamente relacionados con la fase del sueño y está bien documentado que la privación aguda de sueño se traduce en una perturbación o incluso pérdida completa de los picos nocturnos de hormona de crecimiento (Brandenberger y Weibel, 2004), lo cual pudo influir en la captación de glucosa por el músculo y la síntesis de proteína (Moller y col., 1989). Otras hormonas como la grelina, leptina, prolactina y corticosterona también pudieron influir en el estado metabólico y la absorción de glucosa por las células (Simon y col. 2000), ya que la privación de sueño suprime la ritmicidad y disminuye los niveles de hormonas pancreáticas (Schmid y col., 2007), de leptina, prolactina y hormona de crecimiento, pero no de corticosterona

(Everson y Crowley, 2004). Por lo tanto, la pérdida en el ritmo de glucosa en las ratas TFD puede tener una causa multifactorial que debe ser estudiado más a fondo.

El patrón invertido de TAG observado en las ratas TFD se debe probablemente a la ingesta diurna de alimentos en la rutina de trabajo. En los tres grupos el pico de TAG se observó 3-4 h después del inicio de actividad, que para los grupos TFD y TFA representa la introducción de las ratas a la rueda, y en el grupo control, representa el inicio de la fase oscura, esto sugiere que para los tres grupos el pico de TAG siguió a la aparición de la conducta de alimentación. Las presentes observaciones encontraron apoyo en estudios de trabajadores humanos, en donde el pico de TAG se observan de manera postprandial 3-4 horas después de una comida (Ribeiro y col. 1998). Además, algunos estudios reportan aumento de las concentraciones de TAG durante los turnos de trabajo, sin embargo este hallazgo no es coherente en todos los estudios (Boggild y Knutsson, 1999).

Los ritmos metabólicos y el aumento de corticosterona nocturna no fueron modificados por la actividad forzada durante la fase de sueño. El ritmo diario de corticosterona depende del NSQ (Buijs y col., 2003) sin embargo con horarios restringido de alimento, las ratas muestran un pico de corticosterona que anticipa al tiempo de la comida y restaura la ritmicidad en ratas con lesiones bilaterales del NSQ (Krieger y Herbert, 1978). Los datos reportados aquí indican que, a pesar de la actividad forzada y la alimentación diurna el ritmo de corticosterona permaneció fijo a las señales temporales transmitidas por el NSQ y al ciclo L/O.

Teniendo en cuenta que las ratas comieron principalmente durante sus horas "de trabajo", el aumento de corticosterona observado cuando las ratas fueron introducidas a las ruedas podría estar relacionado a una conducta de anticipación al alimento. El hecho de que niveles altos de corticosterona en este momento no se asocien con un aumento en la glucosa, parecería sorprendente, sin embargo, se sabe que con otros estímulos que elevan la corticosterona tampoco se observa un aumento de la glucosa (Kalsbeek y col. 2004).

Las pautas temporales de las proteínas PER1 y PER2 en ratas TFD confirmaron que la actividad del NSQ permaneció sincronizada con el ciclo L/O, que es la principal señal de sincronización. Similarmente el acceso restringido a una rueda de actividad (Dallmann y Mrosovsky, 2006), la administración de anfetaminas (Masubuchi y col.,

2000) y horarios restringidos de alimento (Hara y col., 2001; Wakamatsu y col 2001) modifica los patrones temporales de la actividad, ritmos metabólicos y periféricos, pero no cambian la ritmicidad del NSQ, que se queda sincronizado al ciclo L/O.

Debido a que el alimento ha mostrado ser una fuerte señal sincronizadora que desacopla a los osciladores periféricos del NSQ (Damiola, y col. 2000., Hara, y col. 2001, Stokkan, y col. 2001), podemos sugerir que el factor principal que promueve la desincronización interna en nuestro modelo del trabajo nocturno es la combinación de la actividad y la alimentación durante la fase de sueño y la resistencia del NSQ a cambiar y que permanece sincronizado al ciclo L/O. Este aspecto se estudió en la etapa 3.

En conclusión, el presente estudio demuestra que la exposición diaria a una rueda de actividad forzada durante la fase de descanso es un buen modelo para estudiar los mecanismos subyacentes a la desincronización interna en trabajadores nocturnos y con trabajo rotatorio. Con este modelo se pudo determinar que la desincronización se da principalmente por una pérdida de acoplamiento entre el NSQ y sus efectores asociados con la conducta y el metabolismo.

ETAPA 2

ANÁLISIS INMUNOCITOQUÍMICO DE NÚCLEOS HIPOTALÁMICOS IMPLICADOS EN EL METABOLISMO Y LA VIGILIA, EN ANIMALES SOMETIDOS A TRABAJO DURANTE SU FASE DE DESCANSO.

En esta etapa, nos propusimos determinar el origen de la desincronización observada en los ritmos metabólicos y conductuales. Para ello nos preguntamos si los núcleos hipotalámicos implicados en el metabolismo como el DMH, PVN, ARQ, PVT y en mantener la vigilia como el HL y PeF están alterados por la actividad forzada durante la fase de descanso, promoviendo la desincronización interna desde un nivel central. Para esto, caracterizamos los ritmos diurnos de la inmunoreactividad de c-Fos como marcador de actividad neuronal y de la proteína PER1 como marcador de ritmicidad.

OBJETIVOS

- Determinar el efecto del trabajo nocturno, utilizando el modelo de actividad forzada, sobre diferentes ritmos de estructuras hipotalámicas.
- Caracterizar el origen de la desincronización interna comparando el ritmo del NSQ con sus efectores hipotalámicos.

HIPOTESIS

- El “trabajo nocturno” en ratas producirá una desincronización en la expresión de c-Fos y PER1 en núcleos hipotalámicos relacionados con el metabolismo y la vigilia
- La actividad forzada durante la fase de descanso, provocara que el NSQ pierda su relación de fase con sus efectores.

MATERIALES Y METODOS

ANIMALES Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Las ratas utilizadas se mantuvieron con las mismas condiciones a las descritas en la pagina 34.

En esta etapa, se utilizaron 2 grupos;

Grupo control: Se mantuvo en registro conductual en el cuarto de registro sin manipulación durante 5 semanas, con alimento y agua *ad libitum*. (C-AL).

Grupo experimental se siguió el protocolo de trabajo durante la fase de descanso (T-AL) idéntico al descrito en la pagina 41. (Fig.17).

INMUNOHISTOQUIMICA PARA PER 1 Y C-FOS

Después de 5 semanas, durante los últimos dos días de trabajo, los animales se perfundieron cada 3 horas (n=5 por punto temporal) para completar un ciclo de 24 horas. Esta manipulación se realizó de manera idéntica a la descrita en la metodología de la etapa 1 (Pagina 42-43).

DOBLEINMUNO PARA C-FOS Y OREXINA A

Una serie de cortes, se incubaron por 72 horas a 4°C con un anticuerpo para la proteína c-FOS hecho en conejo (Alpha Diagnostic International) diluido 1:2500 en SuperMix (0.25 % de gelatina, 0.5 % de triton X-100 en PBS pH 7.6), y un anticuerpo primario para Orexina A hecho en cabra (Santa Cruz biotechnology, USA) diluido 1:2500 en SuperMix.

Después de dos días de incubación las secciones se lavaron 3 veces por 10 minutos en PBS, y posteriormente se incubaron por 2h con un anticuerpo secundario biotinilado 1:200 (Anti-conejo hecho en cabra; Vector laboratorios) en SuperMix. Al finalizar las dos hrs. de incubación se lavaron 3 veces por 10 minutos en PBS y los cortes se incubaron en una solución de avidina-biotina peroxidasa al 0.9% (Vectastain Elite ABC Kit; vector Labs, USA) por 2 horas a 4°C.

Al finalizar la incubación, los cortes se lavaron 3 veces por 10 minutos en PBS y al finalizar el ultimo lavado, se visualizaron con diaminobenzidina (0.5 mg/ml, en buffer de trizma a pH 7.2), con 100 µl de níquel (50 mg en 5ml de H₂O), 100 µl de cobalto (50 mg en 5ml de H₂O) y peroxido de hidrógeno al 30% (35 µl/100 ml), dando un color negro azulado.

Al finalizar el revelado de la proteína c-Fos se inició el revelado para orexinas. Las secciones se lavaron 3 veces por 10 minutos en PBS y se incubaron por 2 horas con un anticuerpo secundario biotinilado 1:200 (Anti-cabra hecho en conejo; Vector laboratorios) en SuperMix. Al finalizar las dos horas de incubación se lavaron 3 veces

por 10 minutos en PBS y los cortes se incubaron por segunda vez en una solución de avidina-biotina peroxidasa al 0.9% (Vectastain Elite ABC Kit; vector Labs, USA) por 2 horas a 4°C. Posteriormente se revelaron con diaminobenzidina (0.5 mg/ml, en buffer de trizma 7.2) y peróxido de hidrógeno al 30% (35 µl/100 ml), que dio un color citoplásmico café.

Al finalizar el segundo revelado, se lavaron los cortes 3 veces por 5 minutos y cada corte fue montado en láminas (porta-objetos) gelatinizadas y deshidratadas en una serie de alcoholes y aclaradas con xilol para posteriormente ser cubiertas con cubreobjetos y Permount (Fisher Chemicals).

CONTEO CELULAR

Para cuantificar la expresión de c-FOS y PER1 en el ARQ, NSQ, PVN, PVT, DMH, y exclusivamente c_Fos en el HL y PeF. Se escogieron 3 secciones representativas de cada núcleo de acuerdo con el atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (1998) como se indica en la tabla 3.

TABLA 3. Niveles en el plano antero-posterior de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson (1998), de los que se seleccionaron las secciones para analizar la expresión de la proteína c-Fos y Per1.

ESTRUCTURA	Secc. anterior	Secc. medial	Secc.posterior
ARQ	2.12	2.56	3.14
DMH	2.8	3.14	3.30
HL y PeF	2.8	3.14	3.40
NSQ	0.92	1.20	1.40
PVN	1.6	1.88	2.12
PVT	1.80	1.88	2.12

Las imágenes fueron examinadas bajo un microscopio de luz (Nikon Eclipse E600; Nikon, Tokio, Japón) y capturadas a una ampliación 20X y se utilizó un sistema computarizado de análisis de imágenes para digitalizar imágenes y evaluar el número de células inmunopositivas a cada anticuerpo (Image-Pro, Plus. 5.1)..

Los núcleos inmunoreactivos fueron contados bilateralmente por un observador que fue ciego a las condiciones experimentales. Para evitar el número de falsos positivos, se determinó en una región cercana que carece de PER1 o c-FOS la densidad óptica del fondo. Las células marcadas que alcanzaron o superaron dos veces la densidad óptica del fondo fueron contadas, mientras las células por debajo de este umbral fueron descartadas. La media de los valores se representa con curvas temporales y se compararon con un ANOVA de dos vías para los factores grupo y tiempo.

RESULTADOS

EXPRESIÓN DE C-FOS

En las ratas Control, el ARQ, el LH y el PeF presentaron su acrofase justo en el momento de apagarse la luz que corresponde a ZT12 (Fig. 24); el DMH, y el PVN no mostraron un ritmo diurno en la inmunoreactividad de la proteína c-Fos (Fig. 25).

Además, el ritmo diurno de la proteína c-Fos en el NSQ mostró su acrofase a la mitad del ciclo L/O en ZT6. (Fig. 26)

En los núcleos del hipotálamo; ARQ, PeF y HL de los animales sometidos a actividad durante su etapa de descanso (T-AL), mostraron un adelanto de fase en la expresión de c-Fos en comparación con los animales control (Fig.24).

El núcleo arqueado ARQ, mostró su acrofase en ZT6, y su nadir en ZT18, nótese que el valor máximo ahora se encontró asociado al tiempo en que los animales estaban activos y comiendo en la rueda de actividad. El ANOVA de dos vías, indicó una diferencia en el tiempo ($F(3,8)=0.64$; $P<0.04$) pero no confirmó una diferencia entre grupos ($F(1,8)=0.18$; N/S), ni en la interacción del grupo con el tiempo. ($F(3,8)=2.63$; N/S).

El HL en el grupo T-AL mostró mayor amplitud que los controles (Fig. 24), mostrando valores altos en ZT6 y ZT12 ($P<0.001$), y valores bajos similares al control en ZT0 y ZT18. El ANOVA de dos vías, confirmó una diferencia entre grupos ($F(1,8)=6.85$; $P<0.03$), además de una diferencia en el tiempo ($F(3,8)=6.99$; $P<0.01$) pero no una diferencia en la interacción de ambos factores. ($F(3,8)=3.13$; N/S).

El PeF también mostró valores elevados en ZT6 y ZT12 ($P<0.001$) y valores bajos en ZT0. El ANOVA de dos vías, no indicó una diferencia entre grupos ($F(1,8)=0.18$; N/S), pero si una diferencia en el tiempo ($F(3,8)=3.73$; $P<0.04$) y no diferencia en la interacción de ambos factores. ($F(3,8)=2.99$; N/S).

El DMH, mostró un ritmo en la inmunoreactividad de c-Fos el cual fue impuesto por la manipulación ejercida al grupo T-AL ya que no se observa en el control. El ritmo del PVN no se modificó con la manipulación de los animales ya que no se observa un ritmo, al igual que los animales control (Fig.25). Por otro lado el ritmo de la proteína c-Fos en el NSQ no se vió alterado, pero se observó un efecto en la amplitud del ritmo ya que hubo una reducción en la actividad del NSQ (Fig.26).

El DMH que en condiciones *ad libitum* no mostró un ritmo claro durante las 24 hrs. (Figura. 25), en las ratas T-AL mostró un patrón rítmico claro, presentando su acrofase en ZT6 y su nadir en ZT18, nótese que el valor máximo se encuentra asociado al tiempo en que los animales están despiertos y comiendo en la rueda de actividad. El ANOVA de dos vías confirmó una diferencia significativa, entre grupos ($F(1,8)=6.40$; $P<0.03$) pero no en la interacción del trabajo con el tiempo. ($F(3,8)=6.91$; $p<0.03$).

C-FOS

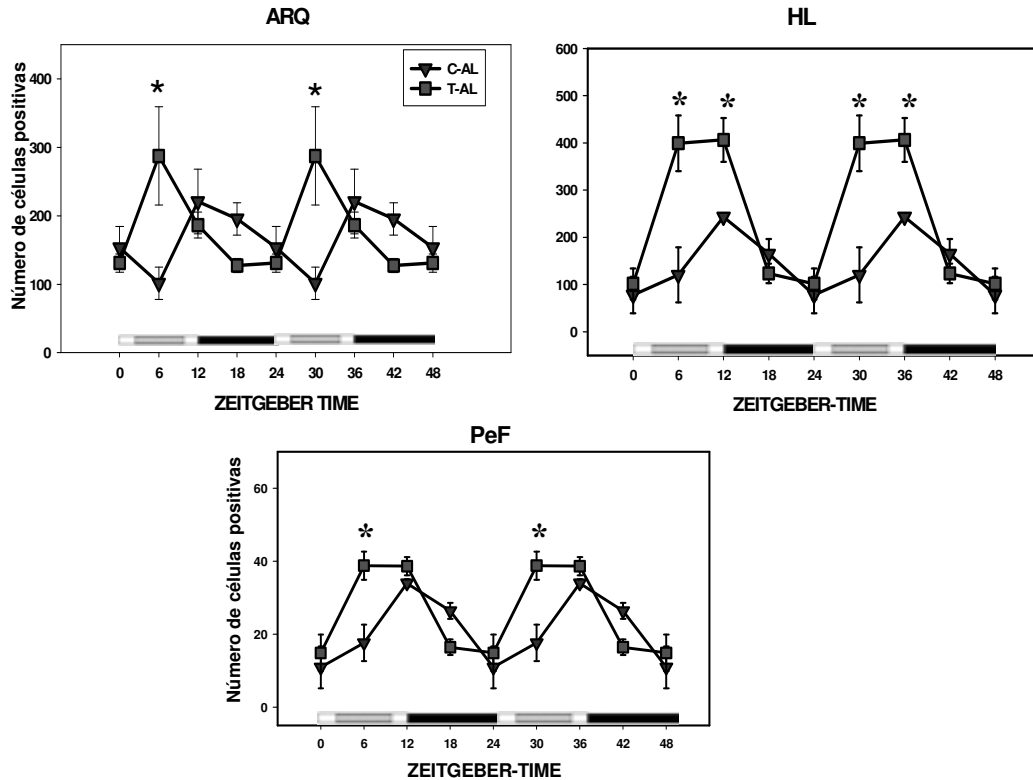


Figura 24. Patrones temporales para células Fos-IR en estructuras hipotalámicas de ratas control (C-AL) y de ratas sometidas a trabajo durante su etapa de descanso (T-AL). Un adelanto de fase asociado al tiempo de trabajo, se puede observar en todas las estructuras en las ratas T-AL. Las barras blancas y negras representan el ciclo luz/oscuridad y la barra gris dentro de la blanca, la hora en que las ratas trabajaban en la rueda. Los * representan una diferencia significativa entre el grupo C-AL y T-AL obtenida con la prueba de Tukey post hoc ($P < 0.03$). Arq; núcleo arqueado, HL; hipotálamo lateral y PeF; núcleo perifornical.

De igual manera, el PVN no mostró cambios significativos en las ratas T-AL en todos los puntos temporales analizados, aunque existe una clara tendencia de ritmicidad con su acrofase asociada al inicio de la actividad en la rueda. (Fig.25). El ANOVA de dos vías no mostró una diferencia significativa, ni entre grupos ($F(1,8)=0.45$; N/S) ni en la interacción del trabajo con el tiempo. ($F(3,8)=0.30$; N/S).

C-FOS

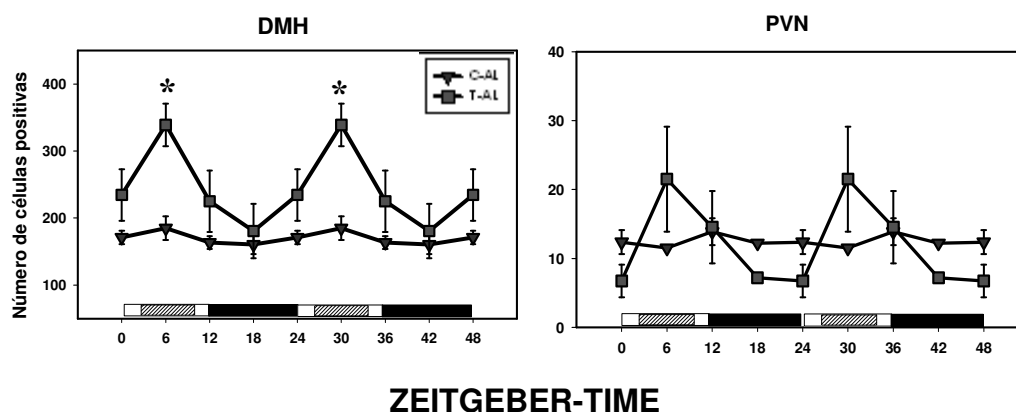


Figura 25. Patrones temporales para células Fos-IR en estructuras hipotalámicas en ratas control (C-AL) y en ratas sometidas a trabajo durante su etapa de descanso (T-AL). Se puede observar un ritmo claro en la actividad de ambos núcleos hipotalámicas, el cual es inducido por el trabajo nocturno. Las barras blancas y negras representan el ciclo luz/oscuridad y la barra gris dentro de la blanca la hora en que las ratas trabajaban en la rueda. Los * representan una diferencia significativa entre el grupo C-AL y T-AL obtenida con la prueba de Tukey post hoc ($P < 0.03$). DMH; núcleo dorsomedial del hipotálamo, PVN; núcleo paraventricular del hipotálamo.

En el NSQ no se observaron diferencias significativas en los tiempos de la acrofase y valle en ambos grupos, mostrando un ritmo claro con su pico en ZT6 y valle en ZT18. Sin embargo, el número de células inmunoreactivas de c-Fos en el NSQ del grupo T-AL disminuyó significativamente en todos los puntos temporales, lo que nos sugiere que el NSQ se encuentra tónicamente inhibido en el grupo T-AL (Fig 26). El ANOVA de dos vías mostró una diferencia significativa, entre grupos ($F(1,8)=16.94$; $P < 0.003$) pero no en el tiempo ($F(3,8)=3.53$; N/S), ni en la interacción del trabajo con el tiempo ($F(3,8)=0.04$; N/S).

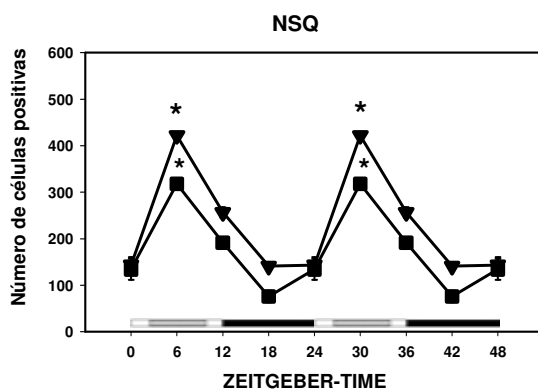


Figura 26. Patrones temporales para células Fos-IR en el núcleo supraquiasmático de ratas control (C-AL) y en ratas sometidas a trabajo durante su etapa de descanso (T-AL). El grupo T-AL muestra una ligera inhibición en su actividad. Los * representan una diferencia significativa entre el grupo C-AL y T-AL; post hoc ($P < 0.03$). Mas detalles ver Fig.25.

EXPRESIÓN DE PER1

En las ratas control, el ritmo diurno de PER 1 se observó en varios núcleos hipotalámico; NSQ, DMH, ARQ, PVN y PVT, sin embargo en el HL y en el PeF no se observó la expresión de Per1 a ninguna hora.

Como ya se ha descrito, el NSQ mostró su acrofase justo en el momento de apagarse la luz, lo cual equivale a ZT12. El grupo T-AL no modificó este ritmo presentándose idéntico al grupo control (Fig.27). El ANOVA de dos vías no indicó diferencias significativas entre grupos ($F(1,13)= 1.28$; N/S), pero si en el tiempo ($F(3,13)=33.83$; $P<0.001$), pero no en la interacción ambos factores ($F(3,13)=1.07$; N/S).

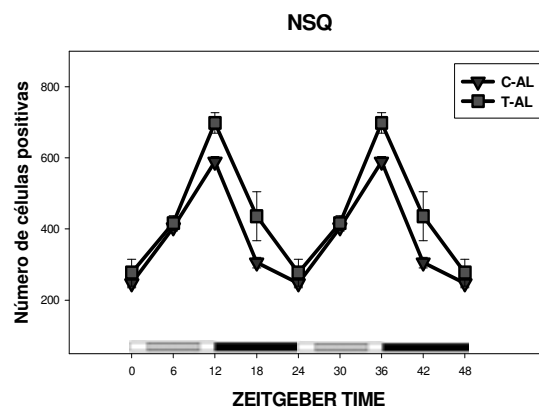


Figura 27. Patrones temporales para células inmuno positivas a PER1 en el núcleo supraquiasmático de ratas control (CAL) y en ratas sometidas a trabajo durante su etapa de descanso (T-AL). No existen diferencias ni en el ritmo ni en la amplitud entre ambos grupos. Mas detalles ver Fig.23.

En el grupo control el ARQ, el PVN y el PVT presentaron su acrofase justo en el momento de encenderse la luz; mientras el DMH no mostró un ritmo diurno en la inmunoreactividad de la proteína PER1. (Fig.28).

El trabajo durante la fase de descanso ocasionó cambios de fase en el ARQ y el PVT, presentando ahora sus picos de actividad durante las horas de trabajo que es cuando las ratas estaban activas y alimentándose. Para el ARQ el ANOVA de dos vías indicó diferencias significativas entre grupos ($F(1,8)=12.8$; $P<0.01$), un efecto significativo en el tiempo ($F(3,8)=2.27$; $P<0.01$) pero no en la interacción de ambos factores. ($F(3,8)=0.89$; N/S). Para el PVT el análisis estadístico indicó una diferencia significativa entre grupos ($F(1,12)=6.44$; $P<0.02$), pero no en el tiempo ($F(3,12)=0.92$; N/S) ni en la interacción del grupo por tiempo ($F(3,12)=0.39$; N/S).

PER 1

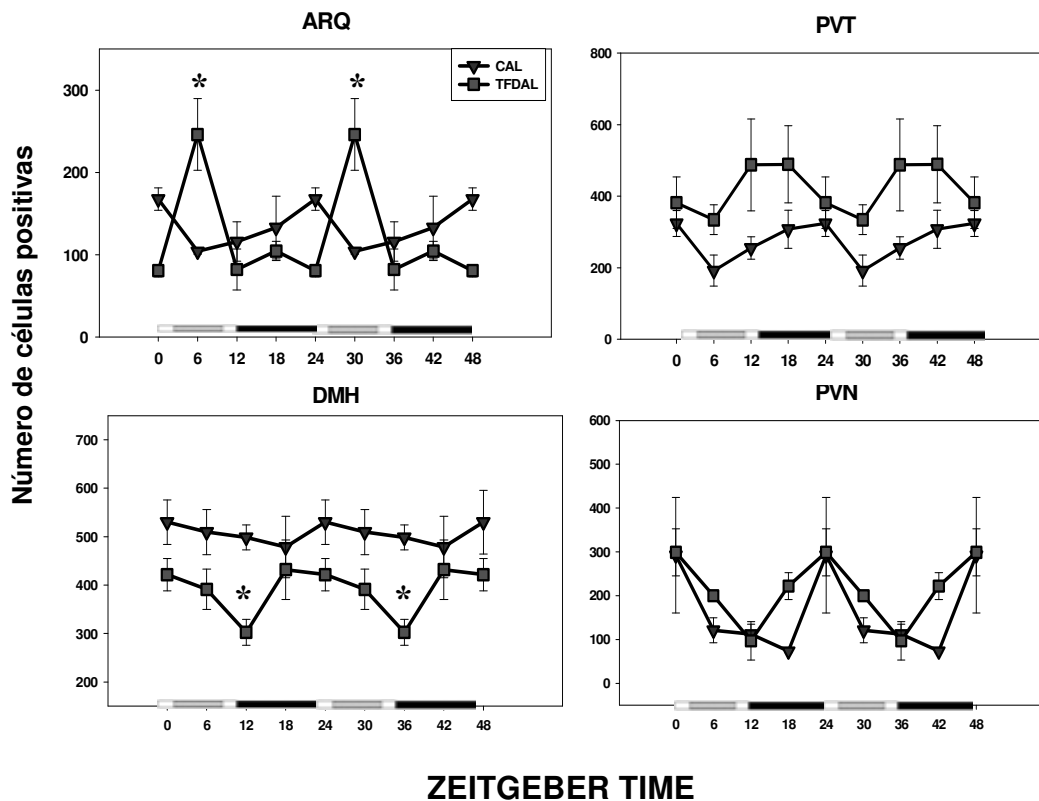


Figura 28. Patrones temporales de células inmunopositivas a PER 1 en estructuras hipotalámicas de ratas control (C-AL) y de ratas sometidas a trabajo durante su etapa de descanso (T-AL). Un adelanto de fase asociado al tiempo de trabajo, se puede observar en el ARQ y el PVT. El ritmo de PER1 en el DMH es inducido por el trabajo nocturno y el PVN es la única estructura que no muestra una modificación para PER 1. Las barras blancas y negras representan el ciclo luz/oscuridad y la barra gris dentro de la blanca, la hora en que las ratas trabajaban en la rueda. Los * representan una diferencia significativa entre el grupo C-AL y T-AL obtenida con la prueba de Tukey post hoc ($P < 0.03$). Arq; núcleo arqueado, PVT; núcleo paraventricular talámico, DMH; Núcleo dorsomedial del hipotálamo y PVN; núcleo paraventricular del hipotálamo.

En el DMH no se observó una expresión rítmica de la proteína PER1 en el grupo control (Fig.28), sin embargo el grupo T-AL indujo el ritmo de la proteína PER1 con un pico en ZT18 (8h después de que se regresan a sus cajas), aunque con valores más bajos que los mostrados a lo largo del día por el control. El análisis estadístico indicó diferencia significativa entre grupos ($F(1,10)=2.56$; $P < 0.0001$), pero no un efecto significativo en el tiempo ($F(3,10)=0.18$; N/S) ni en la interacción de ambos factores ($F(3,10)=0.16$; N/S).

Finalmente, en el PVN el grupo control mostró un patrón diurno en la expresión de la proteína PER1, con un pico en ZT0, el cual no se modificó con la rutina de trabajo (Fig.28). El análisis estadístico no indicó diferencias significativas entre grupos ($F(1,9)=1.12$; N/S), ni un efecto significativo en el tiempo ($F(3,9)=2.57$; N/S) ni en la interacción del grupo y tiempo ($F(3,9)=0.52$; N/S).

DISCUSIÓN

En esta etapa del estudio proporcionamos evidencia de que la actividad forzada y el consumo de alimento durante las horas de descanso alteran no sólo la conducta sino también los patrones rítmicos y de activación neuronal de varios núcleos hipotalámicos involucrados en el metabolismo y la conducta. Esto pudiera ser la causa probable de la desincronización interna bajo el régimen de trabajo nocturno.

En las ratas T-AL los núcleos hipotalámicos relacionados con la regulación metabólica como ARQ, DMH y PVN, así como aquellos asociados con el alertamiento e inicio de la actividad como el HL y el área PeF, mostraron un adelanto de fase, asociado al nuevo horario de actividad y alimentación. Por el contrario la actividad del NSQ disminuyó en todos los puntos temporales.

Patrones similares se observan en el ritmo de la proteína reloj PER 1 en los mismos núcleos hipotalámicos relacionados con la regulación metabólica y alertamiento, éstos mostraron un adelanto de fase asociado al inicio de la actividad para los núcleos ARQ, PVT, DMH y PVN, sin embargo el NSQ no mostró cambio en su ritmicidad. Lo que nos confirma una desincronización interna ya que los osciladores periféricos perdieron su relación de fase con el reloj biológico.

En la actualidad se conoce que una serie de estructuras en el sistema nervioso central (SNC), así como órganos en la periferia tienen la capacidad de oscilar tanto a nivel central como periférico y que estos osciladores se encuentran organizados de una manera jerárquica, en donde un reloj central mantiene al 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 o NSQ, que al transmitir a todo el organismo su señal de tiempo mantiene sincronizadas todas las funciones y la conducta para que oscilen con un orden de acuerdo a las fluctuaciones externas del día y la noche. Con ello

se mantiene un “orden temporal interno” que permite el buen funcionamiento del cuerpo.

El ser humano es esencialmente diurno, por lo tanto está preferentemente activo durante el día, tomando las horas de descanso durante la noche. Por lo tanto las señales temporales que sincronizan al reloj biológico del ser humano son muy variadas. Las más evidentes son claves periódicas (de 24 horas) del ambiente, de las cuales la principal es el ciclo de día/noche; sin embargo, también influyen sobre el reloj como sincronizadores, señales artificiales como la organización de horarios de trabajo, el esparcimiento, y otros compromisos sociales; así como la propia actividad física y cognitiva del individuo. Los horarios de comidas también son fuertes claves de tiempo para los osciladores cerebrales y periféricos debido a los cambios metabólicos producidas por la comida y necesarios para la síntesis de los neurotransmisores involucrados en la transmisión sináptica (Winget y col. 1984).

Al existir la presencia de una señal *no fótica fuerte* como el alimento, se sugiere la existencia de fuertes mecanismos de desacoplamiento interno del reloj hacia la hora en que se presenta el estímulo. Se ha visto que a nivel conductual, la exposición a la luz genera un cambio de fase en la actividad del animal, adelantándose la actividad hacia la hora en que se presenta el alimento. (Ángeles-Castellanos y col. 2007, 2008, Segall y col. 2008, Hara y col. 2001,). Esto se observa claramente en aquellos núcleos involucrados en la regulación metabólica como el ARQ, DMH, HL, PVN.

Este estudio confirma que el alimento provocar un avance de fase en varios osciladores periféricos asociados con el metabolismo. Varios estudios han encontrado un avance de fase en núcleos asociados al metabolismo y reforzamiento siempre asociado a la hora de alimentación (Angeles-castellanos y col. 2007, 2008, Segall y col. 2008, Hara y col. 2001, Stokkan y col. 2001, Stephan y col. 2001).

La diferencia es que solo les permiten el acceso al alimento por 2-3 horas en las cuales las ratas obtienen todo el alimento necesario.(Hara y col. 2001, Angeles-Castellanos y col. 2007), o algunos protocolos donde el alimento es hipocalórico (Challet y col. . 1998, Mendoza y col. 2007). Estas ratas bajo el protocolo de restricción en el acceso al alimento muestran una conducta anticipatoria, conocida como anticipación al alimento. (AA). Sin embargo las ratas T-AL muestran un cambio de fase en los núcleos

hipotalámicos asociados con el alimento, aunque el alimento está ad libitum (Salgado-Delgado y col. 2008).

El avance de fase observado en nuestros datos también puede estar relacionado con la actividad locomotora, ya que se sabe que los estímulos no luminosos como la actividad y el alimento, 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 (Mrosovsky, 1995,1996). Por otro lado, a nivel molecular los estímulos no-fóticos producen una supresión de genes como *per*, a la hora en la cual los niveles de dicho gene son máximos, que como consecuencia puede traer un avance de fase de algunas estructuras, como las aquí observadas en ARQ y PVT, aunque el ritmo del reloj no se modifica (Maywood y col. 1999; Horikawa y 2000; Maywood y Mrosovsky, 2002).

Los mecanismos neuroanatómicos que subyacen a la sincronización no luminosa, no son del todo claros. Sin embargo, existe evidencia de que son mediados por las proyecciones que llegan directamente al NSQ, provenientes tanto de la hojuela intergeniculada lateral del talamo (HIL), a través del tracto genículo-hipotalámico, y de los núcleos del rafe y del PVT utilizando el glutamato como neurotransmisor (Meyer-Bernstein y Morin 1996; Mrosovsky 1996). Por ejemplo, las lesiones ya sea del 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).

El ritmo en la actividad del reloj medido con la proteína c-Fos, se observó ligeramente inhibido. Esto puede ser debido a que 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 (Aschoff y col. 1981) y esto es necesario para inhibir la actividad de la rata y que pueda descansar. En el caso de las ratas T-AL, la actividad forzada provocaría una inhibición en la actividad del NSQ, lo que a nivel conductual generaría un cambio de fase en la actividad del animal (Meijer 2001). Aunque el ritmo del NSQ no se ve afectado ya que el ciclo L/O no se modifica.

La evidencia aquí mostrada de que el alimento durante la noche puede fortalecer el ritmo de glucosa, así como evitar el cambio del ritmo de triacilglicéridos y temperatura sugiere que se deben considerar los horarios de alimentación para diseñar una estrategia

que permita restablecer la ritmicidad en los individuos sometidos a trabajo nocturno o jet lag.

Por lo tanto nuestros datos pudieran sugerir que la combinación de dos estímulos no fóticos como la actividad y el nuevo horario de alimentación sean señales fuertes para algunos osciladores periféricos que participan directa o indirectamente en el cambio de fase del ritmo y actividad neuronal, manteniéndose sincronizado el reloj con el ciclo L/O. Algunos trabajos apoyan esta hipótesis (Amir y col. 1999a; 1999b, Governale y col. 2001, Granados-Fuentes y col. 2004).

En conclusión, nuestros datos proporcionan otra pieza de información acerca de las estructuras involucradas o modificadas por el trabajo nocturno y el alimento. Por lo que sería relevante explorar con el presente modelo experimental el efecto único del alimento sobre los núcleos hipotalámicos y de la actividad durante su etapa de descanso.

ETAPA 3

EL ALIMENTO EN LA ETAPA DE DESCANSO, COMO POSIBLE CAUSA DE LA DESINCRONIZACION INTERNA

En el tercer experimento, exploramos la influencia que tiene el alimento durante el trabajo como posible causa de la desincronización interna, observada en los animales sometidos al protocolo de trabajo nocturno.

OBJETIVOS

- Determinar el efecto de horarios restringidos de alimento sobre los ritmos circadianos metabólicos y conductuales en ratas sometidas al protocolo de trabajo nocturno.

HIPOTESIS

- La desincronización interna que se observa en los trabajadores nocturnos se debe a la alimentación durante el trabajo.
- El alimento durante la fase de reposo desacopla los osciladores periféricos del reloj biológico principal.
- El alimento durante la fase de reposo promueve el aumento de peso en el trabajador nocturno.
- Los horarios de alimento restringidos a la fase nocturna serán una buena estrategia para evitar el desacoplamiento de los osciladores periféricos en el modelo trabajo nocturno en ratas.

MATERIALES Y METODOS

ANIMALES Y GRUPOS

Las ratas utilizadas se mantuvieron con las mismas condiciones a las descritas en la pagina 38.

Para poder determinar la influencia del alimento en el trabajo nocturno, se dividieron las ratas en 2 grupos (control y experimental); tanto los controles como los grupos de

trabajo se dividieron a su vez en 3 grupos según las condiciones de alimentación (Tabla 4).

GRUPO	CONDICIONES DE ALIMENTACION	NOMBRE
Control	Sin trabajo + Ad libitum	C-AL
	Sin trabajo + Comen de día	C-CD
	Sin trabajo + Comen de noche	C-CN
Experimental	Trabajo + Ad libitum	T-AL
	Trabajo + Comen de día	T-CD
	Trabajo + Comen de Noche	T-CN

Los grupos control: Se mantuvieron en el cuarto de registro de conducta sin manipulación durante 5 semanas y sometidos a diferentes condiciones de alimentación. (Tabla 4):

C-AL: *alimento ad libitum*

C-CD: alimento solamente durante el día

C-CN: alimento solamente durante la noche

Los grupos experimentales: Los sujetos se dejaron en registro de línea base por una semana y se les sometió a la rutina de trabajo en la rueda de actividad forzada por 5 semanas con diferentes condiciones de alimentación (tabla 4):

T-AL: acceso *ad libitum* al alimento

T-CD: alimento únicamente durante el día

T-CN: alimento únicamente durante la noche.

PROTOCOLO DE TRABAJO

Los sujetos se dejaron en registro de línea base por una semana, en la segunda semana se inició la fase de trabajo. Para ello, se sacó a cada rata de su caja de registro y se colocó en una rueda de actividad cerrada y conectada a un motor que genera oscilaciones lentas y constantes (1 revolución / 2.5 minutos) obligándolas a moverse

(trabajar) 8 horas diarias durante la fase de luz (etapa de descanso) de 9 a.m. a 5 p.m. (ZT2. ZT10) de lunes a viernes. Este procedimiento se siguió por 4-5 semanas. Después de las 8 horas de trabajo los animales se regresaban a su caja de registro hasta el siguiente día.

Los fines de semana se mantuvieron sin manipulación dentro de sus cajas habitación de registro y los tres grupos con alimento ad libitum.

MONITOREO DE PESO CORPORAL E INGESTA DE ALIMENTO

Los animales se pesaron al inicio del estudio y una vez por semana durante la fase de trabajo, (jueves) siempre el mismo día y a la misma hora. El alimento se pesó 1 vez a la semana (viernes) a las 9 de la mañana para medir el consumo de alimento diario total.

LA DETERMINACIÓN DE LOS RITMOS DE METABOLITOS METABÓLICOS

Para obtener el suero, al final de la 4ª semana de trabajo a las ratas se les insertó una cánula en la vena yugular de la misma manera como se describió en la etapa 1. Durante la quinta semana de trabajo se obtuvieron muestras de sangre cada 3 horas para completar un ciclo de 24 horas, siguiendo la misma metodología que en la etapa 1.

La glucosa fue estimada por una muestra de 10- μ l usando un Kit comercial de colorimetría (No. 70478; Hycel de México), en el que se basó la reacción entre la glucosa y *fenol-4-amimofenazona* como cromógeno y fue medido a 500 nm, con un espectrofotómetro (Novaspec II Visible, Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge, England).

Los TAG fueron evaluados con un kit comercial (no. B01-4512-01, SERA-PAK plus, Bayer, Sees, Francia) por cuantificación a *4-aminoantipiridin* a 500 nm, lo que es proporcional al glicerol producido por hidrólisis enzimática de una muestra de 10- μ l.

MONITOREO DE LA TEMPERATURA CORPORAL.

Para determinar la temperatura corporal se utilizó otra serie de ratas que se asignaron a los grupos control y a las tres condiciones de trabajo (n=8 por grupo), con condiciones diferentes de alimentación (C-AL, C-CD, C-CN, T-AL, T-CD y T-CN).

Para monitorear la temperatura se utilizaron sensores colocados en el abdomen. Para insertar estos sensores después de la segunda semana de trabajo, los animales fueron anestesiados con una mezcla de anestésicos; Inoketam 1000 (Virbac 0,1 ml/100g) vía intraperitoneal y Xilazina (Procin 0.08 ml/100g) vía intramuscular. Se realizó una

pequeña incisión en la cavidad abdominal, introduciendo un sensor para medir temperatura (iButton Sensor-Temperature Logger; Maxim Integrated Products, Dallas Semiconductor, USA) totalmente esterilizado. Se cerró la incisión en capas con hilo para suturar catgut 000. Las ratas se dejaron en recuperación durante el fin de semana y el siguiente lunes se retomó el protocolo de trabajo.

Los iButtons se programaron previamente para que guardaran datos de temperatura cada 20 minutos durante las 24 horas por el resto de la manipulación.

Al final de la manipulación, las ratas fueron anestesiadas con una sobredosis de pentobarbital sódico (Sedal-Vet 65 mg/ml), y perfundidas transcardialmente (ventrículo izquierdo) con 250 ml. de solución salina (0.9%), seguido por 250 ml de paraformaldehído al 4% en buffer fosfato (PBS, 0.1 M, pH 7.2) para obtener sus cerebros que se utilizaron para la etapa 2 de esta tesis; y se recuperaron los iButtons. Los datos de temperatura se vaciaron a una computadora para observar la distribución temporal de la temperatura día por día durante la fase experimental y para determinar el patrón temporal promedio de cada grupo experimental y su control..

MEDICIÓN DE GRASA CORPORAL

Al finalizar la perfusión, se extrajo de cada rata el cerebro, se recuperaron los iButton y se disecó bilateralmente la grasa abdominal, la grasa retroperitoneal y del epidídimo. Cada tipo de grasa se pesó inmediatamente. Los datos obtenidos se capturaron en una base de datos y se realizaron los análisis correspondientes.

RESULTADOS

RITMOS CONDUCTUALES

En su línea base todas las ratas control (C-AL, C-CD, C-CN), y las asignadas al trabajo en su fase de descanso (T-AL, T-CD y T-CN) exhibieron ritmos claros sincronizados al ciclo L/D. La actividad nocturna representó para todos los grupos el 66-75% de la actividad total de las 24 horas, mientras que la actividad diurna fluctuó entre 23 y 33% de la actividad total diaria (Figuras 29-31).

Las ratas C-CN y C-CD mantuvieron un patrón temporal de actividad nocturna similar durante toda la manipulación, la cual fue muy similar a la de la línea base y al grupo control (C-AL).

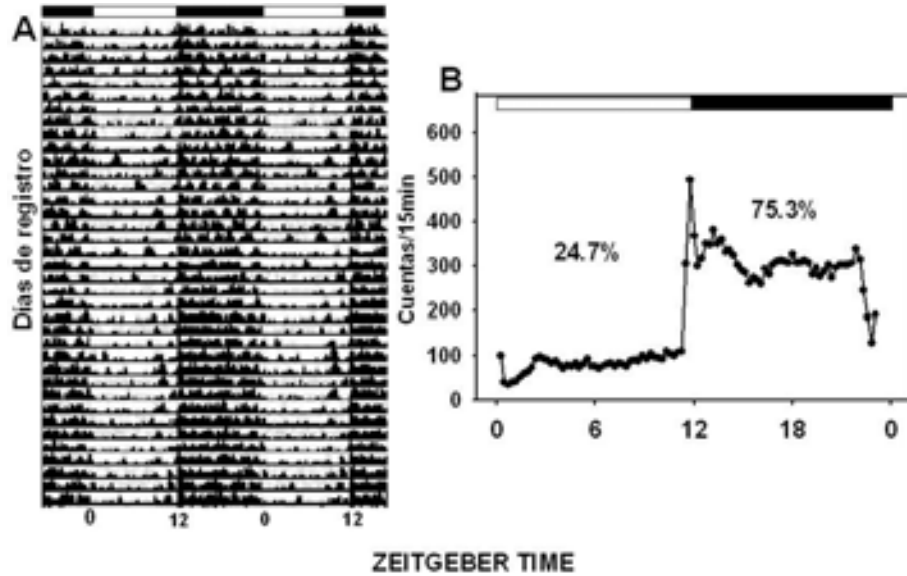


Figura 29. Actograma representativo en doble representación de la actividad general de una rata control con alimento y agua *ad libitum*.(A). En el actograma, cada línea representa un día de registro. En (B) promedio de actividad de 16 ratas control y el porcentaje de actividad diurno y nocturno. Se observan claramente ritmos diarios sincronizados al ciclo LD. La barra blanca y negra representa el ciclo LD.

La actividad durante el día representó 21.1 y 28.3 % de la actividad total para los grupos C-CN y C-CD, mientras que la actividad durante la noche representó 78.9 y 71.1% respectivamente. Esto puede ser observado claramente en los actogramas y perfiles de actividad (Figuras 30 y 31).

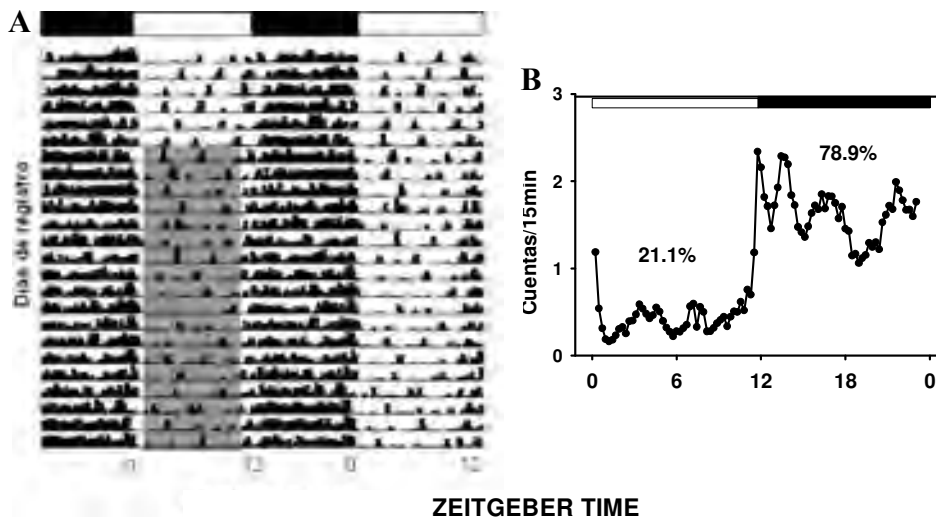


Figura 30. Actograma representativo en doble representación de la actividad general de una rata que recibía el alimento únicamente durante el día (C-CD), y agua *ad libitum*.(A). En el actograma, cada línea representa un día de registro. En (B) promedio de actividad de 5 ratas y el porcentaje de actividad diurno y nocturno. Se observan claramente ritmos diarios sincronizados al ciclo LD. La barra blanca y negra representa el ciclo LD.

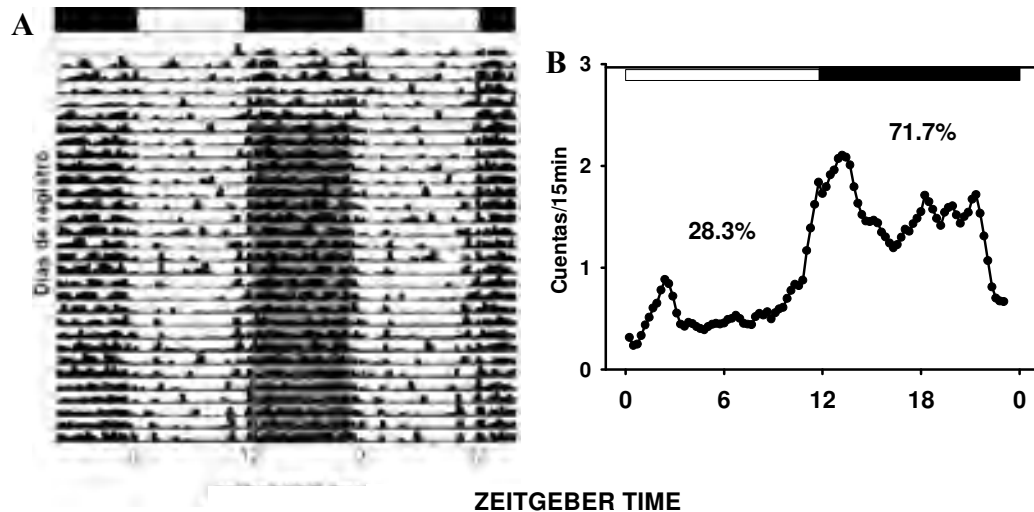


Figura 31. Actograma representativo en doble representación de la actividad general de una rata con alimento restringido únicamente durante la noche (C-CN) y agua *ad libitum*. (A). En el actograma, cada línea representa un día de registro. En (B) promedio de actividad de 5 ratas y el porcentaje de actividad diurno y nocturno. Se observan claramente ritmos diarios sincronizados al ciclo LD. La barra blanca y negra representa el ciclo LD.

Las ratas T-AL y T-CD (forzadas a trabajar durante su fase de descanso con alimento *ad libitum* y alimento durante el día) exhibieron a lo largo de las semanas de trabajo un progresivo decremento en su actividad nocturna como se observa en el actograma y en los perfiles promedio de actividad obtenidas en los días de trabajo y sus correspondientes fines de semana (Fig.32 y 33).

Después de la cuarta semana de trabajo las ratas T-AL y T-CD mostraron durante el fin de semana una actividad nocturna disminuida con una proporción aproximada de 53% de la actividad total diaria mientras que la actividad diurna había aumentado a 47% sin observarse un ritmo diurno significativo (Figs.32 y 33).

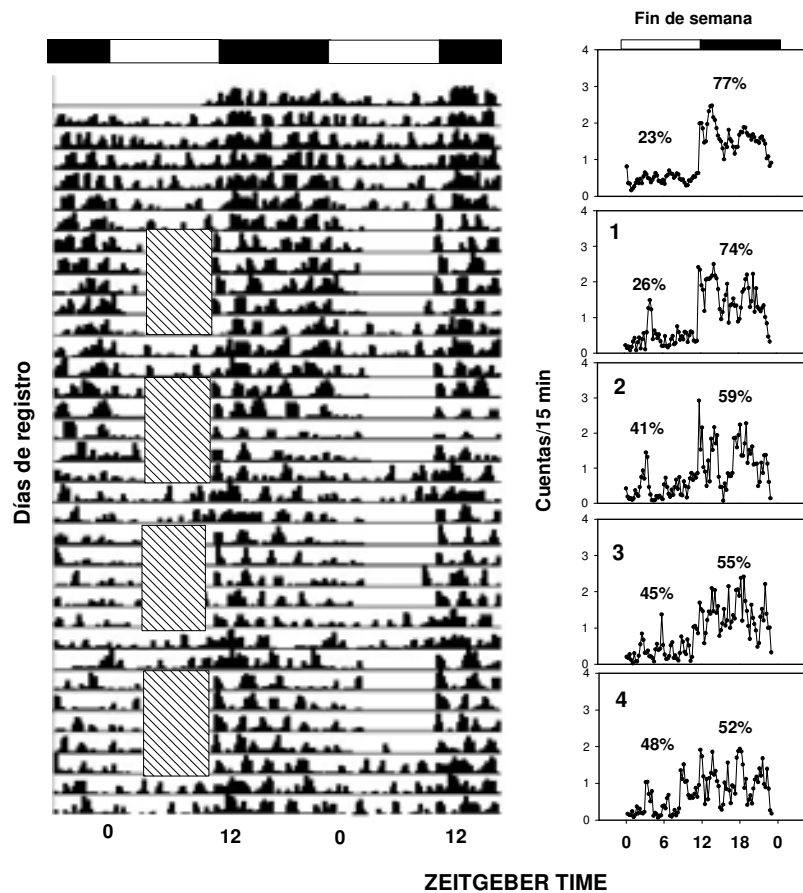


Figura 32. Actograma representativo en doble representación de ratas T-AL (Izquierda). Los primeros 7 días corresponden a la línea base, seguida de 4 semanas bajo condiciones de trabajo. Del lado derecho se presenta el promedio de actividad para la línea base (Parte superior) seguida de cada fin de semana (números 1-4). Las ratas T-AL (n=6) exhiben a los largo de las semanas un progresivo decremento de su actividad nocturna. El tiempo en la rueda de actividad, esta representado por los cuadros con líneas diagonales. Más indicaciones en Fig.30.

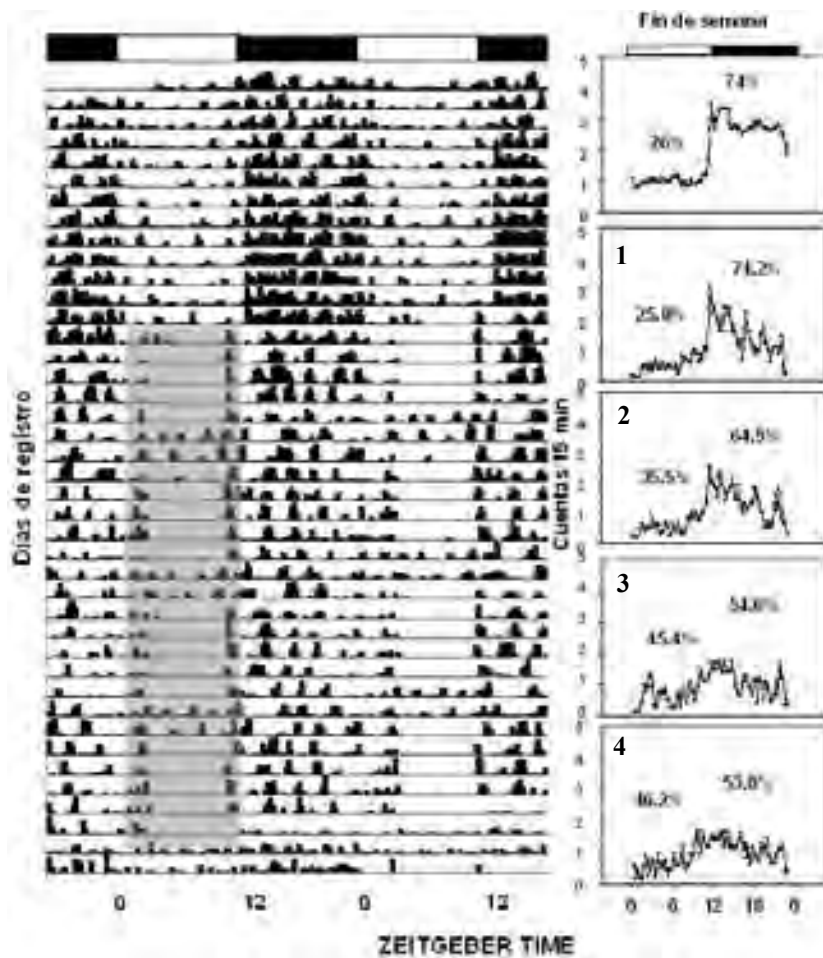


Figura 33. Actograma representativo en doble representación de ratas T-CD (Izquierda). Los primeros 13 días corresponden a la línea base, seguida de 4 semanas bajo condiciones de trabajo. Del lado derecho se presenta el promedio de actividad para la línea base (Parte superior) seguida de cada fin de semana (números 1-4). Las ratas TFD (n=12) exhiben a los largo de las semanas un progresivo decremento de su actividad nocturna. El tiempo en la rueda de actividad, esta representado por los espacios en blanco y el tiempo de acceso al alimento por una barra gris tenue. Más indicaciones en Fig.30.

En contraste aquellos animales expuestos a la rueda de actividad pero con alimento restringido a la noche no mostraron un decremento de su actividad nocturna durante la semana y fines de semana, a pesar de estar expuestos a la rutina de trabajo forzado durante su fase de reposo. Durante los fines de semana mostraron una actividad nocturna con proporciones similares a las que se observaron en la línea base (66-75%) (Fig.34).

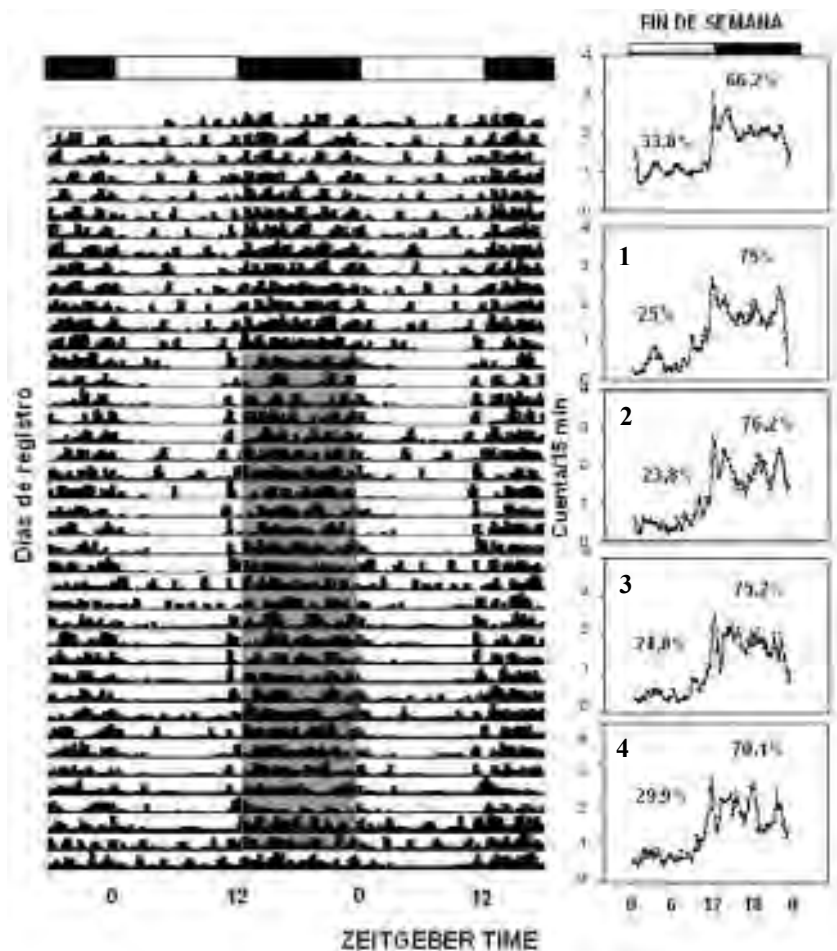


Figura 34. Actograma representativo en doble representación de ratas T-CN (Izquierda). A la derecha se presenta el promedio de actividad para la línea base (Parte superior) seguida de cada fin de semana (numero 1-4). Las ratas (n=12) mantuvieron similares proporciones de actividad diaria a las observadas en la línea base y en los fines de semana (1-4), las ratas exhibieron una robusta ritmicidad con una alta proporción de actividad nocturna. El tiempo en la rueda de actividad, está representado por los espacios en blanco, y el tiempo de acceso al alimento por una barra gris tenue. Más indicaciones en Fig. 29.

INGESTIÓN DE ALIMENTO Y PESO CORPORAL.

Interesantemente a lo largo de las 4 semanas de manipulación los 6 grupos consumieron cantidades similares de alimento (Fig.35), que no se alteró por la hora de acceso a la comida.

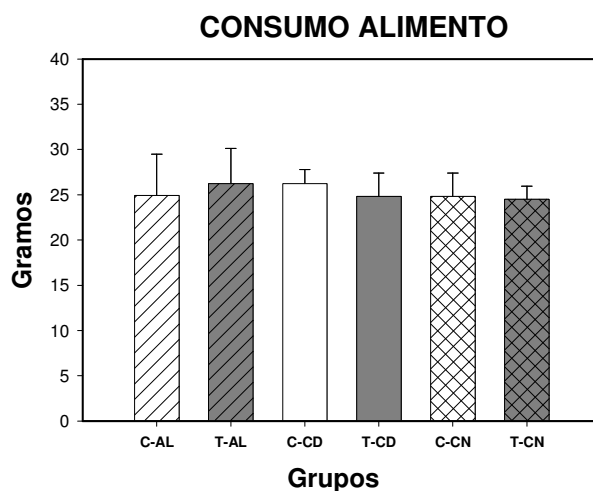


Figura 35. Promedio de la ingesta total diaria de alimento en los 6 grupos de ratas. Los seis grupos mostraron un patrón de consumo similar, Estos datos se obtuvieron en la 4ª semana de manipulación en todos los grupos. No hubo diferencias estadísticas entre los valores de todos los grupos.

A pesar de que la ingesta de alimento total por día fue semejante en todos los grupos. Las ratas que trabajaron y se alimentaron preferentemente durante el día, (T-AL, T-CD) e incluso aquellas que se alimentaron sólo durante el día sin trabajar, (C-CD) ganaron más peso que el control (C-AL) y que las ratas que sólo se alimentaban de noche (T-CN y C-CN), lo cual es la fase normal de alimentación para una rata (Fig.36).

Al final del estudio el aumento de peso comparado con el grupo control (C-AL) fue de de +12% para las T-AL, de +17% para el grupo C-CD, de + 16% para las T-CD, de +4% para las C-CN y de 6% para el T-CN. El ANOVA indicó una diferencia significativa entre los grupos que comen de día y los que comen de noche. ($F_{(2,40)}=3.46$ $P<0.04$), pero no entre los grupos que trabajan y no trabajan ($F_{(1,40)}=0.15$ N/S) y la prueba post hoc indicó que el grupo T-AL, C-CD y T-CD fueron significativamente diferentes del grupo control (C-AL) ($P<0.001$).

Por lo tanto con estos resultados podemos concluir que el alimento a deshoras (durante la etapa de descanso) es el que ocasiona una ganancia de peso mayor, independientemente de la actividad.

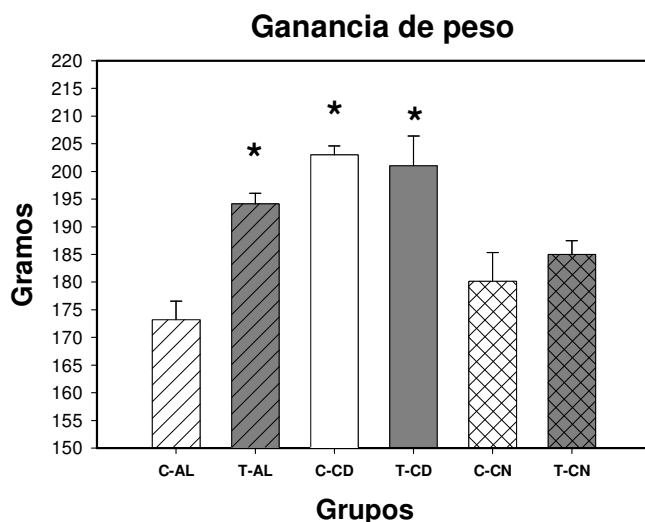


Figura 36. Promedio de la ganancia de peso de los 6 grupos de ratas. Note que los tres grupos que se alimentan durante el día tienen una mayor ganancia de peso. Los asteriscos indican una diferencia estadística de los grupos que se alimentan de día con los demás grupos. ($P < 0.001$).

TEJIDO ADIPOSO

Aunque la ingesta diaria total de alimento fue similar en todos los grupos, independientemente de que trabajaran o no, la grasa acumulada total, fue mayor en los grupos que se alimentaban durante su etapa de descanso (T-AL, C-CD, T-CD). El ANOVA indicó una diferencia significativa entre los grupos que comen de día con los que comen de noche ($F_{(2,40)} = 32.81$; $P < 0.0001$), pero no entre los que trabajan y no trabajan ($F_{(1,40)} = 1.94$; N/S), pero si una diferencia en la interacción de ambos factores ($F_{(2,40)} = 29.79$; $P < 0.0001$) y la prueba post hoc indicó que el grupo T-AL, C-CD, T-CD y C-CN fueron significativamente diferentes del grupo control ($P < 0.001$).

Fue diferencial la acumulación de grasa en el tejido adiposo, la grasa retroperitoneal y abdominal se acumularon en mayor cantidad en los grupos que se alimentaron durante su fase de descanso (día) con respecto a los que comían durante la noche. (Fig.37 y 38). El ANOVA para la grasa retroperitoneal indicó una diferencia significativa entre los grupos que comen de día y los que comen de noche ($F_{(2,40)} = 18.90$; $P < 0.0001$), pero no hubo diferencia entre los que trabajan y no trabajan ($F_{(1,40)} = 0.40$; N/S) pero si hubo diferencia en la interacción de ambos factores. ($F_{(2,40)} = 11.21$; $P < 0.001$). La prueba post hoc indicó que los tres grupos que se alimentaron en su fase de reposo (T-AL, C-CD y T-CD) fueron significativamente diferentes del grupo control. (Fig.37).

Al igual que con la grasa retroperitoneal, para la grasa abdominal el ANOVA indicó una diferencia significativa entre los grupos que comen de día de los que comen de noche ($F_{(2,40)}=29.40$; $P<0.0001$), y los que trabajan y no trabajan ($F_{(1,40)}=13.41$; $P<0.001$) además en la interacción de ambos factores. ($F_{(2,40)}=14.61$; $P<0.001$) y la prueba post hoc indicó que el grupo T-AL, C-CD y T-CD también fueron significativamente diferentes del grupo control ($P<0.001$). (Fig.37).

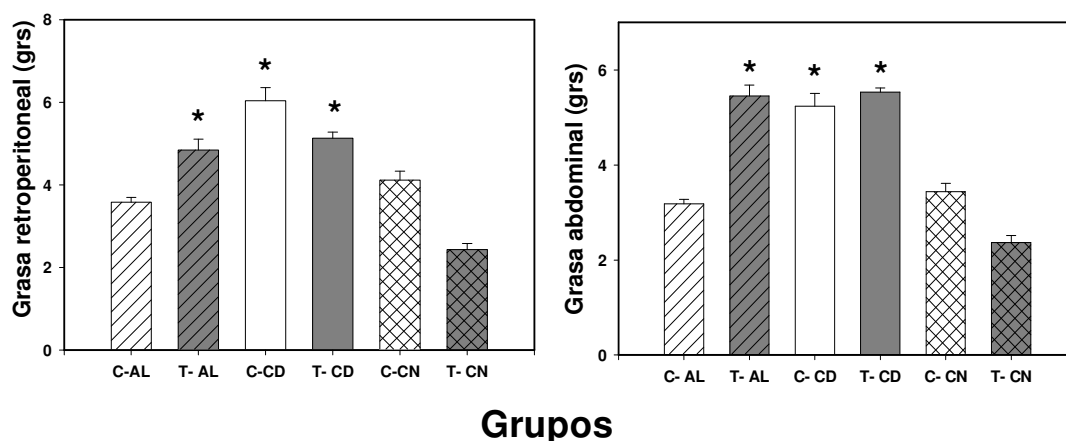


Figura 37. Promedio de la acumulación de grasa retroperitoneal y abdominal de los 6 grupos de ratas. Note que los tres grupos que se alimentan durante el día tienen una mayor acumulación de grasa. Los asteriscos indican una diferencia estadística de los grupos que se alimentan de día con los demás grupos. ($P<0.001$).

Con respecto a la grasa epididimal, ésta se encontró en mayor cantidad en los grupos que se alimentan durante su fase de actividad (noche) (C-CN, T-CN), con respecto a los grupos que se alimentaban únicamente durante el día (C-CD, T-AL, T-CD) (Fig.38). El ANOVA indicó una diferencia significativa entre los grupos que comen de día y los que comen de noche ($F_{(2,40)}=30.40$; $P<0.0001$) y una diferencia entre los que trabajan y no trabajan ($F_{(1,40)}=18.08$; $P<0.001$) pero no hubo diferencia en la interacción de ambos factores. ($F_{(2,40)}=1.89$; N/S, la prueba post hoc indicó que los grupos C-CN, T-CN y T-AL fueron significativamente diferentes del grupo control (C-AL) ($P<0.001$).

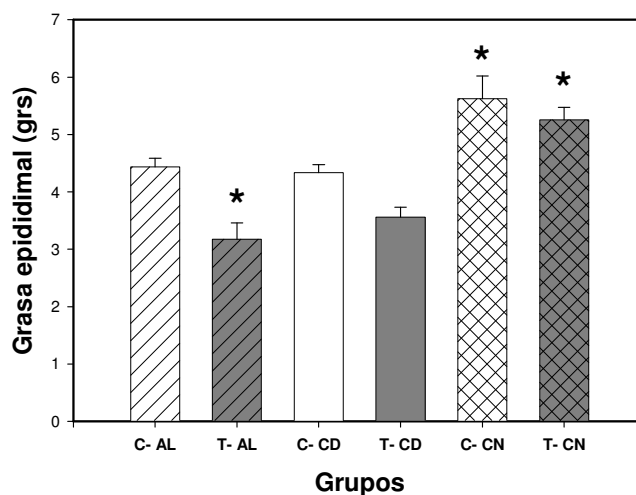


Figura 38. Promedio de la acumulación de grasa epididimal de los 6 grupos de ratas. Note que los grupos que se alimentan durante la noche tienen una mayor acumulación de grasa. Los asteriscos indican una diferencia estadística de los grupos que se alimentan de día con los demás grupos. ($P < 0.001$).

DETERMINACIÓN DE GLUCOSA Y TRIACILGLICÉRIDOS

Las ratas control (C-AL) exhiben un pico de glucosa durante la transición de la fase de luz a la fase de oscuridad. De igual manera el grupo C-CD mostró este pico durante la transición de la fase de luz a la fase de oscuridad (en ZT12), indicando que la alimentación restringida no modifica el patrón temporal de glucosa. En el grupo que comió solamente de noche C-CN, el pico nocturno se fortaleció y mostró mayor amplitud que el grupo control *ad libitum*. El ANOVA de dos vías, indicó un efecto significativo por el trabajo ($F_{(2,144)}=3.36$; $P < 0.03$), confirmó un efecto en el tiempo de alimentación ($F_{(7,144)}=22.79$, $P < 0.0001$ y en la interacción de ambos factores ($F_{(14,144)}=21.34$; $P < 0.0001$).

Las ratas que trabajaron y preferentemente comieron de día T-CD y T-AL no se observó ritmicidad de la glucosa sanguínea (Fig.39 B). En cambio en el grupo T-CN, que solamente comió de noche se observó un ritmo robusto con acrofase durante la noche similar al C-CN. Es importante resaltar que el trabajo en la fase de reposo cuando no se acompaña de alimentación no cambia la fase del ritmo de glucosa. Para los grupos que trabajaban en la rueda de actividad en su etapa de descanso (T-AL, T-CD y T-CN), la ANOVA de dos vías, indicó una diferencia significativa entre grupos ($F_{(2,152)}=12.65$;

$P < 0.0001$), además de una diferencia por el tiempo de alimentación ($F_{(7,152)} = 6.89$; $P < 0.0001$) y en la interacción de ambos factores. ($F_{(14,152)} = 9.87$; $P < 0.0001$).

GLUCOSA

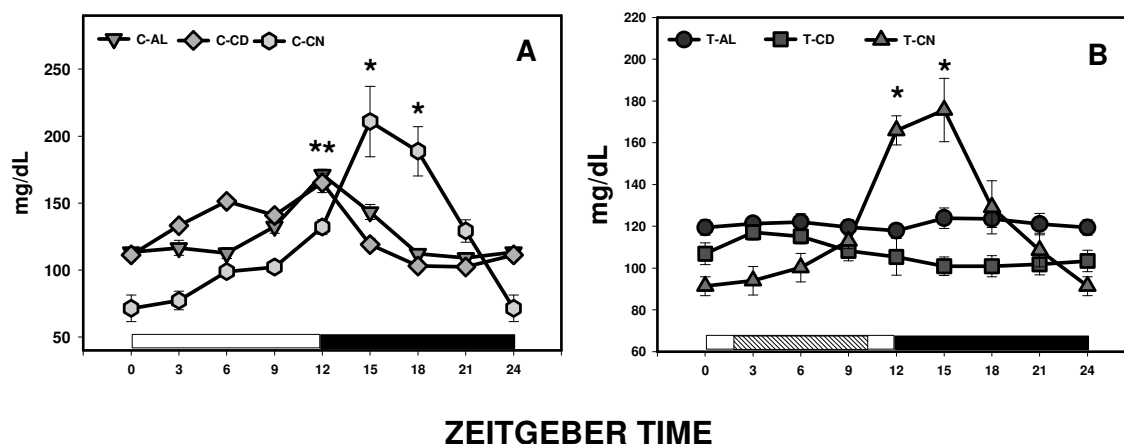


Figura 39. Perfil temporal (medias \pm SEM), para glucosa de los grupos que no trabajan (A), y para los grupos con trabajo y expuestos a diferentes tiempos de alimentación (B). Las barras blancas y negras representan el ciclo L/O, las barras con rayas diagonales en la grafica B representan el tiempo de actividad en la rueda. Asteriscos indican diferencia estadística entre los valores altos y bajos del mismo grupo ($P < 0.01$).

Las ratas control (C-AL) mostraron un ritmo diurno de TAG sérico con un pico en ZT15, 3 horas después del comienzo de la actividad nocturna. En forma similar, el grupo C-CN presentó su pico en ZT15. En contraste el grupo C-CD mostró un ritmo de muy baja amplitud y con un pico diario de TAG en ZT6 que corresponde a la fase de luz, es decir mientras comen. El ANOVA de dos vías, indicó diferencia significativa entre grupos ($F_{(2,126)} = 11.83$; $P < 0.0001$), confirmó una diferencia en el tiempo ($F_{(7,126)} = 6.49$; $P < 0.001$) y en la interacción de ambos factores. ($F_{(14,126)} = 2.22$; $P < 0.01$) en los animales que no trabajaban en la rueda de actividad (C-AL, C-CD, C-CN).

De igual manera, las ratas T-AL y T-CD, que comen predominantemente de día presentaron su acrofase durante la fase de luz, en ZT6, que corresponde a 4 horas después del comienzo de la actividad en la rueda de actividad forzada y posiblemente de su etapa de alimentación (Fig.40). En contraste el grupo T-CN mostró un ritmo diario de TAG con el pico en la fase oscura, en ZT15, que también correspondió a 3 hrs. después del inicio de la fase de oscuridad de la rata (Fig.40).

Para el caso de los grupos que trabajaban en la rueda de actividad en su etapa de descanso (T-AL, T-CD y T-CN), el ANOVA de dos vías, indicó una diferencia significativa entre grupos ($F_{(2,140)}=19.08$; $P<0.001$), además de una diferencia en el tiempo ($F_{(7,140)}=3.78$; $P<0.001$) y en la interacción de ambos factores. ($F_{(14,140)}=5.65$; $P<0.0001$).

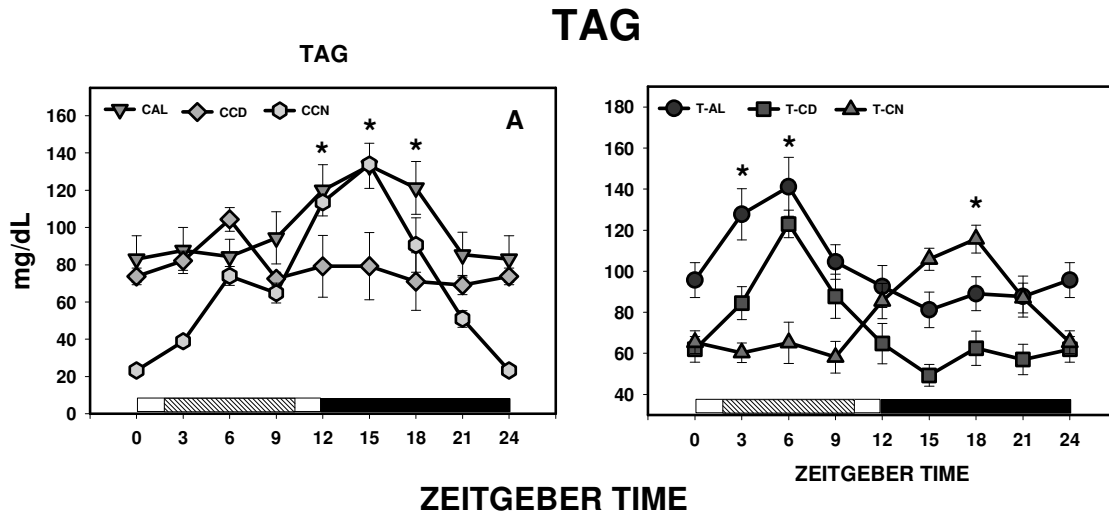


Figura 40. Perfil temporal (medias \pm SEM), para TAG de los grupos que no trabajan y presentan diferentes tiempos de alimentación (A), y para los grupos con trabajo y tienen diferentes tiempos de alimentación (B). Las barras blancas y negras representan el ciclo L/O, las barras con rayas diagonales en la grafica B representan el tiempo de actividad en la rueda. Asteriscos indican diferencia estadística entre los valores altos y bajos del mismo grupo ($P<0.001$).

TEMPERATURA CORPORAL

Las ratas control (C-AL), presentaron un ritmo diario muy claro de temperatura. Durante la fase de luz (descanso), se presentó el nadir del ritmo, elevándose rápidamente aproximadamente dos horas antes del inicio la fase de oscuridad. La acrofase del ritmo, se presenta en la primera mitad de la fase de oscuridad (fase de actividad), con un descenso gradual hasta llegar nuevamente al nadir del ritmo, en la fase de luz del día siguiente. (Fig.41 izquierda arriba).

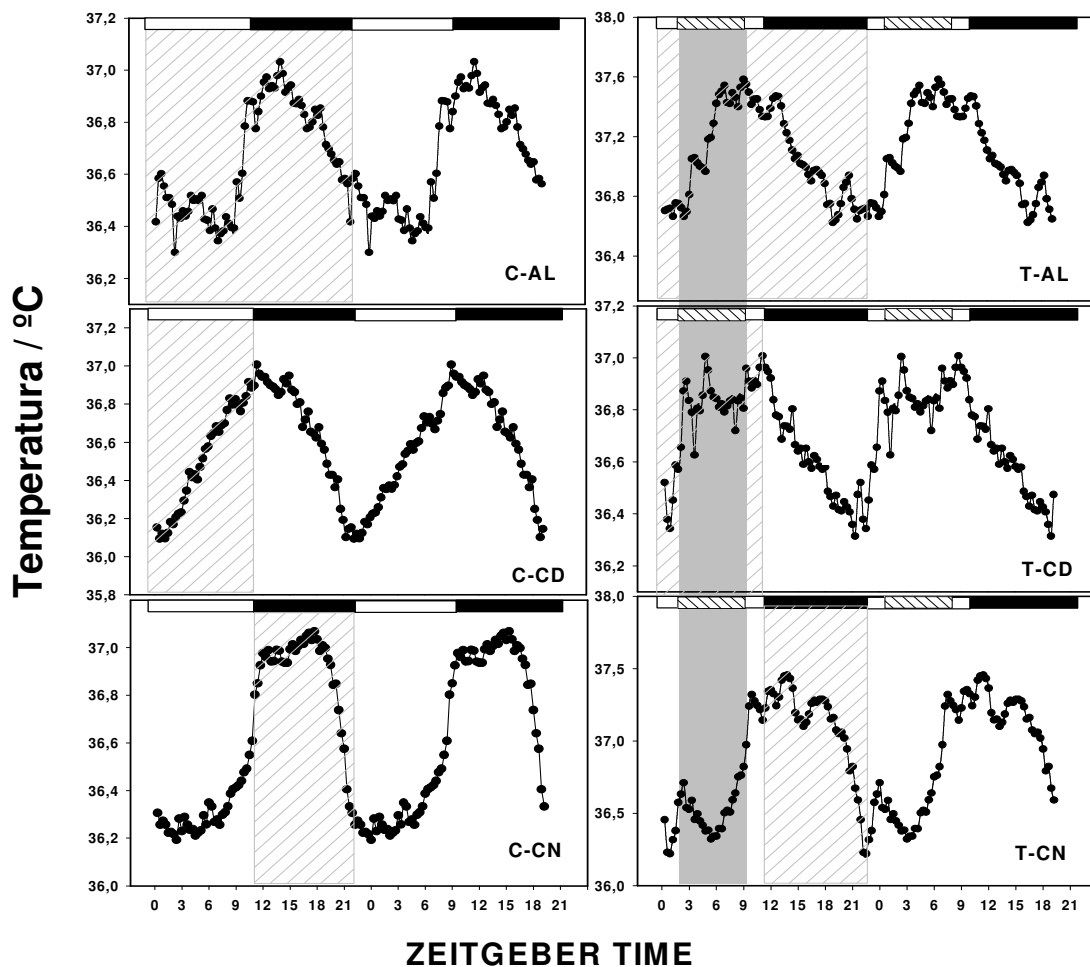


Figura 41. Perfiles temporales (medias \pm SEM), de la Temperatura de los grupos que no trabajan y presentan diferentes tiempos de alimentación (Columna izquierda), y para los grupos con trabajo y diferentes tiempos de alimentación (Columna Derecho). Las barras blancas y negras representan el ciclo L/O, las barras con rayas diagonales en la columna derecha representan el tiempo de actividad en la rueda.

Las ratas control con alimento solo en el día presenta un ritmo muy claro solo que a diferencia del control ad libitum su nadir se presenta al final de la fase de oscuridad, comenzando su elevación de la temperatura momentos después de iniciar la fase de luz, incrementándose durante todo el ciclo de luz, teniendo su acrofase justo en ZT12. Por otro lado las ratas control con alimento solo en la noche mostraron su nadir durante la fase de luz, incrementándose rápidamente al inicio de la fase de oscuridad presentándose su acrofase a la mitad de la noche, en ZT18.

Las ratas T-AL presentaron su ritmo de temperatura muy claro, pero ahora con un avance de fase de aproximadamente 6 horas, asociado al inicio de la actividad en la rueda y a los tiempos cuando voluntariamente la rata se alimenta (Fig.41). La acrofase de temperatura se observó durante la etapa de luz, y contrario con las ratas C-AL, su nadir se observó en la fase de oscuridad (Fig.41).

El ritmo de temperatura de las ratas T-CD fue similar al de las ratas T-AL, pero con un avance de fase de 9 hrs. aproximadamente, con una elevación relacionada al inicio de su actividad y alimentación en la rueda, comenzando a disminuir poco tiempo después de que el animal sale de trabajar. (Fig.41). Por otro lado las ratas que trabajaron de día y comieron de noche T-CN mostraron un ritmo casi idéntico al que se observó en las ratas control C-AL, con una elevación de temperatura momentos antes del inicio de la fase de oscuridad, momento en que las ratas se alimentan, mostrando su acrofase al igual que el control; en la primera parte de la fase de oscuridad (Fig.41).

DISCUSION

En esta etapa del estudio proporcionamos pruebas de que la combinación de la alimentación y actividad forzada durante las horas de descanso altera no sólo los ritmos conductuales sino también los ritmos metabólicos y el control del peso corporal.

En las ratas forzadas a trabajar en su fase de descanso y con alimento durante el día (T-CD) se mostró una disminución progresiva en la actividad nocturna, similar a la mostrada previamente en el grupo T-AL, que preferente se alimenta también de día durante el trabajo (Salgado y col. 2008). Este efecto no se debió al agotamiento físico, ya que este patrón de actividad se observó durante los fines de semana, cuando las ratas permanecieron inalteradas en sus cajas y este comportamiento no fue observado en las ratas obligadas a moverse durante su fase de actividad (Salgado y col. 2008). El efecto parece ser el resultado de una combinación entre el trabajo en la fase de reposo y el alimento, ya que esta disminución en la actividad no se observó cuando el alimento se restringió a la noche (grupo T-CN). La interacción entre ambos factores se hizo evidente con los controles que no fueron expuestos al trabajo ya que los grupos comen solo de

día (C-CD) o solo de noche (C-CN), no mostraron modificación en la distribución temporal de su conducta.

En otras manipulaciones, en las que los animales son forzados a estar activos durante el día, como el acceso restringido de alimento, o un acceso restringido a una rueda de actividad durante el día, se ha observado también una reducción de la actividad nocturna (Mrosovsky, 1996; Hut y col., 1999; Mistlberger, 1994), semejante al efecto descrito en las ratas T-AL y T-CD.

La persistencia de este efecto durante los fines de semana confirmó que los efectores están desacoplados de la transmisión de señales horarias por el SNC y que un fin de semana no es suficiente para recuperar y reajustar su ritmicidad. Esa perturbación confirma lo que sucede en seres humanos, ya que los trabajadores nocturnos no pueden reajustar su actividad a las señales horarias del ciclo LD en tan solo 2 días. Diversos estudios muestran que el tiempo de resincronización en trabajadores nocturnos o en horarios rotatorios tarda de 4-a 9 días (Sack, 2007).

Los datos de este estudio indican que aquellas ratas que se alimentaron durante el día, con trabajo o sin trabajo presentaron una ganancia de peso mayor que aquellas que se alimentaron durante la noche. El mismo patrón se observó al medir la acumulación de grasa abdominal y retroperitoneal.

Es importante resaltar que la ingesta total diaria de alimento fue similar en todos los grupos, y que las ratas que se alimentaban durante el día, independientemente de que trabajaran o no en su fase de descanso (C-CD, T-CD, T-AL), presentaron un aumento en su peso corporal en mayor proporción que aquellos que se alimentaron únicamente de noche. (C-AL, T-CN, C-CN). Las posibles causas de este comportamiento en el aumento de peso se explicó en la discusión de la etapa 1, aquí solo es importante notar que los datos de peso de estos grupos confirman las alteraciones metabólicas y la predisposición a la obesidad resultantes de la ingestión de alimento durante la fase de reposo (Penev 2007, Mühlhans y col 2008, Colles y col 2007).

Al igual que lo reportado en humanos; las ratas (C-AL, C-CD, T-CD) mostraron una ganancia de peso mayor que aquellas que se alimentaron únicamente de noche,

observándose claramente que la grasa total acumulada, fue mayor en los grupos que se alimentaban durante su etapa descanso (Fig.37) (Salgado-Delgado y col 2008)

Además se observó que la grasa retroperitoneal y abdominal se acumularon en mayor cantidad en los grupos que se alimentaron durante su fase de descanso con respecto a los que comían en su fase de actividad. (Fig.41 y 42). Esto concuerda con lo descrito para humanos, en el cual se relaciona un mayor volumen de grasa abdominal y con un aumento en la incidencia de problemas cardiovasculares (Pearson 2006, Després 2007, Mathieu 2008, Poirier 2008) y un mayor riesgo de cáncer de colon. (Pischon y col . 2006, Lee y col. 2007, Frezza y col. 2006).

El ritmo de glucosa mostró un pico asociado al inicio de la noche en los tres grupos control, independientemente de su hora de alimentación, aunque el alimento durante la noche tuvo un efecto reforzante sobre este ritmo predominantemente nocturno. En las ratas trabajadoras y con alimentación diurna T-CD, T-AL se presentó una pérdida del ritmo de glucosa. Este ritmo fue restablecido al propiciar la alimentación durante la noche.

Un cambio similar se observó en el ritmo de triacilglicéridos y de temperatura de las ratas T-AL y T-CD, presentando ahora su acrofase asociado con la hora de actividad y alimentación. Por el contrario, las ratas que se alimentaron en la noche (C-CN y T-CN), mostraron un ritmo de triacilglicéridos y temperatura similar al control (C-AL).

Aunque se sabe muy bien que el ritmo de glucosa en la sangre está regulado por el NSQ (La Fleur y col., 2001), este puede ser alterado por una privación de sueño aguda (Knutsson y col., 2007; Simon y col., 2000; Van Cauter y col., 2007) y modificado por los horarios de alimentación (Escobar y col., 1998). Dado que una alteración en la ritmicidad se observó en las ratas T-CD y T-AL, podemos asumir que el cambio de actividad esta asociada con una redistribución o perturbación de los patrones de sueño y todas las alteraciones hormonales que están involucrados. (Brandenberger y Weibel, 2004). (Ver más detalles en artículo 1 del anexo y discusión de la etapa 1). Además, se ha reportado que la privación de sueño suprime la ritmicidad y disminuye los niveles de diversas hormonas como las pancreáticas (Schmid y col., 2007), de leptina, prolactina y hormona de crecimiento (Everson y Crowley, 2004); lo cual afecta directamente el ritmo diario de la glucosa. Por lo tanto, la pérdida de ritmicidad de glucosa en las ratas

que comen y trabajan en su fase de descanso tiene una perspectiva multifactorial, causa que debe ser estudiado más a fondo.

En cuanto a los triacilglicéridos (TAG), se observó en todos los grupos una relación de su ritmo con la hora de alimentación. En las ratas que se alimentan durante su fase de actividad independientemente si trabaja o no, los valores máximos de TAG se presentaron en la noche, poco tiempo después del inicio de la fase de oscuridad. Similarmente en los tres grupos que se alimentaron durante su fase de descanso (C-CD, T-CD, T-AL) el pico de TAG se observó durante el día, aproximadamente 6 horas después del inicio de la fase de luz y del inicio de la conducta de alimentación. Estas observaciones son similares a las ya descritas en la discusión de la etapa 1 para trabajadores humanos, en donde se observan picos posprandiales de TAG 3-4 hrs. después de una comida (Ribeiro y col. 1998). Para mas detalles ver discusión etapa 1.

A diferencia del ritmo de triacilglicéridos en donde el alimento tuvo una influencia primordial, en el ritmo de temperatura, se observó una influencia de la rutina de trabajo. En las ratas T-AL se observó un gran avance de fase de aproximadamente 6 hrs., al igual que en los grupo C-CD y T-CD, en el cual además la alimentación durante el día propició mayor avance de fase con un incremento de la temperatura 2 horas después del encendido de la luz, justo al inicio de la actividad en la rueda en el T-CD y al inicio de la alimentación en el grupo C-CD. Aunque es claro que solo el alimento durante su fase de descanso provoca un adelanto de fase en el ritmo de temperatura, este adelanto se intensifica cuando se combina con la actividad en la rueda.

Interesantemente, la influencia del alimento se observó en los grupos que comen de noche, independientemente si tienen actividad de día (T-CN) o no (C-AL, C-CN). Ya que el ritmo nocturno de temperatura se mantuvo fuertemente asociado al horario de alimentación nocturno.

Resultados similares se han reportado; avances de fase de varios ritmos como la melatonina y un avance de fase de hasta 7 horas en el ritmo de temperatura y de actividad en ratas bajo restricción calórica en el día. (Challet y col. 1996, 1997; Weinert y col. 2007, Wu 2004, Satvinder y col. 2008). Otro grupo encontró que el ritmo de temperatura cambiaba, por 3 horas de acceso al alimento en la fase de luz (Boulamery-Velly y col., 2005). Además el estrés agudo que podría estar relacionado con la entrada

a la rueda podría estar generando algunos cambios en el ritmo de temperatura corporal de la ratas que trabajan y se alimenta de día. (Merlo 1997).

No podemos descartar el cambio del ritmo diurno de temperatura hacia el día, por la actividad locomotora a la que esta sujeto el animal, ya que a pesar de ser un ejercicio muy ligero se a reportado que es suficiente para causar un ligero cambio en la temperatura corporal en roedores (Weinert D. 1998; O'connor P. y col. 1998; Miyazaki, y col. 2001). En trabajadores nocturnos se han reportado cambios de fase similares en el ritmo de temperatura asociados con el nuevo horario de actividad del individuo. (Eastman C y col. 1995). Aunado a este efecto, también en el trabajador nocturno el alimento podría estar implicado en el aumento diurno de la temperatura, ya que se sabe que el alimento puede alterar la temperatura corporal (Driver H. y col. 1999).

En conclusión, estos resultados indican que en los animales sometidos a un régimen de trabajo y alimentación durante su período de descanso, se induce una desincronización interna a nivel conductual y metabólico. Estas alteraciones se evitan si el alimento es entregado únicamente durante la noche que es su etapa de actividad y sugieren la relevancia del alimento como agente de acoplamiento y desacoplamiento del mensaje que genera el reloj biológico hacia el organismo.

Estos resultados indican que las señales metabólicas ocasionadas por el alimento a deshoras, combinado con la actividad es un potente agente que ocasiona un cambio de fase en los ritmos conductuales y metabólicos, aun bajo la influencia del ciclo L/O. Este estímulo no-fótico, puede ocasionar grandes cambios en los ritmos de temperatura, TAG, glucosa y ritmos de actividad, sugiriendo un cambio en la sincronización interna del sistema circadiano.

La evidencia de que el alimento durante la noche puede fortalecer el ritmo de glucosa, así como evitar el cambio del ritmo de triacilglicéridos y temperatura sugiere que se deben considerar los horarios de alimentación diseñar una estrategia que permita restablecer la ritmicidad en los individuos sometidos a trabajo nocturno o jet lag. De igual manera indica que la combinación de la actividad con la alimentación durante la

fase de reposo son dos factores que propician la desincronización interna que se observa en el trabajador nocturno.

DISCUSION GENERAL.

La vida moderna provoca situaciones que producen alteraciones en la sincronización como los cambios bruscos en el ambiente (vuelos de larga duración, turnos de trabajo rotatorios, trabajo nocturno, etc.) que causan alteraciones sobre el reloj biológico y la expresión de los ritmos circadianos.

Estas alteraciones, desajustan el orden temporal interno y dejan secuelas crónicas en la salud, siendo una de las principales la ganancia de peso, con una mayor acumulación de grasa en la región abdominal (obesidad central o androide), las alteraciones gastrointestinales, comprendiendo a las gastritis en todas sus variantes y a la úlcera gastroduodenal; en segundo término, las alteraciones cardiovasculares y cáncer de mama en mujeres, entre otras.

Este trabajo nos proporciona una sólida base para entender como se da el desajuste temporal interno característico de un trabajador nocturno, ya que mostramos que en los animales sometidos a un régimen de trabajo durante su período de descanso, se induce una desincronización interna a nivel conductual y metabólico.

Nuestros resultados indican que las señales metabólicas ocasionadas por el alimento a deshoras, combinado con la actividad es un potente agente que ocasiona un cambio de fase en los ritmos conductuales y metabólicos, aun bajo la influencia del ciclo L/O (Fig. 42-43). Estos estímulos no-fóticos, pueden ocasionar grandes cambios en los ritmos de temperatura, TAG, glucosa y ritmos de actividad, sugiriendo un cambio en la sincronización interna del sistema circadiano (Fig. 43).

Además mostramos que la actividad de algunas estructuras hipotalámicas relacionadas con la actividad y el metabolismo cambian su fase, presentándose ahora con relación a el trabajo nocturno, desacoplándose de las señales del NSQ. Por lo tanto podemos sugerir que la causa probable de la desincronización interna bajo el régimen de trabajo nocturno puede comenzar con alteraciones tempranas del sistema hipotalámico regulatorio, lo cual posteriormente genera otras alteraciones en el resto del organismo lo cual puede provocar alguna enfermedad.

Nuestras evidencias de que el alimento durante la noche puede fortalecer el ritmo de glucosa, así como evitar el cambio del ritmo de triacilglicéridos y temperatura sugiere que se deben considerar los horarios de alimentación para diseñar una estrategia que

permita restablecer la ritmicidad en los individuos sometidos a trabajo nocturno o jet lag. Ya que en la mayoría de los casos es imposible cambiar el horario de trabajo, sugerimos mantener un patrón diurno de alimentación para aminorar los efectos dañinos que presenta el trabajador nocturno.

En conclusión, los resultados obtenidos en este estudio indican que el factor principal que promueve la desincronización interna en nuestro modelo del trabajo nocturno es el desacoplamiento de osciladores generado por la combinación de la actividad locomotora durante la fase de reposo y el nuevo horario de alimentación, lo que genera una enorme predisposición a enfermedades en aquellas personas con desincronización interna como los trabajadores en turnos, nocturnos y jet lag.

Aunque este trabajo nos proporciona información que nos permite entender muchas de las alteraciones metabólicas a nivel central y periférico en un trabajador nocturno, aún falta mucho por hacer.

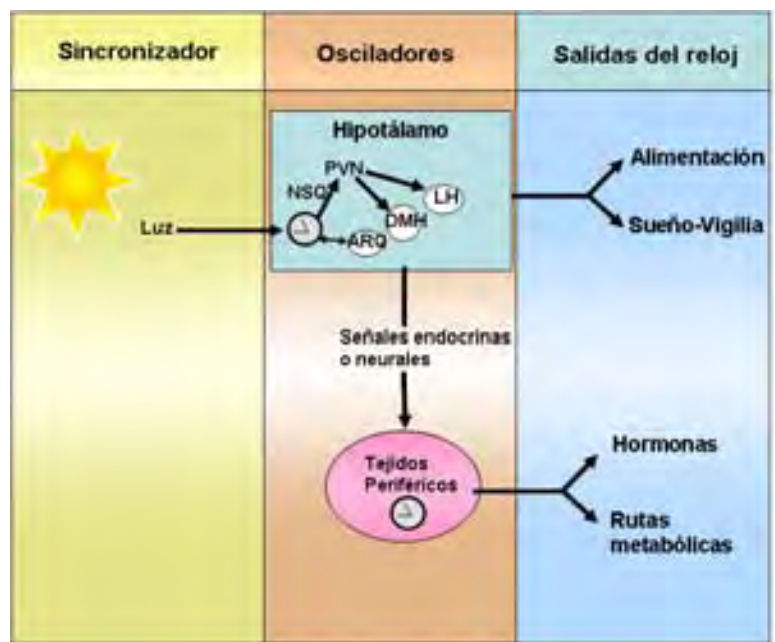


Figura 42. El sistema de medición temporal consta de una serie de elementos entre ellos un reloj biológico, que en los mamíferos se localiza en el núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo y que se sincroniza principalmente al ciclo luz/oscuridad. El reloj maestro a su vez transmite señales de ritmicidad a los osciladores periféricos encargados de regular la fisiología y la conducta; por ejemplo indicando el ritmo circadiano del ciclo sueño/vigilia, del sistema endocrino, de la temperatura corporal, de la actividad renal, así como de la fisiología del tracto gastrointestinal, del metabolismo hepático, etc., manteniendo estas oscilaciones sincronizadas con el tiempo externo.

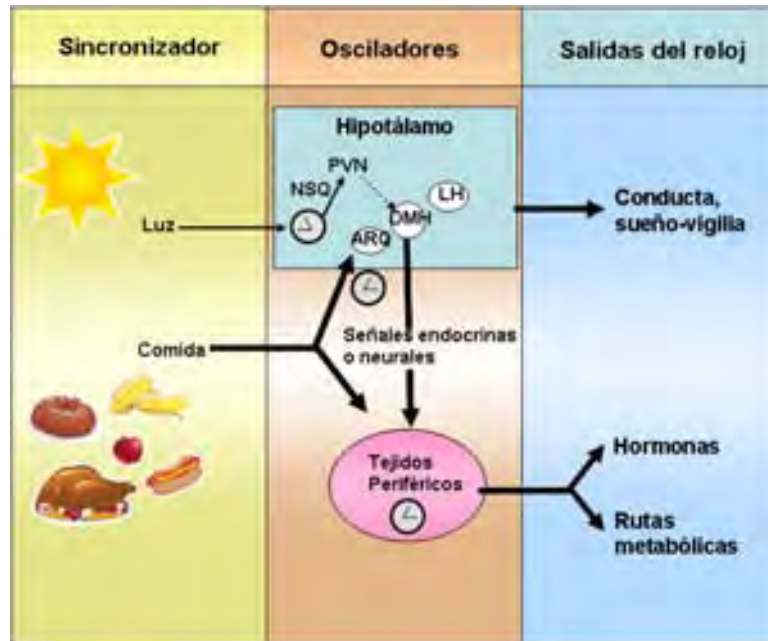


Figura 43. La alteración en la sincronización circadiana (desincronización) resulta en un desequilibrio en las señales temporales que recibe el NSQ. En este caso, la combinación de la actividad y la ingesta de alimento en horas de descanso, se convierte en un sincronizador muy poderoso para relojes periféricos, pero no para el NSQ, especialmente se sincronizan al alimento aquellos osciladores y procesos fisiológicos asociados con el metabolismo, el balance energético, la digestión y la conducta (Sueño-Vigilia).

CONCLUSIONES

1.- La exposición diaria por 8 horas a la rueda de actividad forzada provoca una desincronización interna en roedores, semejante a las que se observan en un trabajador nocturno.

2.- La actividad forzada durante la fase de descanso, provocó que el NSQ pierda su relación de fase con sus efectores.

3.- El “trabajo nocturno” en ratas ocasionó una desincronización en la expresión de c-Fos y PER1 en núcleos hipotálamicos relacionados con el metabolismo y la vigilia.

4.- La actividad forzada durante la fase de descanso, ocasiono que el NSQ pierda su relación de fase con sus efectores.

5.- La desincronización interna que se observa en los trabajadores nocturnos se debe a la alimentación durante la fase de descanso, que es cuando también están trabajando.

6.- El alimento durante la fase de reposo desacopla los osciladores periféricos del reloj biológico principal.

7.- El alimento durante la fase de reposo promueve el aumento de peso en el trabajador nocturno.

8.- El horario de alimentación restringido a la fase nocturna (etapa de actividad) es una buena estrategia para evitar el desacoplamiento de los osciladores periféricos en el modelo de trabajo nocturno en ratas.

REFERENCIAS

Aguilar-Roblero R, García-Hernández, Aguilar R, Arankowsky-Sandoval G, Drucker-Colín R. (1986). Suprachiasmatic nucleus transplants function as an endogenous oscillator only in constant darkness. *Neuroscience Letters*; 69:47-52.

Aguilar-Roblero R, Morin L, Moore R. (1994). Morphological correlates of circadian rhythm restoration induced by transplantation of the suprachiasmatic nucleus in hamsters. *Exp Neurol*. Dec;130(2):250-60.

Akerstedt T, Kecklund G, y Johansson S. (2004). Shift work and mortality. *Chronobiol Int.*; 21(6):1055-61.

Amir S, Cain S, Sullivan J, Robinson B, Stewart J. (1999a). In rats, odor-induced Fos in the olfactory pathways depends on the phase of the circadian clock. *Neurosci Lett*. 17; 272(3):175-8.

Amir S, Cain S, Sullivan J, Robinson B, Stewart J. (1999b). Olfactory stimulation enhances light-induced phase shifts in free-running activity rhythms and Fos expression in the suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience.*; 92(4):1165-70.

Angeles-Castellanos M, Mendoza J, Escobar C. (2007) Restricted feeding schedules phase shift daily rhythms of c-Fos and protein Per1 immunoreactivity in corticolimbic regions in rats. *Neuroscience*. Jan 5;144(1):344-55.

Angeles-Castellanos M, Salgado-Delgado R, Rodríguez K, Buijs RM, Escobar C. (2008). Expectancy for food or expectancy for chocolate reveals timing systems for metabolism and reward. *Neuroscience*. Jul 31;155:297-307.

Antle MC, Mistlberger RE. (2000). Circadian clock resetting by sleep deprivation without exercise in the Syrian hamster.. *J Neurosci*. Dec 15;20(24):9326-32.

Aschoff J. (1965). Circadian Rhythms in Man. *Science*. Jun 11; 148:1427-32.

Aschoff Jürgen..(1981). A Survey on biological Rhythms. *Biological Rhythms*; Vol. 4 of Handbook of Behavioral Neurobiology, edited by Aschoff Jürgen. Plenum Press, New York: 3-11.

Báez-Ruiz A, Escobar C, Aguilar-Roblero R, Vázquez-Martínez O, Díaz-Muñoz M. (2005). Metabolic adaptations of liver mitochondria during restricted feeding schedules. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 289(6):1015-23.

Barger LK, Ayas NT, Cade BE, Cronin JW, Rosner B, Speizer FE, Czeisler CA. (2006) Impact of extended-duration shifts on medical errors, adverse events, and attentional failures. *PLoS Med*. Dec;3:487.

Bartol-Munier, Gourmelen S, Pevet P, Challet E. (2006). Combined effects of high-fat feeding and circadian desynchronization. *Int J Obes* ; 30(1):60-7.

Biello SM, Harrington ME, Mason R. (1991). Geniculo-hypothalamic tract lesions block chlordiazepoxide-induced phase advances in Syrian hamsters. *Brain Res.* Jun 21;552(1):47-52

Boggild H, Knutsson A. (1999). Shift work, risk factors and cardiovascular disease. *Scand J Work Environ Health*, 25(2):85-99.

Boulamery-Velly A., Simon N, Vidal J, Mouchet J, and Bruguerolle B. (2005). Effects of three-hour restricted food access during the light period on circadian rhythms of temperature, locomotor activity, and heart rate in rats. *Chronobiology International*, 22(3): 489–498

Brandenberger G. and Weibel L. (2004). The 24-h growth hormone rhythm in men: sleep and circadian influences questioned, *J. Sleep Res.*;13: 251–255.

Buijs RM, Kalsbeek A. (2001). Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nat Rev Neurosci.* 2(7):521-6.

Buijs RM, la Fleur SE, Wortel J, Van Heyningen C, Zuiddam L, Mettenleiter TC, Kalsbeek A, Nagai K, Nijima A. (2003). The suprachiasmatic nucleus balances sympathetic and parasympathetic output to peripheral organs through separate preautonomic neurons. *J Comp Neurol.* 464(1):36-48.

Cermakian N, Sassone-Corsi P. (2002). Environmental stimulus perception and control of circadian clocks. *Curr Opin Neurobiol.* Aug;12(4):359-65.

Colles S L, J B Dixon and P 'Brien. (2007). Night eating syndrome and nocturnal snacking: association with obesity, binge eating and psychological distress *Int J Obes (Lond)*. Nov;31(11):1722-30.

Cutrera RA, Ouarour A, Pévet P. (1994). Effects of the 5-HT_{1a} receptor agonist 8-OH-DPAT and other non-photoc stimuli on the circadian rhythm of wheel-running activity in hamsters under different constant conditions. *Neurosci Lett.* May 19;172:27-30.

Challet E, Pévet P, Vivien-Roels B, Malan (1997). A Phase-advanced daily rhythms of melatonin, body temperature, and locomotor activity in food-restricted rats fed during daytime. *J Biol Rhythms.* Feb;12(1):65-79.

Challet E., Pevet, P, Malan A. (1996). Intergeniculate leaflet lesion and daily rhythms in food-restricted rats fed during daytime. *Neuroscience Letters*, 216; 214-218.

Challet E, Solberg LC, Turek FW. (1998). Entrainment in calorie-restricted mice: conflicting zeitgebers and free-running conditions. *Am J Physiol*; 274:1751-61.

Chiesa J., Golombek D. (1999). Fisiología de la Desincronización por Vuelos Transmeridianos de Larga Duración (Jet-Lag) *Actas de Fisiología*, 5: 21-38.

Dallmann R, Mrosovsky N. (2006). Scheduled wheel access during daytime: A method for studying conflicting zeitgebers. *Physiol Behav.* 88(4-5):459-65.

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(23):2950-61

Davis S, Mirick DK, Stevens RG. (2001). Night shift work, light at night, and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 93(20):1557-62.

Dawson D., Encel N., Lushington K. (1995). Improving adaptation to simulated night shift: timed exposure to bright light versus daytime melatonin administration. *Sleep* 18, 11-21.

Deacon S., Arendt J. (1996). Adapting to phase shifts, An experimental model for jet lag and shift work. *Physiol Behav*; 59,665-673.

Despres JP. (2007). Cardiovascular disease under the influence of excess visceral fat. *Crit Pathw Cardiol.* Jun;6(2):51-9

Driver H., Shulman I, Baker FH, Buffenstein R. (1999). Energy content of the evening meal alters nocturnal body temperature but not sleep. *Physiology & Behavior* 68 17–23

Dunlap J. (1999). Molecular Bases for Circadian Clocks. *Cell*, 96, 271–290, January 22.

Dunlap J C., Jennifer Loros, De Coursey P.J. (2004). *Chronobiology. Biological timekeeping.* Sinauer Associates, Inc Publishers. Sunderland Massachusetts, USA.

Eastman CI, Hoese EK, Youngstedt SD, Liu L. (1995). Phase-shifting human circadian rhythms with exercise during the night shift. *Physiol Behav.* Dec; 58(6):1287-91.

Emens JS, Lewy AJ, Lefler BJ, Sack RL. (2005). Relative coordination to unknown "weak zeitgebers" in free-running blind individuals. *J Biol Rhythms.* 20(2):159-167.

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: 1309-1316.

Everson CA, Crowley WR. (2004). Reductions in circulating anabolic hormones induced by sustained sleep deprivation in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 286(6):1060-70.

Folkard S., Arendt J., Clark M. (1993). Can melatonin improve shift workers' tolerance of the night shift? Some preliminary findings. *Chronobiol Int*; 10, 315-320.

Frezza EE, Wachtel MS, Chiriva-Internati M. (2006). Influence of obesity on the risk of developing colon cancer. *Gut.* 55(2):285-91.

Gander P.H., Kronauer R.E., Graeber R.C. (1985). Phase shifting two coupled circadian pacemakers: implications for jet lag. *Am J Physiol.* 1985; 249: R704-719.

Gangwisch JE, Malaspina D, Boden-Albala B, Heymsfield SB. (2005) Inadequate sleep as a risk factor for obesity: analyses of the NHANES. *Sleep.* 28(10):1289-96.

Girard I, Garland T, (2002). Plasma corticosterone response to acute and chronic voluntary exercise in female house mice. *J Appl Physiol.* 92: 1553-1561

Golombeck D. (2007). *Cronobiología humana; ritmos y relojes biológicos en la salud y en la enfermedad.* Editorial Universidad Nacional de Quilmes. Bernal, Buenos Aires, Argentina.

Golombek D. (2001). *Cronobiología Humana: en busca del tiempo perdido.* Ciencias, abril-junio 62:38-44.

Governale MM, Lee TM. (2001). Olfactory cues accelerate reentrainment following phase shifts and entrain free-running rhythms in female *Octodon degus* (Rodentia). *J Biol Rhythms.* 16(5):489-501.

Graeber, R.C. (1989). Jet lag and sleep disruption. En Kryger, M.H., Roth, T., Dement, W.C. (Eds). *Principles and practice of sleep medicine.* Philadelphia: WB Saunders.

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.* Jan 21;24(3):615-9.

Gruart A, Delgado JM, Escobar C, Aguilar-Roblero R. (2002). Los relojes que gobiernan la vida. *La ciencia para todos.* Vol. 188. Fondo de Cultura Económica. México, D.F.

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

Hastings M. (1998). The brain, circadian rhythms, and clock genes. *BMJ* Dec 19-26;317:1704-7.

Hastings MH, Mead SM, Vindlacheruvu RR, Ebling FJ, Maywood ES, Grosse J. (1992). Non-photoc phase shifting of the circadian activity rhythm of Syrian hamsters: the relative potency of arousal and melatonin. *Brain Res.* Sep 18; 591:20-6.

Hastings MH, Reddy AB, Maywood ES. (2003). A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease. *Nat Rev Neurosci.* 4(8):649-61.

Haus E, Smolensky M. (2006). Biological clocks and shift work: circadian dysregulation and potential long-term effects. *Cancer Causes Control.* 17:489–500.

Hayes K, Sprague S, Guo M, Davis W, Friedman A, Kumar A, Jimenez D, Ding Y. (2008). Forced, not voluntary, exercise effectively induces neuroprotection in stroke. *Acta Neuropathol.* Mar;115(3):289-96

Healy D, Waterhouse JM. (1995). The circadian system and the therapeutics of the affective disorders. *Pharmacol Ther.* 65(2):241-63.

Horikawa K, Yokota S, Fuji K, Akiyama M, Moriya T, Okamura H, Shibata S. (2000). Nonphotic entrainment by 5-HT_{1A}/7 receptor agonists accompanied by reduced Per1 and Per2 mRNA levels in the suprachiasmatic nuclei. *J Neurosci.* Aug 1;20(15):5867-73

Hut R. A, Mrosovsky N, Daan S.(1999). Nonphotic entrainment in a diurnal mammal, the European ground squirrel (*Spermophilus citellus*). *J Biol Rhythms.* 14(5):409-19.

Kalsbeek A, Fliers E, Romijn JA, La Fleur SE, Wortel J, Bakker O, Endert E, Buijs RM. (2001). The suprachiasmatic nucleus generates the diurnal changes in plasma leptin levels. *Endocrinology.* Jun;142(6):2677-85.

Kalsbeek A, La Fleur S, Van Heijningen C, Buijs RM. (2004). Suprachiasmatic GABAergic inputs to the paraventricular nucleus control plasma glucose concentrations in the rat via sympathetic innervation of the liver. *J Neurosci.* 24(35):7604-13.

Karlsson B, Knutsson A, Lindahl B. (2005). Population based study of 27485 people having a metabolic syndrome? Results from a Is there an association between shift work and nightwork. *Occup Environ Med.* 72:427–32.

Karlsson B, Knutsson A, Lindahl B. (2001). Is there an association between shift work and having a metabolic syndrome? Results from a population based study of 27,485 people. *Occup Environ Med.* 58(11):747-52.

Klein DC, Moore RY, Reppert SM. (1991). *The mind's clock.* NY: Oxford University Press.

Klerman EB, Rimmer DW, Dijk DJ, Kronauer RE, Rizzo JF, Czeisler CA. (1998). Non-photic entrainment of the human circadian pacemaker. *Am J Physiol.* 274:991-6.

Knutson KL, Spiegel K, Penev P, Van Cauter E. (2007). The metabolic consequences of sleep deprivation. *Sleep Med Rev.* 11(3):163-78.

Krieger DT and Herbert H. (1978). Comparison of synchronization of circadian corticosteroid rhythms by photoperiod and food *Proc Natl Acad Sci USA.* 75(3): 1577–1581.

Kudo T·Akiyama M·Kuriyama K. ·Sudo M·Moriya T. Shibata. (2004). Night-time restricted feeding normalises clock genes and Pai-1 gene expression in the db/db mouse liver. *Diabetologia.* 47:1425–1436

La Fleur SE, Kalsbeek A, Wortel J, Buijs RM. (1999). A suprachiasmatic nucleus generated rhythm in basal glucose concentrations. *J Neuroendocrinol.* Aug;11(8):643-52.

La Fleur SE, Kalsbeek A, Wortel J, Fekkes ML, Buijs RM. (2001). A daily rhythm in glucose tolerance: a role for the suprachiasmatic nucleus. *Diabetes.* 50:1237-43.

Lavie P. (2001). Sleep-wake as a biological rhythm. *Annu Rev Psychol.* 52,277–303.

Lee HL, Son BK, Lee OY, Jeon YC, Han DS, Sohn JH, Yoon BC, Choi HS, Hahm JS, Lee MH, Lee DH, Kee CS. (2007). Abdominal obesity, insulin resistance, and the risk of colonic adenoma. *Korean J Gastroenterol*. Mar, 49(3):147-51.

Mastorakos G, Pavlatou M, Diamanti-kandarakis M, Chrousos G. (2005). Exercise and the stress system. *Hormones*, 4(2):73-89.

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*. 12:4206-14.

Mathieu P, Pibarot P, Larose E, Poirier P, Marette A, Després JP. (2008). Visceral obesity and the heart. *Int J Biochem Cell Biol*. 40(5):821-36.

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 U S A*. Dec 21;96:15211-6.

Maywood ES, Mrosovsky N. (2001). A molecular explanation of interactions between photic and non-photic circadian clock-resetting stimuli. *Brain Res Gene Expr Patterns*. Aug;1(1):27-31.

Maywood ES, Mrosovsky N. (2002). A molecular explanation of interactions between photic and non-photic circadian clock-resetting stimuli.. *Brain Res Gene Expr Patterns*. Aug;1(1):27-31. in: *Brain Res Gene Expr Patterns*.

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*. Aug; 9(8):1739-47.

Meijer JH. (2001). Photic Entrainment in Mammals. *Circadian Clocks*, Vol 12 of *Handbook of Behavioral Neurobiology*, edited by Stakahaschi, Turek, Moore. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York. Pp. 183-222.

Mellor E. F. (1996). Shift work and flextime: How prevalent are they? *Monthly Labor Review* 109:14-21.

Mendoza J, Ángeles-Castellanos M and Escobar C. (2004). Differential role of the accumbens Shell and Core subterritories in food-entrained rhythms of rats. *Behavioural Brain Research*; 158: 133–142.

Mendoza J, Pévet P, Challet E. (2007). Circadian and photic regulation of clock and clock-controlled proteins in the suprachiasmatic nuclei of calorie-restricted mice. *Eur J Neurosci*. 2007 Jun;25(12):3691-701.

Meyer-Bernstein E, Morin L. (1996). Differential serotonergic innervation of the suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet and its rol. *J Neurosci*. Mar 15;16:2097-111

Minors DS, Waterhouse JM. (1981). Anchor sleep as a synchronizer of rhythms on abnormal routines. *Int J Chronobiol.*;7(3):165-88.

Mistlberger RE, Skene DJ. (2005). Nonphotic entrainment in humans? *J Biol Rhythms.*4:339-52.

Mistlberger RE. (1994). Circadian Food-Anticipatory Activity: Formal Models and Physiological Mechanisms. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.* 18(2): 171-195.

Miyazaki Toshihiko, Hashimoto Satoko, Masubuchi Satoru, Honma Sato, and Ken Ichi Honma. (2001). Phase-advance shifts of human circadian pacemaker are accelerated by daytime physical exercise. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol.* Jul;281(1):R197-205.

Moline M.L., Pollack, C.P., Monk, T.H. (1992). Age-related differences in recovery from simulated jet lag. *Sleep,* 15: 8-40.

Moller, N., P. C. Butler, M. A. Antsiferov, and K. G. M. M. Alberti. (1989) Effects of growth hormone on insulin sensitivity and forearm metabolism in normal man. *Diabetologia* 32: 105–110.

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

Mrosovsky N. (1996). Locomotor activity and non-photic influences on circadian clocks. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 3:343-72.

Mrosovsky, N. (1995). Non-photic shifting in hamsters. *Circadian clocks and their adjustment.* Wiley, Chicester (Ciba Foundation Symposium 183). Pp: 54 – 171.

Mühlhans B, Olbrich K, de Zwaan M. (2008). Night Eating Syndrome and Nocturnal Eating - What is it All About? *JPsychother Psychosom Med Psychol.*

Nagano M, Adachi A, Nakahama K, Nakamura T, Tamada M, Meyer-Bernstein E, Sehgal A, Shigeyoshi Y. (2003). An abrupt shift in the day/night cycle causes desynchrony in the mammalian circadian center. *Journal of Neuroscience* 23(14):6141-51.

Neufeld H, Breen L and Hauger R. (1994). Extreme posture elevates corticosterone in a forced ambulation model of chronic stress in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior,* 47: 233-240.

O'connor P., Breus MJ and Youngstedt SD. (1998). Exercise-Induced Increase in Core Temperature Does Not Disrupt a Behavioral Measure of Sleep Physiology & Behavior, 64, (3), 213–217.

Pearson H. (2006). *Medicine: Sleep it off.* *Nature* 443 (7109): 245 - 370.

Penev PD, Zee PC, Wallen EP, Turek FW. (1995). Aging alters the phase-resetting properties of a serotonin agonist on hamster circadian rhythmicity. *Am J Physiol.* 1995 Jan; 268: 293-8.

Penev Plamen D. (2007). Sleep deprivation and energy metabolism: to sleep, perchance to eat? *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity.* 14(5):374-381.

Perreau-Lenz S, Pévet P, Buijs RM, Kalsbeek A. (2004). The biological clock: the bodyguard of temporal homeostasis. *Chronobiol Int.* Jan;21(1):1-25.

Pischon T, Lahmann PH, Boeing H, Friedenreich C, Norat T, Tjønneland A, Halkjaer J, Overvad K, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Guerne G, Bergmann MM, Linseisen J, Becker N, Trichopoulou A, Trichopoulos D, Sieri S, Palli D, Tumino R, Vineis P, Panico S, Peeters PH, Bueno-de-Mesquita HB, Boshuizen HC, Van Guelpen B, Palmqvist R, Berglund G, Gonzalez CA, Dorransoro M, Barricarte A, Navarro C, Martinez C, Quirós JR, Roddam A, Allen N, Bingham S, Khaw KT, Ferrari P, Kaaks R, Slimani N, Riboli E. (2006) Body size and risk of colon and rectal cancer in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC). *J Natl Cancer Inst.* Jul 5;98:9.

Pittendrigh C.S. (1981). Circadian Systems:Entrainment. *Biological Rhythms, Vol. 4 of Handbook of Behavioral Neurobiology*, edited by Aschoff J. Plenum Press, New York. Pp. 95-125.

Pittendrigh C S (1993) Temporal Organization: Reflections of a Darwinian Clock-Watcher. *Annual Review of Physiology* vol. 55: 17-54.

Poirier P. (2008). Targeting abdominal obesity in cardiology: can we be effective? *Can J Cardiol.* Sep; 24 :13-17.

Reddy A, Field M, Maywood E, Hastings M. (2002). Differential resynchronisation of circadian clock gene expression within the suprachiasmatic nuclei of mice subjected to experimental jet lag. *J Neuroscience*, 22(17):7326-30.

Reddy AB, Wong GK, O'Neill J, Maywood ES, Hastings MH. (2005). Circadian clocks: neural and peripheral pacemakers that impact upon the cell division cycle. *Mutat Res.* 1;574(1-2):76-91.

Reid K, Dawson D. (2001). Comparing performance on a simulated 12 hour shift rotation in young and older subjects *Occup Environ Med.* 58:58–62.

Reppert SM, Weaver DR. (2002). Coordination of circadian timing in mammals. *Nature.* Aug 29;418(6901):935-41. Review.

Reppert SM, Weaver DR. (2001). Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol.* 63:647-76. Review.

Ribeiro DC, Hampton SM, Morgan L, Deacon S, Arendt J. (1998). Altered postprandial hormone and metabolic responses in a simulated shift work environment. *J. Endocrinol*; 158 (3):305-10.

Russell Foster and Katharina Wulff. (2005). The rhythm of rest and excess *Nature reviews, Neuroscience*, 6 may.

Sack R, Auckley D, Auger R, Carskadon M, Kenneth P. Wright Jr, Vitiello M, Zhdanova V. (2007). Circadian Rhythm Sleep Disorders: Part I, Basic Principles, Shift Work and Jet Lag. *Sleep*. Nov 1;30(11):1460-83.

Salgado-Delgado R, Angeles-Castellanos M, Buijs R. and Escobar C. (2008). Internal desynchronization in a model of night-work by forced activity in rats. *Neuroscience*. 154 922–931

Satoh Y, Kawai H, Kudo N, Kawashima Y and Mitsumoto A (2006). Time-restricted feeding entrains daily rhythms of energy metabolism in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290(5):R1276-83.

Satvinder K, Thankachan S, Begum S, Blanco-Centurion C, Takeshi Sakurai, Masashi Yanagisawa, Priyattam J. Shiromani. (2008). Entrainment of temperature and activity rhythms to restricted feeding in orexin knock out mice. *Brain research*, 456; 47–54

Schmid SM, Hallschmid M, Jauch-Chara K, Bandorf N, Born J, Schultes B. (2007). Sleep loss alters basal metabolic hormone secretion and modulates the dynamic counterregulatory response to hypoglycemia. *J Clin Endocrinol Metab*. 92(8):3044-51.

Schwartz WJ, Gross RA, Morton MT. (1987). The suprachiasmatic nuclei contain a tetrodotoxin-resistant circadian pacemaker. *Proc Natl Acad Sci*; Mar; 84(6):1694-8.

Segall LA, Verwey M, Amir S. (2008). Timed restricted feeding restores the rhythms of expression of the clock protein, *Period2*, in the oval nucleus of the bed nucleus of the stria terminalis and central nucleus of the amygdala in adrenalectomized rats. *Neuroscience*. 11; 157 (1):52-6.

Shettleworth SJ. (1998). *Timing and Counting. Cognition, Evolution and Behavior*. Oxford. USA, New York. Pp: 333-378.

Simon, C., L. Weibel, And G. Brandenberger. (2000). Twentyfour- hour rhythms of plasma glucose and insulin secretion rate in regular night workers. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*. 278: 413–420.

Spiegel D., Sephton, S. (2002). Night shift work, light at night, and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 94,530-533.

Spiegel K, Weibel L, Gronfier C, Brandenberger G, Follenius M. (1996). Twenty-four-hour prolactin profiles in night workers. *Chronobiol Int*. 13(4):283-93.

Spitzer, R.L., Terman, M., Terman, J., Williams, J.B. (1997). *Columbia jet lag scale*. Biometrics Research, NY State Psychiatric Institute.

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

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

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

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

Tsai LL, Tsai YC, Hwang K, Huang YW, Tzeng JE. (2005). Repeated light-dark shifts speed up body weight gain in male F344 rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 289(2):212-7.

Tsai LL, Tsai YC. (2007). The effect of scheduled forced wheel activity on body weight in male F344 rats undergoing chronic circadian desynchronization. *Int J Obes (Lond)*. 31(9):1368-77.

Van Cauter E, Holmbäck U, Knutson K. (2007). Impact of Sleep and Sleep Loss on Neuroendocrine and Metabolic Function *Hormone Research*. 67 (Suppl. 1):2-9.

Van Cauter E, Shapiro ET, Tillil H, Polonsky KS. 1992. Circadian modulation of glucose and insulin responses to meals: relationship to cortisol rhythm. *Am J Physiol*. Apr;262:467-75.

Wakamatsu H, Yoshinobu 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 of mPer1 and mPer2 mRNA in the cerebral cortex and hippocampus but not in the suprachiasmatic nucleus of mice. *Eur J Neurosci*. 13(6):1190-6.

Weibel L, Brandenberger G. (1998). Disturbances in hormonal profiles of night workers during their usual sleep and work times. *J Biol Rhythms*. 13(3):202-8.

Weibel L, Spiegel K, Follenius M, Ehrhart J, Brandenberger G. (1996). Internal dissociation of the circadian markers of the cortisol rhythm in night workers. *Am J Physiol*. 270:608-13.

Weibel L, Spiegel K, Gronfier C, Follenius M, Brandenberger G. (1997). Twenty-four-hour melatonin and core body temperature rhythms: their adaptation in night workers. *Am J Physiol*. 272:948-54.

Weinert D, Waterhouse J. (1998). Diurnally changing effects of locomotor activity on body temperature in laboratory mice. *Physiol Behav*. 63(5):837-43.

Weinert D, Waterhouse J (2007). The circadian rhythm of core temperature: effects of physical activity and aging. *Physiol Behav*. 28;90:246-56. 2006.

Weitzman E. (1976). Biologic rhythms and hormone secretion patterns. *Hosp Pract.* 11(8):79-86.

Welsh DK, Logothetis DE, Meister M, Reppert SM. (1995). Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron*, 14(4):697-706.

Wickland C, Turek FW. (1994). Lesions of the thalamic intergeniculate leaflet block activity-induced phase shifts in the circadian activity rhythm of the golden hamster; *Brain Res.* Oct 17; 660(2):293-300.

Winget CM, DeRoshia CW, Markley CL, Holley DC. (1984). A review of human physiological and performance changes associated with desynchronization of biological rhythms. *Aviat Space Environ Med.* 1984 Dec;55(12):1085-96.

Wu M.W., Li X.M, Xian L.J., Levi F. (2004). Effects of meal timing on tumor progression in mice. *Life Sciences* 75, 1181–1193.

Yamaguchi S, Isejima H, Matsuo T, Okura R, Yagita K, Kobayashi M, Okamura H. (2003). Synchronization of cellular clocks in the suprachiasmatic nucleus. *Science*; 21; (302):1408-12.

Zwaan de M, Deborah B. Roerig, M Ross D. Crosby, Samy K, James E. Mitchell, M. (2006). Nighttimes Eating: A Descriptive Study. *Int J Eat Disord.* 39:224–232.

ANEXOS

ARTICULOS COMO PRIMER AUTOR RELACIONADOS CON ESTA TESIS:

- **Salgado-Delgado R**, Angeles-Castellanos M, Buijs R. and Escobar C. INTERNAL DESYNCHRONIZATION IN A MODEL OF NIGHT-WORK BY FORCED ACTIVITY IN RATS. *Neuroscience*. 2008; 154 922–931.
-
- **Salgado-Delgado R**, Fuentes Pardo B and Escobar Carolina. LA DESINCRONIZACIÓN INTERNA COMO PROMOTORA DE ENFERMEDAD Y PROBLEMAS DE CONDUCTA. *Salud Mental*. Vol. 32, No 1, Ene-Feb 2009.

ARTICULOS REALIZADOS EN COLABORACION CON MI GRUPO DE TRABAJO:

- Ángeles-Castellanos M. **Salgado-Delgado, R.** Rodríguez, K. Buijs Rm. and Escobar C. EXPECTANCY FOR FOOD OR EXPECTANCY FOR CHOCOLATE REVEALS TIMING SYSTEMS FOR METABOLISM AND REWARD *Neuroscience* 155 (2008) 297–307.
- Ángeles-Castellanos M. Rodríguez, K. **Salgado-Delgado R**, Buijs R M and Escobar C. THE SUPRACHIASMATIC NUCLEUS PLAYS AN ACTIVE ROLE DURING FOOD ENTREINMENT. *Neuroscience* 2008. *Enviado*.
- Ángeles-Castellanos M., Rodríguez K., **Salgado-Delgado R.**, Escobar C. Cronobiología médica. Fisiología y fisiopatología de los ritmos biológicos. *Rev Fac Med UNAM*. Vol.50 No.6 Noviembre-Diciembre, 2007.
- Ángeles-Castellanos, **Salgado Delgado R**, Rodríguez González, Escobar Carolina. Anatomía de un reloj (Anatomía del sistema circadiano), *Archivos Mexicanos de ANATOMIA. A.C.* vol 2 Num. 1 Junio 2007.
- Escobar Briones C., Ángeles-Castellanos M., Miñana M. C., **Salgado Delgado R.C.**, Rodríguez González K. Hedonismo y reforzadores primarios Capitulo 3 del libro; *Neurobiología del hedonismo*. Editor; Jorge Juárez Gonzáles, 2007, edit. Manual moderno pp. 37-51.
- Escobar Carolina, Ángeles-Castellanos Manuel, **Salgado Delgado R. C.**, Rodríguez González Katia and Buijs M. Rudd. Food Entrainment: A multioscillatory system. In *Comparative Aspects of Circadian Rhythms*, editors: María Luisa Fanjul-Moles and Raúl Aguilar Roblero, Kerala, India. 2008: 121-141

INTERNAL DESYNCHRONIZATION IN A MODEL OF NIGHT-WORK BY FORCED ACTIVITY IN RATS

R. SALGADO-DELGADO,^a
M. ANGELES-CASTELLANOS,^a M. R. BUIJS^b
AND C. ESCOBAR^{a*}

^aDepartamento de Anatomía, Facultad de Medicina, Edificio "B" 4^o Piso, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF 04510, México

^bDepartamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF 04510, México

Abstract—Individuals engaged in shift- or night-work show disturbed diurnal rhythms, out of phase with temporal signals associated to the light/dark (LD) cycle, resulting in internal desynchronization. The mechanisms underlying internal desynchrony have been mainly investigated in experimental animals with protocols that induce phase shifts of the LD cycle and thus modify the activity of the suprachiasmatic nucleus (SCN). In this study we developed an animal model of night-work in which the light–day cycle remained stable and rats were required to be active in a rotating wheel for 8 h daily during their sleeping phase (W-SP). This group was compared with rats that were working in the wheel during their activity phase (W-AP) and with undisturbed rats (C).

We provide evidence that forced activity during the sleeping phase (W-SP group) alters not only activity, but also the temporal pattern of food intake. In consequence W-SP rats showed a loss of glucose rhythmicity and a reversed rhythm of triacylglycerols. In contrast W-AP rats did not show such changes and exhibited metabolic rhythms similar to those of the controls. The three groups exhibited the nocturnal corticosterone increase. In addition the W-SP and W-AP groups showed increase of plasma corticosterone associated with the start of the working session. Forced activity during the sleep phase did not modify SCN activity characterized by the temporal patterns of PER1 and PER2 proteins, which remained in phase with the LD cycle. These observations indicate that a working regimen during the sleeping period elicits internal desynchronization in which activity combined with feeding uncouples metabolic functions from the biological clock which remains fixed to the LD cycle. The present data suggest that in the night worker the combination of work and eating during working hours may be the cause of internal desynchronization. © 2008 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: circadian rhythms, metabolism, suprachiasmatic nucleus, entrainment, shift work.

Circadian rhythms in behavior and physiology are under the control of the suprachiasmatic nucleus (SCN), the master circadian clock in mammals, and its interaction with

peripheral oscillators. Rhythmic activity in the SCN originates from transcriptional/translational feedback loops involving a set of clock genes that include *per1*, *per2* and *per3*, *cry1* and *cry2*, *clock* and *bmal1* (Ko and Takahashi, 2006). The SCN is mainly entrained by the light/dark (LD) cycle (Klein et al., 1991), and transmits rhythmic messages to the entire organism (Buijs and Kalsbeek, 2001) in order to couple physiology and peripheral oscillators to the LD cycle, thus to maintain internal synchrony. Other regular events like activity (Dallmann and Mrosovsky, 2006) sleep and feeding schedules (Mistlberger and Skene, 2005; Mendoza et al., 2005), considered weak zeitgebers, can influence or modulate the expression of SCN driven rhythms. The entraining force of these factors is strengthened in the absence of the LD cycle or when their influence is out of phase with the LD cycle (Klerman et al., 1998; Emens et al., 2005). Recent evidence points out that feeding schedules are strong entraining signals for peripheral oscillators and uncouple behavior, visceral and metabolic rhythms from the SCN (Báez-Ruiz et al., 2005; Escobar et al., 1998; Stephan, 2002).

Diverse aspects of modern life, like shift work and frequent transmeridian trips (jet lag) promote activity or food intake during the resting phase (Waterhouse et al., 2007), which then provide conflicting signals out of phase with temporal signals transmitted by the SCN (Hastings et al., 2003). The consequence is a disturbed phase relation of circadian fluctuations in behavioral, hormonal, and metabolic variables, leading to internal desynchronization (Haus and Smolensky, 2006). This internal desynchronization results in dampening of metabolic and endocrine diurnal rhythms (Knutsson et al., 2007), sleep loss (Lavie, 2001) and loss of menstrual cycle in women (Knutsson, 2003). Most studies report that in spite of years of night work experience, difficulties in adaptation to night work persist (Knutsson, 2003; Weibel and Brandenberger, 1998) and only a minority of shift workers or night workers attain a spontaneous adjustment in the rhythms of core body temperature and melatonin (Weibel et al., 1997), cortisol (Weibel et al., 1996), or prolactin (Spiegel et al., 1996) to their changed activity cycle. In the long-term, night and shift work lead to increased mortality in male and female workers due to cardiovascular and gastric disorders or cancer (Akerstedt et al., 2004; Knutsson, 2004; Davis et al., 2001).

In order to further understand the underlying mechanisms various groups have created animal models to induce internal desynchronization. Those models mainly rely on shifting the LD cycle using schedules that range from once to several times weekly and for long intervals (Bartolo-

*Corresponding author. Tel: +52-55-5623-2422; fax: +52-55-5623-2425. E-mail address: escobarolina@gmail.com (C. Escobar).
Abbreviations: C, control group; LD, light/dark; SCN, suprachiasmatic nucleus; S.E.M., standard error of the mean; TAG, triacylglycerols; W-AP, group working during their active phase; W-SP, group working during the sleep phase; Z.T., zeitgeber time.

Munier et al., 2006; Tsai et al., 2005; Davidson et al., 2006). However, shifting the LD cycle resembles more the condition of transmeridional traveling leading to jet lag. The variation in the shifting designs has provided contradictory results among groups, where some induce desynchronization of behavioral and physiological rhythms (Tsai et al., 2005; Nagano et al., 2003; Reddy et al., 2002), while others hardly find an effect (Bartol-Munier et al., 2006).

Shift-workers or night-workers are forced to be active during their sleep phase, when their biological clock is indicating a drive to sleep. Because in such conditions the LD cycle remains unchanged, we aimed to develop a model of "night-work" in rats by forcing them to be active during the light phase, which is their sleeping phase. Slowly rotating drums were used to force rats to be active and awake daily during 8 h of the light phase for 5 days per week without altering their LD cycle. This model revealed internal desynchronization at the metabolic and behavioral level with no phase shift in indicators of SCN activity.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals and housing

Male Wistar rats weighing 120–140 g at the beginning of the experiment were housed in individual transparent acrylic cages (40 cm×50 cm×20 cm) placed in isolated lockers housing eight animals each, in a soundproof monitoring room. Rats were maintained in a 12-h LD cycle with lights on defined as Zeitgeber time 0 (ZT0), constant temperature ($22\pm 1^\circ\text{C}$), circulating air and free access to water and food (Rodent Laboratory Chow 5001, Purina, Minnetonka, MN, USA). Experiments were approved by the committee for ethical evaluation at the Facultad de Medicina UNAM, which complies with the national guide of care and use of experimental animals of Mexican laws (Decreto de Ley de Protección a los Animales del Distrito Federal, Gaceta Oficial del DF, 26/02/02). Experiments conformed to international guidelines on the ethical use of animals; procedures were aimed at minimizing the number of animals used and their suffering.

Groups

Rats were randomly assigned to one of two groups: control or forced-work. Control rats (C; $n=16$) were housed in individual cages in the monitoring system, and were left undisturbed during baseline and the 5 weeks of the working manipulations. The forced-work rats were subdivided in two groups: 1. work during the sleep phase (W-SP; $n=18$), which is the sleep/rest interval for rats, this group was aimed to model the conditions of human night-workers; 2. work during the active phase (W-AP; $n=12$), which corresponds to the activity phase for rats; this group was aimed to model the conditions of human day-workers. Control and W-SP rats were maintained in a regular 12-h LD cycle with lights on at 07:00 h, while rats for the W-AP group were kept in an inverted 12-h LD cycle with lights on at 19:00 h.

Forced work procedure

In order to induce activity in rats, rotating drums were designed in our laboratory, based on rotating wheels that are used for sleep deprivation, and were constructed by Omniaiva SA de CV (Mexico City, Mexico). The drum (33 cm in diameter×33 cm long) rotates slowly with a speed of one revolution/3 min. The drum is subdivided in four compartments by concentric plates, allowing placement of four rats simultaneously and individually in each drum. Such rotating drums force rats to stay awake and to move slowly,

it does not require from them effortful movements and it allows them to eat and drink freely. Food and a small bottle with water hang from a concentric middle tube and were available *ad libitum*.

All rats (control group $n=16$; W-SP $n=16$ and W-AP $n=12$) were monitored in their home cages for 8–10 days in LD conditions to obtain a baseline. Starting on a Monday W-SP and W-AP rats were taken out of their home cages and were placed in the rotating drum for eight "working" hours. Rats worked from 09:00–17:00 h geographical time, which represented for W-SP rats ZT2–ZT10 and for W-AP rats ZT14–ZT22. For this last group the wheel was placed in an enclosed chamber maintained in constant darkness. After 8 h in the drums rats were returned to their home cages and remained undisturbed until next day. This procedure was carried out for 4–5 weeks from Monday to Friday. During weekends all rats remained undisturbed in their home cages.

Monitoring of behavioral rhythms

General activity in the home cage was continuously monitored with movement sensors placed under individual cages. The system for monitoring and collection of data was developed in our group with the contributions from Nico Bos in Amsterdam, the Netherlands and the Mexican biomedical company Omniaiva SA de CV. Behavioral events were collected with a digitized system and automatically stored every minute in a PC for further analysis. Analysis was performed with the program for PC SPAD9 (Sistema de Procesamiento y Adquisición de Datos, version 1.1.1) designed for this system (Ing Adrián Hernández, Instituto de Fisiología Celular UNAM, Mexico City, Mexico).

Double plotted actograms were obtained for each animal by collecting the sum of activity for 15 min intervals. For each group weekly mean activity waves were constructed and the percentage of daily and nocturnal activity was calculated separately for the baseline, for the working days and for the weekends. In addition the total activity for the 24 h cycle was calculated for the baseline, and for each weekend during the working protocol in order to discard effects due to changes in the general intensity of activity.

Body weight and food intake

Rats were weighed before starting baseline and every week during working manipulations. Body weight gain was calculated for this interval and for each group. Ingested food was monitored twice every week during the baseline and working weeks by weighing separately the nocturnal and the diurnal consumption.

Metabolic and hormonal rhythms

At the end of the 4th working week (Thursday or Friday) rats underwent surgery to implant a jugular cannula (control, $n=16$, W-SP, $n=16$ and W-AP, $n=12$). Animals were anesthetized with Zoletil 100 (Virbac 0.01 ml/100 g) and cannulated in the internal jugular vein with a polyethylene silicon tube (0.025 in. i.d. and 0.047 in. o.d.; Silastic Laboratory tubing; Dow Corning Corp., Midland, MI, USA) filled with heparin (500 U/ml) as anti-coagulant. The outer end of the cannula was fixed in the back between both shoulder blades and clotted with a small needle. Rats were allowed to recover during the weekend and on Monday the work protocol was reinitiated. At the end of the 5th working week blood samples were obtained distributed in 2 days (Thursday and Friday) to cover a 24 h cycle of 3 h intervals (ZT0, ZT3, ZT6, ZT9, ZT12, ZT15, ZT18, ZT21). Blood samples (500 μl) were collected in Eppendorf tubes (1.8 ml) containing a clot-activator gel and were centrifuged at 2500 r.p.m. during 10 min, serum was stored in 100 μl aliquots at -45°C until assay. Aliquots were processed with colorimetric methods for determination of glucose, triacylglycerols (TAG) and with RIA for corticosterone.

Glucose was estimated from a 10- μl sample using a commercial colorimetric kit (No.70478; Hycel de México), which is based

in the reaction between glucose and feni-4-aminofenazona as chromogen and was measured at 500 nm. TAG were assessed with a commercial diagnostic kit (no. B01-4512-01, SERA-PAK plus, Bayer, Sees, France) by quantifying a 4-aminoantipiridine at 500 nm, which is proportional to the glycerol produced by enzymatic hydrolysis of a 10- μ l serum sample. Corticosterone was determined with radioimmunoanalysis with a commercial Kit (Coat-A-Count Rat Corticosterone, TKR1; DPC, Los Angeles, CA, USA), based on the competition for antibody sites between 125 I-labeled and the serum corticosterone. This binding reaction was detected with a gamma counter (Perkin-Elmer Packard Cobra II Auto Gamma model E5005, USA) and converted with a standard curve to serum corticosterone. Daily temporal profiles were compared among groups and with relation to the LD cycle.

Immunohistochemistry for PER1 and PER2

Rats were randomly assigned to a C or W-SP group and were maintained under working conditions as previously described. On Thursday or Friday of the 5th work-week rats ($N=32$ rats per group) were anesthetized with an overdose of sodium pentobarbital (Sedal-Vet 65 mg/ml), and were perfused transcardially with 250 ml of 0.9% saline followed by 250 ml of fixative 4% paraformaldehyde in phosphate buffer saline (PBS, 0.1 M, pH 7.2). Rats were perfused at one of eight temporal points (ZT0, ZT3, ZT6, ZT9, ZT12, ZT15, ZT18 and ZT21) to complete a 24 h cycle in order to determine rhythmicity for the protein PER1 ($N=4$ per phase) and PER2 ($N=2-3$ per phase). Brains were removed, post-fixed for 1 h and cryoprotected in 30% sucrose for 3–4 days. Frozen coronal sections of 40 μ m were cut with a cryostat at -18°C and collected in four series. One series was incubated during 72 h at 4°C in PER1 antibody made in goat (Santa Cruz Biotechnology, USA) diluted 1:1000 in PB 0.9% saline, 1% rabbit serum and 0.3% Triton X-100 (PBSRT). A second series was incubated during 48 h at 4°C with an antibody made in rabbit for the protein PER2 (Alpha Diagnostic International) diluted 1:500 in PB 0.9% saline 1% goat serum and 0.3% Triton (PBSGT).

After incubation in the primary antibody sections were incubated for 2 h in biotinylated secondary antibody 1:200 (rabbit anti-goat; for PER1 and goat anti-rabbit for PER2; Vector laboratories) in PBSGT or PBSRT respectively and then were incubated in 0.9% avidin-biotin-peroxidase complex (Vectastain Elite ABC Kit; Vector Laboratories) for 2 h. Tissues were rinsed three times for 10 min between each incubation. Incubations for PER1 were performed at room temperature while PER2 incubations were performed at 4°C .

The reaction was visualized with diaminobenzidine (0.5 mg/ml, in Trizma buffer preset at 7.2) and 30% hydrogen peroxide (35 μ l/100 ml). Sections were mounted on gelatin-coated slides, and dehydrated through a series of alcohols, cleared with xylene, and coverslipped with Permount (Fisher Chemicals).

Cell count

In order to quantify the expression of PER1 and PER2 in the SCN, three representative sections for this nucleus were selected in accordance with the stereotaxic atlas from Paxinos and Watson (1998), an anterior section (bregma 0.92); a medial (bregma 1.20) and a posterior section (bregma 1.40). Images were examined under a light microscope (Nikon Eclipse E600; Nikon, Tokyo, Japan) and captured at a $10\times$ magnification using a computerized image analysis system (Meta Vue series 4.5, Universal Imaging Corporation, Downingtown, PA, USA). Immunoreactive positive nuclei were counted bilaterally by one observer who was blind to the experimental conditions. In order to minimize the number of false positives, background optic density was established in a nearby region lacking PER1 or PER2. Stained cells that reached or surpassed three times the background optic density were counted, while cells under this threshold were discarded. For each

brain the total positive cells was estimated (three bilateral sections) and mean values were then obtained per group and time point.

Statistical analysis

Data were classified by groups and time and are represented as mean \pm standard error of the mean (S.E.M.). Body weight was analyzed with a one-way ANOVA for repeated measures for the main factor group (three levels). Food intake was analyzed with a two-way ANOVA for two factors: weeks (5) and phase (day and night). Serum concentration of glucose, TGA and corticosterone as well as the number of PER1 and PER2 positive cells was evaluated with a two-way ANOVA for the factors group (three levels) and time (eight levels) as a factor of repeated measures for the metabolic measurements and for independent measures for PER1 and PER2. All analyses were followed by a Tukey multiple-comparisons post hoc test with α set at $P<0.05$. Statistical analysis was performed with the program Statistical for Windows version 4.5 (StatSoft, 1993).

RESULTS

Behavioral rhythms

Control rats, as well as W-SP and W-AP rats in their baseline exhibited clear rhythms entrained to the LD cycle. Nocturnal activity represented for all groups 75–80%, while diurnal activity fluctuated between 20 and 25% of the total daily activity (Fig. 1, Fig. 2 top and Fig. 3 top).

The W-SP rats (forced to work during their sleep phase) exhibited along the working weeks a progressive decrease of their nocturnal activity as can be observed in the actogram (Fig. 2 left) and in the activity waves obtained for the working days and the corresponding weekends (Fig. 2 middle and right columns, respectively). After the 4th week of work, during the weekend the nocturnal activity represented a proportion of 54.5% of the total daily activity while the diurnal activity had increased to 45.5% and no significant rhythm was observed (Fig. 2 bottom). In addition to changes in the temporal pattern, in the W-SP rats the total counts of activity for the 24 h cycle decreased along the four weekends (Table 1).

The W-AP rats (working during their activity phase), maintained a temporal pattern of activity similar to that of their baseline and of the controls as can be observed in the actogram and the activity waves (Fig. 3). During working days diurnal activity maintained similar proportions (20–25%) as observed during the baseline (Fig. 3 middle column) and during weekends rats exhibited robust rhythmicity with a high proportion of nocturnal activity (Fig. 3 right column). In contrast with the W-SP group, the total activity counts/24 h increased as progressively with the working weeks (Table 1).

Food intake and body weight

During the baseline the three groups showed a similar daily pattern of food consumption characterized by a low proportion of food consumption during the light phase (around 20%) and a higher proportion of food intake during the dark phase, ranging between 79 and 87% (Fig. 4). Control rats maintained this proportion along the four fol-

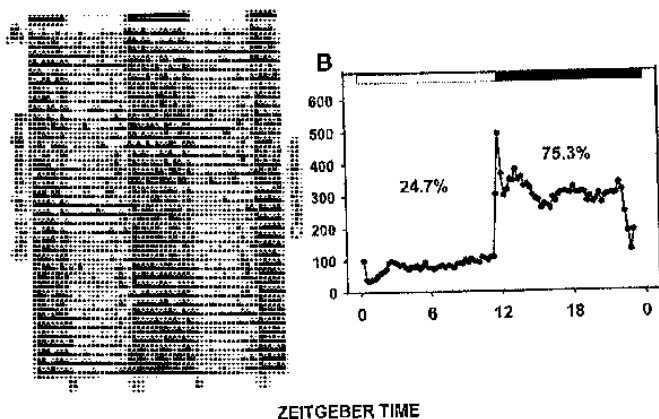


Fig. 1. General activity double-plotted actogram of a control rat with food and water *ad libitum* (A). In the actogram, each line represents a day of recording. (B) Mean activity profile of 16 control rats and the percentage for diurnal and nocturnal activity. It is exhibited clear daily rhythms entrained to the LD cycle. Bars on top represent the LD cycle.

lowing weeks (Fig. 4 top). Interestingly, starting the first week of work the W-SP rats decreased their nocturnal food consumption and along the working weeks progressively increased their diurnal consumption while working in the activity wheel. By the 4th week of work W-SP rats had inverted their feeding patterns and were predominantly eating during their "working" hours in the light phase (Fig. 4 middle). In contrast, W-AP rats maintained a nocturnal pattern of food intake (during their "working" hours) and the proportion of food consumption remained similar as the controls (Fig. 4 bottom). The total amount of food intake per day was similar for all groups. Rats submitted to forced activity during the day gained more weight than the controls and than the W-AP group. This effect was statistically significant on the 3rd and 4th week of "work" (see Table 2). Likewise forced activity during the night resulted in decreased weight gain for the W-AP rats. At the end of the study controls had increased their body weight by 124.4 ± 7.74 g, the W-SP rats by 142.9 ± 5.36 g and the W-AP by 97 ± 1.3 g, which represented +7% for the W-SP and -10% for the W-AP compared with the controls. The ANOVA indicated significant difference among groups ($F_{(2,28)} = 12.41$; $P < 0.0001$) and the post hoc test indicated that the W-AP group was significantly different from the control and W-SP groups ($P < 0.03$).

Metabolic and hormonal rhythms

In order to determine metabolic rhythms of glucose, TAG, and corticosterone, two additional series of rats (control group $n=10$; W-SP $n=10$ and W-AP $n=6$) were exposed to the same forced activity protocol and on week 5 blood samples from a jugular catheter were obtained every 3 h to obtain a 24 h cycle. Control and W-AP rats exhibited a peak of glucose during the transition of light to dark phase, while in W-SP rats no rhythmicity was observed (Fig. 5A). The two-way ANOVA indicated no significant difference

among groups ($F_{(2,28)} = 2.62$; $P < N/S$), but confirmed a significant difference due to time ($F_{(7,196)} = 19.03$; $P < 0.0001$) and for the interaction of both factors ($F_{(14,196)} = 8.15$; $P < 0.0001$).

Control rats showed a diurnal rhythm of serum TAG with peak values at ZT15, 3 h after activity onset, while in W-SP rats, the acrophase had shifted to the light phase at ZT6, 4 h after activity onset in the forced activity wheel (Fig. 5B). In contrast in the W-AP group daily TAG acrophase remained in the dark phase with a shift toward ZT18, also corresponding to 4 h after activity onset in the wheel. The two-way ANOVA indicated no significant difference among groups ($F_{(2,15)} = 0.008$, $P < N/S$), but confirmed a significant difference due to time ($F_{(7,105)} = 3.15$; $P < 0.01$) and for the interaction of both factors ($F_{(14,105)} = 3.32$; $P < 0.001$).

Control and forced activity groups (W-SP and W-AP) exhibited the expected daily corticosterone increase at the beginning of the night. In addition an increase of corticosterone was observed in both working groups at the onset of activity in the wheel, resulting in a modified daily pattern (Fig. 5C, D, E). The two-way ANOVA indicated no significant difference among groups ($F_{(2,20)} = 1.64$; $P < N/S$), but confirmed a significant difference due to time ($F_{(7,140)} = 33.5$; $P < 0.0001$) and for the interaction of both factors ($F_{(14,140)} = 7.81$; $P < 0.001$). Such statistical difference may be linked to the additional increase during the working hours.

Immunohistochemistry for PER1 and PER2

In order to determine the temporal expression of PER1 and PER2 in the SCN, a different set of C and W-SP rats ($n=32$ rats per group), which underwent the same conditions described above, was perfused at the end of the 5th working-week in one of eight temporal points to complete a 24 h cycle. Due to the results in behavior and metabolism ob-

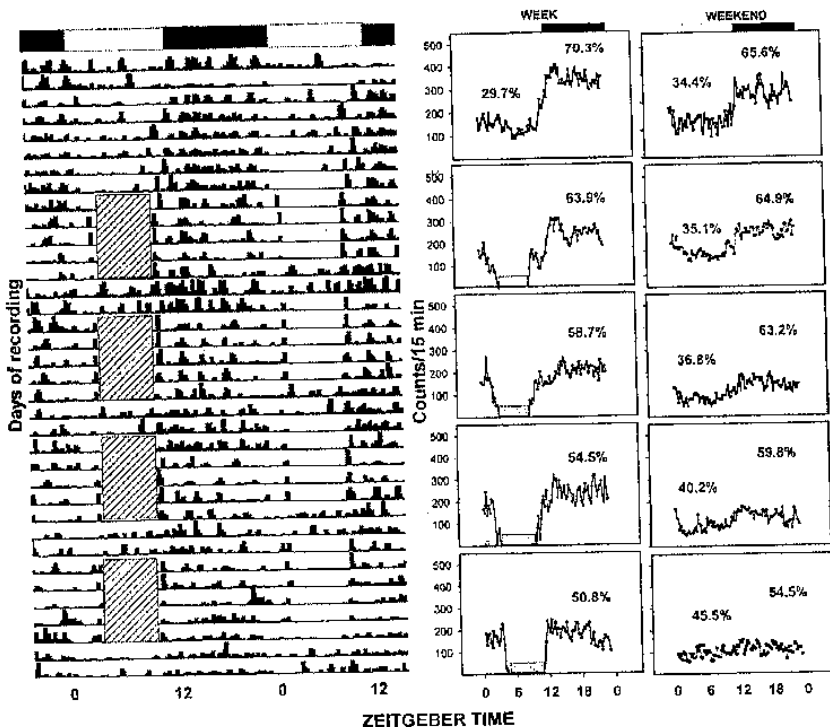


Fig. 2. Double-plotted actogram of a W-SP rat (left). The first 9 days correspond to baseline followed for 4 weeks in working conditions. On the right are the mean activity profiles for baseline (top) followed by each working week (numbers 1–4) and weekends (on the right). Working rats ($n=16$) exhibited along the weeks a progressive decrease of their nocturnal activity. Time in the activity wheels is represented by boxes with diagonal lines. Other indications as in Fig. 1.

served for the (W-AP), this group was not included in this last phase.

Both the control and the W-SP group showed a clear rhythm in the expression of the protein PER1 and PER2 in the SCN. The control group showed for both proteins maximal values at ZT12 (Fig. 6). In the W-SP group the peak of PER1 was observed at ZT9 and for PER2 at ZT12, however the two-way ANOVA indicated no statistical difference between groups, nor due to the interaction group \times time; but it indicated a statistical effect in time for both groups ($F_{(7,42)}=7.23$; $P<0.001$ for PER1 and $F_{(7,16)}=57.38$; $P<0.0001$ for PER 2).

DISCUSSION

In this study we provide evidence that forced activity during resting hours alters not only activity but also the temporal patterns of food intake and metabolic oscillations. In rats forced to be active during the light phase food intake was shifted toward "working" hours while nocturnal activity and nocturnal food intake decreased progressively. This effect was not due to physical exhaustion, since this activity

pattern was also observed during the weekends, when rats remained undisturbed in their home cage, and was not observed in rats forced to be active during their active phase. Associated with the modified feeding patterns of W-SP rats a loss of glucose rhythmicity and reversed TAG rhythms were observed. In contrast, the nocturnal rise of corticosterone and the peaks of PER1 and PER2 expression in the SCN remained coupled to the LD cycle. These observations indicate that animals subjected to a working regimen during their sleeping period undergo internal desynchronization in which feeding and metabolic functions uncouple from the message of the biological clock.

In rats working during their sleep phase the disrupted daily activity patterns, characterized by reduction of the nocturnal activity, remained during the weekends, when they were left undisturbed in their home cages. With other manipulations in which animals are forced to be active during the day, like restricted food access, or restricted access to a running wheel, also a reduction of the nocturnal activity has been observed (Mrosovsky, 1990; Hut et al., 1999; Mistlberger, 1994), similar to the present effect

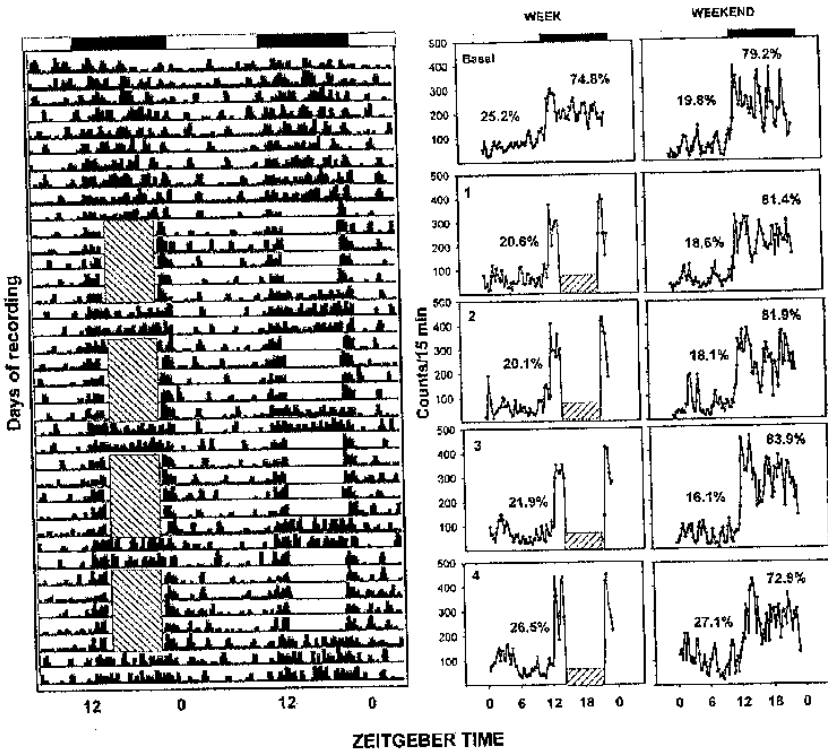


Fig. 3. Double-plotted actogram of a W-AP rat (left). On the right are the mean activity profiles for the baseline (top) followed by each working week (numbers 1–4) and weekends (on the right). Rats ($n=12$) maintained similar proportions of day activity as observed during the baseline (weeks 1–4). During weekends rats exhibited robust rhythmicity with a higher proportion in nocturnal activity. Time in the activity wheels is represented by boxes with diagonal lines. Other indications as in Fig. 1.

described for the W-SP rats (Table 1). The persistence of this effect during the weekends confirms that behavioral effectors were uncoupled from the time signals transmitted by the SCN and that 2 weekend days are not sufficient to recover and readjust rhythmicity. Such a disturbance confirms why nocturnal workers fail to readjust their activity to the time signals of the LD cycle.

The present study revealed that especially where it concerns metabolic organization shift work animals de-

velop an altered pattern. Although total daily food intake was similar for all groups, rats working and feeding mainly during the day increased their body weight in a higher proportion than the controls, while those working and feeding during the night remained a lower body weight than the controls. A factor influencing this propensity can be the decrease of activity counts for the W-SP, while activity was increased in the W-AP group. This factor combined with feeding at the wrong time could have promoted the in-

Table 1. Mean activity for the 24-h cycle for the baseline, and for the weekends after each working week, represented as total daily counts and as % of change from the initial baseline

	C	W-SP	% Of change	W-AP	% Of change
BL	14140.5±2250.5	16975±1351		13431±3918	
Weekend 1		12303±929	-27%	12943±1803	-3%
Weekend 2		11147±558	-34%	15013±2706	+11%
Weekend 3		10949±695	-35%	16365±2561	+21%
Weekend 4		9935±1086	-41%	17443±2628	+29%

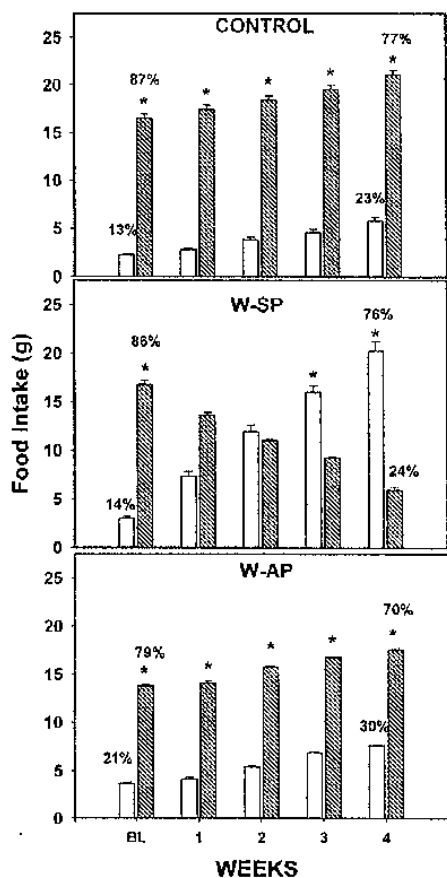


Fig. 4. Mean food intake \pm S.E.M. of control, W-SP and W-AP rats during the day (white bars) and during the night (striped bars). The baseline (BL) of the three groups showed a similar daily pattern of food consumption characterized by low food intake during the day and high food intake during the night. This proportion was progressively reversed along the four working weeks for the W-SP group. Asterisks indicate statistical difference between day and night values ($P < 0.05$).

increased body weight. A similar disturbance and propensity to overweight has been described for night and shift workers (Karlsson et al., 2001), and has been linked to dis-

turbed diurnal rhythms. Disturbed sleep patterns in humans also have been linked to a propensity to obesity (Pearson, 2006; Gangwisch et al., 2005).

In rats glucose increment in the circulation during the light phase is associated with higher levels of insulin and hence higher glucose uptake by tissues (La Fleur et al., 2001). In W-SP rats, feeding mainly during the light phase, both factors could have promoted increased capacity to store energy. In contrast, increased activity during the night resulted in lower body weight in the W-AP rats, suggesting that activity and feeding at the right phase prevent overweight. A recent study reported that rats exposed to regular shifts in the LD cycle increased their body weight (Tsai et al., 2005). However, in the long term, daily exercise in combination with shifts in the LD cycle reversed this overweight (Tsai and Tsai, 2007). In the Tsai and Tsai study animals were forced to exercise in activity wheels for 12 h daily covering a distance of 2.2 km. In our study rats did not exercise extensively, the rotating wheels were used to force activity and the slow rotation of the wheels promoted that rats covered only 20.6 m/h for a total of 165 m/8 h activity routine.

Rats forced to "work" during the sleep period did not show a diurnal glucose rhythm and showed a shift of the TAG rhythms toward the day. The rhythm of blood glucose is driven by the SCN (La Fleur et al., 2001), but is disturbed after acute sleep deprivation (Knutsson et al., 2007; Simon et al., 2000; Van Cauter et al., 2007) and modified by feeding schedules (Escobar et al., 1998). Since a dampening of rhythmicity of general activity was observed in the W-SP rats, we can assume that the change of activity is associated with a disturbance or redistribution of sleep patterns. The peak secretion of growth hormone is directly related to the sleep stage and it is well documented that acute sleep deprivation results in a disturbance or even complete loss of the nocturnal peak of growth hormone (Brandenberger and Weibel, 2004). This hormone plays a relevant role for glucose uptake by the muscle and protein synthesis (Moller et al., 1989). Other hormones like ghrelin, leptin, prolactin and corticosterone also influence the metabolic state and glucose uptake by the cells (Simon et al., 2000). Previous studies have reported that sustained sleep deprivation suppresses the rhythmicity and decreases the mean levels of pancreatic hormones (Schmid et al., 2007), of leptin, prolactin and growth hormone, but not of corticosterone (Everson and Crowley, 2004); such effect can directly influence the daily glucose rhythm. Although such studies have explored short term or sustained sleep deprivation, which are different conditions from those applied in our study, they provide evidence that impaired rhythmicity of diverse hormones may affect glucose regulation. Thus the loss of

Table 2. Average body weight per week for rats maintained undisturbed (control), or exposed to forced activity for 8 h daily

	Basal	Week 1	Week 2	Week 3	Week 4	Body weight gain
C	198 \pm 2.2	228 \pm 2.1	256 \pm 1.1	289 \pm 1.3	320 \pm 3.1	124 \pm 7.7
W-SP	196 \pm 2.6	232 \pm 3.2	251 \pm 3.6	299 \pm 1.5*	340 \pm 2.7**	142 \pm 5.3
W-AP	193 \pm 1.4	220 \pm 1.1	248 \pm 2.1	277 \pm 1.5*	290 \pm 2.6*	97 \pm 1.3

* indicates statistical difference from the W-SP and W-AP groups with the C; * indicates statistical difference between W-SP and W-AP group.

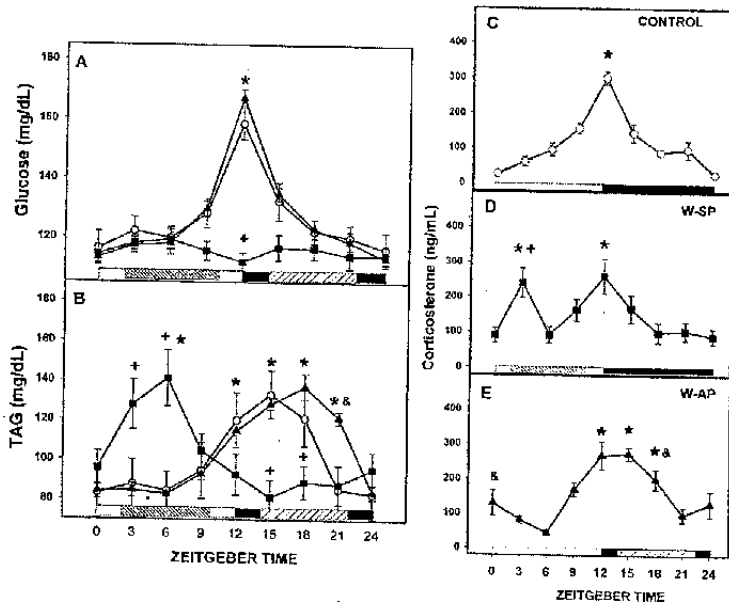


Fig. 5. Mean \pm S.E.M. daily curves for glucose (A), TAG (B) and corticosterone (C, D, E) for controls (white circles) for W-SP (black squares) and for W-AP (black triangles) rats after 4 "working weeks." White and black bars represent the LD cycle, striped bar represents time in the activity wheel. Asterisk indicates statistical difference between the highest and the lowest values of the same group, # indicates statistical difference between equivalent time points from W-SP and the other two groups; Δ indicates statistical difference between equivalent time points from W-AP and the other two groups ($P < 0.01$).

glucose rhythmicity in the W-SP rats can have a multifactorial cause that needs to be studied further.

The reversed pattern of TAG secretion observed in W-SP rats is probably due to the diurnal food intake associated with the working routine. While clearly the modified feeding schedule of the W-SP rats exerted influence on the expression of this rhythm, in the W-AP rats the maximum values of TAG remained in the night with a delay of 4 h. In all three groups the TAG peak was observed 3–4 h after activity onset, which for W-SP and W-AP represented the introduction of the rats to the wheel, and for control rats represented the start of the dark phase, this suggests that for the three groups the peak of TAG followed the onset of feeding behavior. The present observations find support in studies of human workers where also the TAG postprandial peak is observed 3–4 h after a meal (Ribeiro et al., 1998). In addition, some studies report increased concentrations of TAG in shift-workers, however this finding is not consistent in all the studies (Boggild and Knutsson, 1999). Since TAG blood levels are associated with feeding, this may be attributed to differences in sampling time.

In contrast to metabolic rhythms, the nocturnal corticosterone increase was not modified by forced activity during the sleep phase. Data here reported indicate that despite forced activity and diurnal feeding the corticosterone rhythm remained fixed to temporal cues transmitted by the SCN and to the LD cycle. Such findings are in agreement

with a previous study which found in sleep-deprived rats disturbed metabolic and hormonal rhythms, but a conserved corticosterone diurnal rhythm (Everson and Crowley, 2004). In both working groups an additional reactive increase was observed as a response to the placement of the rats in the wheel. A wide range of studies in several species of mammals has reported increase of corticosterone plasma levels in response to acute stress and acute exercise (Neufeld et al., 1994; Hayes et al., 2008). However some studies report that after a few weeks of chronic exposure to exercise no related peak is observed (Girard and Garland, 2002; Fedicuc et al., 2006), suggesting habituation to exercise. In our study the animals were forced to be active and the corticosterone response suggests that they were not habituated in contrast to animals that could choose their level of activity (Fedicuc et al., 2006). The daily corticosterone rhythm is driven by the SCN (Buijs et al., 2003) however restricted feeding schedules elicit a peak anticipating mealtime and restore rhythmicity in rats bearing bilateral lesions of the SCN (Krieger and Herbert, 1978), indicating that meal-associated events may also affect corticosterone secretion. Considering that rats ate mainly during their "working" hours, the observed increase of corticosterone when rats were introduced to the wheels could be related to a food anticipatory reaction. This idea is supported by the fact that at the moment the animals are placed in the wheels also no increase of glucose could

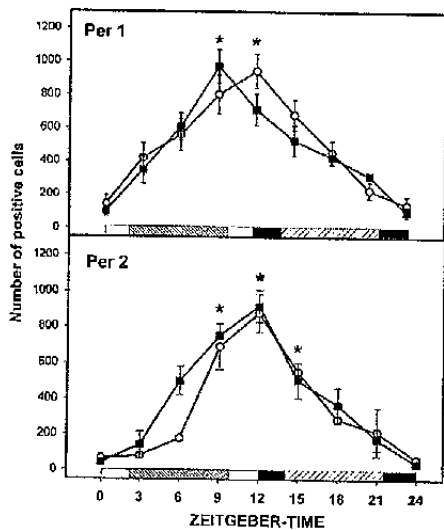


Fig. 6. Daily profiles of mean \pm S.E.M. number of positive cells for Per1 and Per2 protein in the SCN of control (white circles) and W-SP (black squares) rats. Asterisk indicates statistical difference between the highest and the lowest values of the same group ($P < 0.05$).

be observed similar to that in food-anticipating animals. The fact that high levels of corticosterone at this time point are not associated with an increase in glucose may seem surprising however, just as by food anticipation also other stimuli are known in which high levels of corticosterone are not associated with increase of glucose (Kalsbeek et al., 2004).

The stable temporal patterns of PER1 and PER2 protein in W-SP rats confirmed that the activity of the SCN remained locked to the LD cycle, which is the main entraining signal. Similarly restricted access to a running wheel (Dallmann and Mrosovsky, 2006), administration of amphetamines (Masubuchi et al., 2000) and food restricted schedules (Hara et al., 2001; Wakamatsu et al., 2001) modify the temporal patterns of activity, metabolic and peripheral rhythms, but do not change the rhythmicity of the SCN, which remains coupled to the LD cycle. Since food has shown to be a strong entraining signal that uncouples peripheral oscillators from the SCN (Damiola et al., 2000., Hara et al., 2001; Stokkan et al., 2001), therefore we can suggest that a main factor promoting internal desynchronization in our model of night work can be the combination of activity and feeding during the sleep phase and the resistance of the SCN to remain locked to the LD cycle.

CONCLUSION

In conclusion, the present study demonstrates that forced activity during the sleeping phase uncouples daily activity from the LD cycle and thus from the biological clock. Due to the diurnal activity the W-SP rats acquired a diurnal feeding

pattern, which leads to higher body weight gain, inversion of the TAG rhythm and loss of glucose rhythm, while corticosterone and clock protein rhythms in the SCN remained locked to the LD cycle. This condition clearly reflects clearly an internal desynchronization for which rhythms associated with metabolic balance shift associated with the combination of forced activity and feeding schedules. In contrast with other models using shifts of the LD cycle, which probably also move the activity of the SCN, the present model of night-work, based on forced activity during the resting phase, provides a tool to study mechanisms underlying internal desynchronization in shift and night workers.

Acknowledgments—Authors are thankful to Dr. Leon Cintra McGlone, Instituto de Neurobiología, UNAM, who provided the first prototype for the activity wheels. This study was supported by the pharmaceutical company Servier Monde, Paris, France; by CONACyT -México 43950-M and DGAPA-PAPIIT-UNAM IN-203907. CONACyT provided a PhD scholarship to R.S.-D.

REFERENCES

- Akerstedt T, Kecklund G, Johansson S (2004) Shift work and mortality. *Chronobiol Int* 21(6):1055–1061.
- Báez-Ruiz A, Escobar C, Aguilar-Roblero R, Vázquez-Martínez O, Díaz-Muñoz M (2005) Metabolic adaptations of liver mitochondria during restricted feeding schedules. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289(6):1015–1023.
- Bartol-Munier G, Goumelen S, Pévat P, Challet E (2008) Combined effects of high-fat feeding and circadian desynchronization. *Int J Obes* 30(1):80–87.
- Boggild H, Knutsson A (1999) Shift work, risk factors and cardiovascular disease. *Scand J Work Environ Health* 25(2):85–99.
- Brandenberger G, Weibel L (2004) The 24-h growth hormone rhythm in men: sleep and circadian influences questioned. *J Sleep Res* 13:251–255.
- Buijs RM, Kalsbeek A (2001) Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nat Rev Neurosci* 2(7):521–526.
- Buijs RM, la Fleur SE, Wortel J, Van Heyningen C, Zuiddam L, Mettenleiter TC, Kalsbeek A, Nagai K, Nijijima A (2003) The supra-chiasmatic nucleus balances sympathetic and parasympathetic output to peripheral organs through separate preautonomic neurons. *J Comp Neurol* 464(1):36–48.
- Dallmann R, Mrosovsky N (2006) Scheduled wheel access during daytime: A method for studying conflicting zeitgebers. *Physiol Behav* 88(4–5):459–466.
- 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 supra-chiasmatic nucleus. *Genes Dev* 14(23):2950–2961.
- Devis S, Mirick DK, Stevens RG (2001) Night shift work, light at night, and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 93(20):1557–1562.
- Davidson AJ, Yamazaki S, Arble DM, Menaker M, Block GD (2006) Resetting of central and peripheral circadian oscillators in aged rats. *Neurobiol Aging* 28(3):471–477.
- Emens JS, Lewy AJ, Lefler BJ, Sack RL (2005) Relative coordination to unknown "weak zeitgebers" in free-running blind individuals. *J Biol Rhythms* 20(2):159–167.
- 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* 274(2):R1309–R1316.
- Everson CA, Crowley WR (2004) Reductions in circulating anabolic hormones induced by sustained sleep deprivation in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286(6):1060–1070.
- Feducc S, Campbell J, Riddell M (2006) Effect of voluntary wheel running on circadian corticosterone release and on HPA axis re-

- sponsiveness to restraint stress in Sprague-Dawley rats. *J Appl Physiol* 100:1867–1875.
- Gangwisch JE, Malaspina D, Boden-Albala B, Heymsfield SB (2005) Inadequate sleep as a risk factor for obesity: analyses of the NHANES. *Sleep* 28(10):1289–1296.
- Girard I, Garland T (2002) Plasma corticosterone response to acute and chronic voluntary exercise in female house mice. *J Appl Physiol* 92:1553–1561.
- 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(3):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(8):649–661.
- Haus E, Smolensky M (2006) Biological clocks and shift work: circadian dysregulation and potential long-term effects. *Cancer Causes Control* 17:489–500.
- Hayes K, Sprague S, Guo M, Davis W, Friedman A, Kumar A, Jimenez D, Ding Y (2008) Forced, not voluntary, exercise selectively induces neuroprotection in stroke. *Acta Neuropathol* 115:289–96.
- Hut RA, Mrosovsky N, Daan S (1999) Nonphotic entrainment in a diurnal mammal, the European ground squirrel (*Spermophilus citellus*). *J Biol Rhythms* 14(5):409–419.
- Kalsbeek A, La Fleur S, Van Heijningen C, Buijs RM (2004) Suprachiasmatic GABAergic inputs to the paraventricular nucleus control plasma glucose concentrations in the rat via sympathetic innervation of the liver. *J Neurosci* 24(35):7604–7613.
- Karlsson B, Knutsson A, Lindahl B (2001) Is there an association between shift work and having a metabolic syndrome? Results from a population based study of 27,485 people. *Occup Environ Med* 58(11):747–752.
- Klein DC, Moore RY, Reppert SM (1991) *The mind's clock*. New York: Oxford University Press.
- Klerman EB, Rimmer DW, Dijk DJ, Kronauer RE, Rizzo JF 3rd, Czeisler CA (1998) Non-photic entrainment of the human circadian pacemaker. *Am J Physiol* 274:991–996.
- Knutsson KL, Spiegel K, Penev P, Van Cauter E (2007) The metabolic consequences of sleep deprivation. *Sleep Med Rev* 11(3):163–178.
- Knutsson A (2003) Health disorders of shift workers. *Occup Med* 53(2):103–108.
- Knutsson A (2004) Health disorders of shift workers. *Occup Med (Lond)* 53(2):103–108.
- Ko CH, Takahashi JS (2006) Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum Mol Genet* 15(2):271–277.
- Krieger DT, Herbert H (1978) Comparison of synchronization of circadian corticosteroid rhythms by photoperiod and food. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75(3):1577–1581.
- La Fleur SE, Kalsbeek A, Wortel J, Fekkes ML, Buijs RM (2001) A daily rhythm in glucose tolerance: a role for the suprachiasmatic nucleus. *Diabetes* 50:1237–1243.
- Lavie P (2001) Sleep-wake as a biological rhythm. *Annu Rev Psychol* 52:277–303.
- Masubuchi S, Honma S, Abe H, Ishizaki K, Namiura 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.
- Mendoza J, Graff C, Dardente H, Pavet P, Challet E (2005) Feeding cues alter clock gene oscillations and photic responses in the suprachiasmatic nuclei of mice exposed to a light/dark cycle. *J Neurosci* 25(5):1514–1522.
- Mistlberger RE (1994) Circadian food-anticipatory activity: formal models and physiological mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev* 18(2):171–195.
- Mistlberger RE, Skene DJ (2006) Nonphotic entrainment in humans? *J Biol Rhythms* 4:339–352.
- Moller NPC, Butler MA, Antsiferov KG, Alberti MM (1989) Effects of growth hormone on insulin sensitivity and forearm metabolism in normal man. *Diabetologia* 32:105–110.
- Mrosovsky N (1996) Locomotor activity and non-photic influences on circadian clocks. *Biol Rev Camb Philos Soc* 3:343–372.
- Nagano M, Adachi A, Nakahama K, Nakamura T, Tamada M, Meyer-Bernstein E, Sehgal A, Shigeyoshi Y (2003) An abrupt shift in the day/night cycle causes desynchronization in the mammalian circadian center. *23(14):6141–6151*.
- Neufeld H, Breen L, Hauger R (1994) Extreme posture elevates corticosterone in a forced ambulation model of chronic stress in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 47:233–240.
- Paxinos G, Watson C (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. New York: Academic Press.
- Pearson H (2006) Medicine: Sleep it off. *Nature* 443(7109):245–370.
- Reddy AB, Field MD, Maywood ES, Hastings MH (2002) Differential resynchronization of circadian clock gene expression within the suprachiasmatic nuclei of mice subjected to experimental jet lag. *J Neurosci* 22(17):7326–7330.
- Ribeiro DC, Hampton SM, Morgan L, Deacon S, Arendt J (1998) Altered postprandial hormone and metabolic responses in a simulated shift work environment. *J Endocrinol* 158(3):305–310.
- Schmid SM, Hallschmid M, Jauch-Chara K, Bandorf N, Born J, Schulz B (2007) Sleep loss alters basal metabolic hormone secretion and modulates the dynamic counterregulatory response to hypoglycemia. *J Clin Endocrinol Metab* 92(3):3044–3051.
- Simon C, Weibel L, Brandenberger G (2000) Twenty-four-hour rhythms of plasma glucose and insulin secretion rate in regular night workers. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278(3):E413–E420.
- Spiegel K, Weibel L, Gronfier C, Brandenberger G, Follenius M (1996) Twenty-four-hour prolactin profiles in night workers. *Chronobiol Int* 13(4):283–293.
- Stephan FK (2002) The "other" circadian system: food as a Zeitgeber. *J Biol Rhythms* 17(4):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(5503):490–493.
- Tsai LL, Tsai YC, Hwang K, Huang YW, Tzeng JE (2005) Repeated light-dark shifts speed up body weight gain in male F344 rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289(2):212–217.
- Tsai LL, Tsai YC (2007) The effect of scheduled forced wheel activity on body weight in male F344 rats undergoing chronic circadian desynchronization. *Int J Obes (Lond)* 31(9):1368–1377.
- Van Cauter E, Holmbäck U, Knutson K (2007) Impact of sleep and sleep loss on neuroendocrine and metabolic function. *Horm Res* 67(Suppl 1):2–9.
- Wakamatsu H, Yoshinobu 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 of mPer1 and mPer2 mRNA in the cerebral cortex and hippocampus but not in the suprachiasmatic nucleus of mice. *Eur J Neurosci* 13(6):1190–1198.
- Waterhouse J, Reilly T, Atkinson G, Edwards B (2007) Jet lag: trends and coping strategies. *Lancet* 369(9567):1117–1129.
- Weibel L, Spiegel K, Follenius M, Ehrhart J, Brandenberger G (1996) Internal dissociation of the circadian markers of the cortisol rhythm in night workers. *Am J Physiol* 270:608–613.
- Weibel L, Spiegel K, Gronfier C, Follenius M, Brandenberger G (1997) Twenty-four-hour melatonin and core body temperature rhythms: their adaptation in night workers. *Am J Physiol* 272:948–954.
- Weibel L, Brandenberger G (1998) Disturbances in hormonal profiles of night workers during their usual sleep and work times. *J Biol Rhythms* 13(3):202–208.



INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA
RAMON DE LA FUENTE MUÑIZ

Calz. México - Xochimilco 101,
Col. San Lorenzo Huipulco,
Deleg. Tlalpan, C.P. 14370, México, D.F.

Tel. 56 55 28 11, Fax 56 55 04 11,
<http://www.IMPcdsm.edu.mx>

"2008. Año de la Educación Física y el Deporte"

Ref: DPC-10A.5.2-269-08

M. en C. Roberto Carlos Salgado Delgado
Dra. Beatriz Fuentes Pardo
Dra. Carolina Escobar Briones
Facultad de Medicina
UNAM
Presentes

Septiembre 3 de 2008

Distinguidos autores:

Por medio de la presente les comunico que la segunda versión de su artículo: "LA DESINCRONIZACION INTERNA COMO PROMOTORA DE ENFERMEDAD Y PROBLEMAS DE CONDUCTA", ha sido aceptada por el Comité Editorial y aparecerá publicado a partir del volumen 32, número 1, enero-febrero de 2009.

Atentamente

Dr. Héctor Pérez-Rincón García
Editor

HP-R/ech

LA DESINCRONIZACIÓN INTERNA COMO PROMOTORA DE ENFERMEDAD Y PROBLEMAS DE CONDUCTA

INTERNAL DESYNCHRONY AS PROMOTOR OF DISEASE AND BEHAVIORAL DISTURBANCE

M. en C. Roberto Carlos Salgado Delgado.¹

Dra. Beatriz Fuentes Pardo.²

Dra. Carolina Escobar Briones.¹

1. Departamento de Anatomía, Facultad de Medicina, UNAM, México, D.F.

2. Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UNAM, México D.F.

Correspondencia: Roberto Carlos Salgado Delgado, Departamento de Anatomía, Facultad de Medicina, UNAM, México, D.F. 04510 Tel: (55)56232422, Fax: (55)56232422, e-mail: robertosalgado@yahoo.com

SUMMARY

Life on our planet is ruled by a temporary structure that governs our activities, our days and our calendars. In order to cope with a daily changing environment organisms have developed adaptive strategies by exhibiting daily behavioral and physiological changes. Biological rhythms are properties conserved in all the levels of organization, from unicellular to prokaryotes to upper plants and mammals. A biological rhythm is defined as the recurrence of a biological phenomenon in regular intervals of time. Biological rhythms in behaviour and physiology are under the control of an internal clock which synchronizes its oscillations to external time cues that have the capacity to adjust the clock's mechanism and keep it coupled to external fluctuations.

The suprachiasmatic nucleus (SCN) of the hypothalamus in mammals is the master circadian clock which is entrained principally by the light-dark cycle. The SCN transmits time signals to the brain and then to the whole body and by means of it's time signals the SCN keeps a temporal order in diverse oscillations of the body and adjusted to the light - dark cycle. The correct temporal order enables individual to adequate functioning in harmony with the external cycles.

Biological rhythms have a hereditary character, thus its expression is genetically determined. All the animals, the plants, and probably all the organism show some type of physiological rhythmic variation (metabolic rate, production of heat, flowering, etc.) that allow adaptation to a rhythmic environment. Biological rhythms enable individuals to anticipate and to be prepared to demands of the prominent cyclic environmental changes, which is necessary for survival. Also, biological rhythms promote showing maximum levels of a physiological variable at the right moment when the environment requires a maximal response.

In humans, an example of circadian rhythms is the sleep-wake cycle, simultaneously a series of physiological changes are exhibited, also with circadian characteristics (close to 24 hours). Circadian oscillations are observed in the liberation of luteinizing hormone, in plasma cortisol, leptin, insulin, glucose and growth hormone just to mention some examples. The SCN controls circadian rhythmicity via projections to the autonomic system and by controlling the hypothalamus-adenohypophysis-adrenal axis. In this way the SCN transmits phase and period to the peripheral oscillators, to maintain an internal synchrony.

Modern life favors situations that oppose to the time signals in the environment and promote conflicting signals to the SCN and its effectors. The consequence is that circadian oscillators uncouple from the master clock and from the external cycles leading to oscillations out of synchrony with the environment, which is known as internal desynchronization. The consequence is that physiological variables reach their peak expression at wrong moments according to environmental demands leading then to deficient responses and in a long term to disease. Also, levels of attention, learning and memory reach peak expression at wrong moments of the day leading individuals to exhibit a deficient performance at school or at work. The disturbed sleep patterns promote fatigue and irritability, which difficult social interaction.

Internal desynchronization results from transmeridional traveling for which people pass multiple hourly regions. This results in an abrupt change in the time schedule and a syndrome known as Jet Lag. Frequent travelers complain about difficulties to adjust their sleep-wake cycle to the new schedule, thus resulting fatigue, increased sleepiness and reduced attention. Jet Lag results from a loss of synchrony among biological rhythms and among diverse functions, which remain out of phase with the day - night cycle. This "internal desynchrony" is the cause of general discomfort, decrement in the physical and mental performance, as

well as irritability and depression. Frequently gastrointestinal disorders result as a by-product of food consumption at an unusual schedule. The state of internal desynchrony is transitory and depends on the number of time zones that were crossed, thus adaptation to a new external cycle can take from 4 to 7 days.

Another example of internal desynchrony is observed in individuals exposed to shiftwork or to nocturnal work schedules (night-work). In such conditions circadian fluctuations in behavioral, hormonal and metabolic parameters are observed but their temporary relation with the external cycles is modified. The internal synchrony results affected by troubled environmental signs, out of phase with the daily activities of the individual; among them: the hours of food intake, the exposure to light during resting hours, the low temperature of the night, and the forced activity when homeostatic processes indicate a need to rest. This internal desynchrony leads to gastrointestinal disorders, disturbed metabolic fluctuations, disturbed cardiovascular functions, altered menstrual cycle, sleep disorders, sleepiness, increase of work accidents, etc. Internal desynchrony is especially due to the fact that circadian fluctuations are influenced by daily external cycles but also by homeostatic factors, and can suffer from additional disturbance by sleep deprivation. Despite years of night-work experience,

incapacity to adapt to night work may persist. Only a minority of shift workers achieve spontaneous adjustment of the rhythms of core body temperature, melatonin, cortisol, thyroid stimulating hormone, or prolactin secretion to shifts by nocturnal work. Therefore shift and night-workers develop a propensity to smoke, drink alcoholic beverages and use stimulant products.

After 5 years of shift or night-work, health problems appear with higher incidence than in the general population. The growing social demand of shift-work, makes it necessary to decide on the characteristics and forms of shifts to carry out, and up to now organizing such working schedules continues being a serious problem.

The improvement of health services has increased the expectancies of life, thus the general population is becoming old and people survive more years. Older people ail from health and behavioral problems including a deterioration of the biological rhythms. Main alterations consist of loss of expression of the circadian functions or a decrease of the amplitude of the rhythms, and instability of synchronization mechanisms day by day. This all implies a decreased capacity of the clock to adjust to the solar day.

The decreased efficacy of the aging biological clock is evident in the fragmented sleep patterns and the disturbed sleep/wake rhythms, characterized by short sleep episodes during the day and decreased sleep during the night. Some studies suggest that the disturbed circadian rhythms may be the cause of diverse diseases associated with elderly.

In conclusion, during the last 100 years we have changed our lifestyle so radically that we lack already of a physiological design to adapt so quickly to the modernity. We can state that our body is designed for a world that does not exist.

In this manuscript we present a revision of the main alterations of the biological rhythms generated by the transmeridional trips, shift-work and aging, their behavioral and physiological consequences that lead to disease and deficient mental performance. We also discuss possible strategies that need to be explored and that may help people to improve their quality of life and to prevent internal desynchrony.

Key words: biological rhythms, biological clock, desynchronization, Shiftwork.

RESUMEN

La vida se rige por una estructura temporal que gobierna nuestras horas, nuestros días y nuestros calendarios. Como parte de la adaptación a los ciclos de tiempo que impone el planeta, todo organismo presenta ritmos en su actividad y fisiología. Los ritmos biológicos son una propiedad conservada en todos los niveles de organización, desde organismos unicelulares procariontes hasta plantas superiores y mamíferos. De ellos los más robustos son aquellos asociados a los ciclos externos por la alternancia del día y la noche y por la alternancia de las estaciones de año.

Los ritmos biológicos fisiológicos y conductuales son procesos dependientes de un reloj interno capaz de ajustar sus oscilaciones a claves de tiempo externas que lo mantienen sincronizado a estas fluctuaciones externas. El núcleo supraquiasmático del hipotálamo (NSQ), es en los mamíferos el principal reloj circadiano y se sincroniza principalmente por el ciclo luz/oscuridad. El NSQ transmite señales de tiempo al cerebro y de ahí al resto del organismo y por medio de estas señales de tiempo el NSQ mantiene un orden temporal en diversas funciones del cuerpo y las mantiene ajustadas al ciclo luz-oscuridad.

El correcto orden temporal interno permite un adecuado funcionamiento del individuo en armonía con el medio externo y

permite exhibir respuestas adecuadas a un ambiente cambiante y predecible.

El estilo de vida del hombre moderno propicia situaciones que llevan a alteraciones de nuestros ritmos biológicos causando una desadaptación temporal que redundará en daños a la salud, ya que afecta tanto la fisiología como la forma en que organizamos nuestra conducta. Un ejemplo de ello son los viajes a través de múltiples regiones horarias. Estos cambios de horario bruscos provocan un síndrome conocido como "jet-lag"; que consiste en un conflicto transitorio entre el tiempo "interno" y el tiempo "externo"; lo cual se denomina *desincronización interna*. El jet-lag se define como un conjunto de síntomas causados por una alteración del patrón de sueño, y de la expresión de ritmos biológicos fuera de fase entre sí y fuera de fase con el ciclo del día y la noche. Esta es la causa del malestar general, deterioro del desempeño mental y físico, así como irritabilidad y depresión. Son frecuentes también los desórdenes gastrointestinales, resultado del consumo de alimento en un horario inusual.

Otro ejemplo de alteraciones en los ritmos circadianos se observa en los trabajadores con turnos rotatorios o en turnos nocturnos. Bajo estas condiciones se produce un conflicto entre las señales temporales asociadas al ciclo diurno y que transmite el reloj con las actividades y alimentos del trabajador en turnos. De este

esquema de trabajo resulta una reducción de las horas de sueño y una alteración de los ritmos circadianos, que llevan a una desincronización interna. Esta al igual que por el jet-lag redundará en un deterioro de las funciones mentales, de la capacidad de atención, de memorización que se asocian a irritabilidad y problemas emocionales. Además se observan consecuencias en la salud con incremento en la incidencia de malestares gastrointestinales, enfermedades cardiovasculares, obesidad y diabetes. La mejoría en servicios de salud han incrementado las expectativas de vida, enfrentando entonces a la humanidad a una población que logra sobrevivir muchos años de su vejez con los cambios de conducta y salud propios de su edad, entre los que se incluye un deterioro de los ritmos biológicos.

En este trabajo presentamos una revisión de las principales alteraciones de los ritmos biológicos generadas por los viajes transmeridionales, la vejez y el trabajo en turnos. También discutimos la relevancia de una buena adaptación de los ritmos biológicos y las consecuencias conductuales y fisiológicas que por su alteración, que llevan a la enfermedad y a un desempeño mental deficiente. También sugerimos estrategias que necesitan ser exploradas y que podrían ayudar a prevenir la desincronización interna, para mejorar la calidad de vida.

Palabras clave: ritmos biológicos, reloj biológico, desincronización, trabajo rotatorio.

LOS RITMOS BIOLÓGICOS PARA LA SALUD

Los médicos y filósofos de la Grecia antigua ya observaban cambios regulares en las funciones del organismo, fenómeno que ahora conocemos como "ritmos biológicos". Hipócrates aconsejaba a los interesados en la medicina "investigar las estaciones del año y lo que ocurre en ellas". Como consejo práctico, sugería "administrar las purgas de arriba hacia abajo en el verano y de abajo hacia arriba en el invierno". Unos cuantos siglos más tarde, la expedición de Alejandro Magno trajo consigo numerosas descripciones de plantas y animales exóticos. Andróstenes, uno de los cronistas de la expedición, relató que las hojas y pétalos de la planta del tamarindo se movían a lo largo del día, como "saludando al sol".¹ Es curioso que casi toda la historia de las observaciones de los ritmos biológicos se refiere a estudios en plantas. El naturalista Karl Linné fue el creador del sistema de taxonomía de plantas publicado en 1735, y realizó una de las primeras aplicaciones prácticas de los ritmos biológicos, basándose en la regularidad de la apertura y cierre de los pétalos de diversas flores y en 1745 creó un mapa de flores para un reloj de jardín.² Cada especie de flor seleccionada se abría o cerraba a una hora determinada, desde las seis de la mañana hasta las seis de la tarde, de manera que al comprobar qué especie floral tenía los pétalos abiertos o cerrados se podía saber la hora.^{1,2} (Figura 1)

El primer experimento cronobiológico conocido fue en 1729 por el astrónomo francés Jacques d'Ortous DeMairan, el notó que una planta sensitiva de su jardín (*mimosa púdica*) abría sus hojas durante el día y las cerraba durante la noche. Encerró la planta en un armario oscuro y para su sorpresa la planta continuó abriendo y cerrando sus hojas con el mismo ciclo que mostraba en su exterior.^{1,2} Por primera vez e demostró que los ritmos circadianos eran capaces de mantenerse aun en ausencia de señales temporales del ambiente.³

Poco a poco hemos entendido que los cambios cíclicos del ambiente influyen sobre nuestra fisiología. Las observaciones de los ritmos biológicos se han extendido de las plantas a los animales y al ser humano, de tal manera que en el conocimiento de la medicina tradicional se considera la aplicación de algunas hiervas por la noche y no en el día, en luna llena pero no otras noches.¹⁻³

¿QUE ES UN RITMO BIOLÓGICO?

Ahora sabemos que un ritmo biológico es la recurrencia de un fenómeno biológico en intervalos regulares de tiempo. Los ritmos biológicos tienen un carácter hereditario, es decir, su expresión está genéticamente determinada.^{3,4} Todos los animales, las plantas, y probablemente todos los organismos muestran variaciones rítmica en su fisiología (tasa metabólica, producción

de calor, floración, etc.) que suelen asociarse con los ciclos ambientales. Los ritmos biológicos capacitan los organismos para estimar el paso del tiempo, para anticiparse y prepararse a demandas que surgen de los cambios ambientales cíclicos relevantes para su supervivencia. De esta manera permiten mostrar niveles máximos de una variable fisiológica cuando las condiciones en el medio ambiente requieren una respuesta aumentada. En todos los taxa de los organismos eucariontes así como algunos procariontes y hongos se han documentado diferentes ritmos biológicos con períodos que van desde fracciones de segundo hasta años. Los organismos unicelulares también exhiben ritmos en la velocidad de fotosíntesis, metabolismo oxidativo, fototaxis, por mencionar algunos.^{2,3}

En 1981 se clasificó a los ritmos biológicos en tres grupos de acuerdo con la frecuencia de su oscilación: Los ritmos ultradianos, son ritmos de alta frecuencia y se presentan más de una vez en un día; los ritmos circadianos, tienen frecuencia similar a las 24 horas y los ritmos infradianos, son de baja frecuencia, es decir se presentan menos de una vez en 24 hrs.³ Algunos ejemplos de ritmos clasificados con este criterio se ven en la tabla 1.

Los ritmos biológicos más estudiados y más frecuentes en los organismos vivos son los ritmos circadianos, que se ajustan a las variaciones cíclicas del día y la noche.²

EL NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO: RELOJ CIRCADIANO MAESTRO.

La generación de ritmos circadianos es un proceso dependiente de un reloj interno.² En la actualidad se conoce muy bien que en los mamíferos el núcleo supraquiasmático del hipotálamo (NSQ), es el principal reloj circadiano, el cual genera y transmite señales de ritmicidad a otras zonas del cerebro y de ahí al resto del organismo.^{5,6} El NSQ se compone de aproximadamente 15,000 neuronas de las cuales, la mayoría generan y mantienen oscilaciones circadianas autosostenidas en su actividad eléctrica⁷, en la utilización de glucosa⁸ y en la expresión de genes⁹. Por medio de proyecciones a otras zonas cerebrales y el control de secreciones hormonales genera los ritmos bioquímicos, fisiológicos y conductuales en los mamíferos.¹⁰

EL ORDEN TEMPORAL INTERNO

El NSQ al transmitir a todo el organismo su señal de tiempo mantiene sincronizadas todas las funciones y la conducta para que oscilen con un orden de acuerdo a las fluctuaciones externas del día y la noche.^{11,12} Con ello se mantiene un "orden temporal interno" que permite el buen funcionamiento del cuerpo. Desde un punto de vista cronobiológico, el estado de normalidad (salud) se define como la correcta relación de fases tanto entre los ritmos

del propio organismo como entre éstos y el ciclo ambiental. (Fig.2) Para lo cual definimos fase como un momento dentro de una oscilación, de manera que el punto máximo de un ritmo es la acrofase, y se utiliza como punto de referencia de cada ciclo.² En condiciones normales de sincronización con el ciclo luz/oscuridad, cada ritmo circadiano del organismo asume una relación de fase estable con la señal de tiempo externa, además las diversas variables fisiológicas mantienen una relación de fase estable entre sí. Esta sincronía interna entre variables se mantiene aún en ausencia de estas señales de tiempo, gracias al reloj biológico: el núcleo supraquiasmático (NSQ), que mantiene una "oscilación libre o libre curso" (ausente de señales de sincronización); ejemplo en condiciones de oscuridad constante. Estudios en personas indican que en ausencia de sincronizadores, los ritmos de sueño/vigilia, de temperatura corporal, y de concentración plasmática de cortisol mantienen sus oscilaciones, aunque con ciclos más largos y manteniendo una relación de fase estable. Solamente en ocasiones en que la condición de libre curso se prolonga puede perderse la relación de fase.^{13,14} Al no depender de la presencia de un *zeitgeber*, este hecho sugiere la existencia de fuertes mecanismos de acoplamiento interno por parte del reloj hacia los demás tejidos osciladores.¹⁵⁻¹⁷

LA IMPORTANCIA DE ESTAR SINCRONIZADO

El ser humano es esencialmente diurno, está preferentemente activo durante el día, tomando las horas de descanso durante la noche.¹⁸

Las señales temporales que sincronizan al reloj biológico del ser humano son muy variadas. Las más evidentes son claves periódicas (de 24 horas) del ambiente, de las cuales la principal es el ciclo de día/noche y la temperatura; sin embargo, también influyen sobre el reloj señales sociales como la organización de horarios de trabajo, el esparcimiento, los horarios de comida y otros compromisos sociales, así como la propia actividad física del individuo.¹⁹ Por lo tanto, vivimos inmersos en una compleja estructura social que condiciona nuestra vida diaria.

El desarrollo de tecnología en comunicación, en la industria de alimentos así como en la prestación de bienes y servicios ha creado una relativa independencia de los eventos sociales del ambiente "natural", lo cual ha creado prioridad a estímulos artificiales que influyen sobre el reloj biológico.²⁰⁻²²

Un ejemplo de como la vida moderna provoca situaciones que producen alteraciones en la sincronización son los cambios bruscos en el ambiente (vuelos de larga duración, turnos de trabajo rotatorios, trabajo nocturno, etc.) que causan alteraciones sobre el reloj biológico y la expresión de los ritmos circadianos.²³⁻²⁷ Estas alteraciones desajustan el

orden temporal interno, que deja secuelas crónicas en la salud y la integridad mental de las personas.^{18,29,29}

DESINCRONIZACIÓN POR VIAJES AÉREOS TRANSMERIDIONALES (Jet Lag)

Los que habitamos este planeta sabemos que los tiempos y hábitos que desaxrollamos están condicionados por nuestra localización geográfica. Aquellos que hayan volado cruzando meridianos debieron ajustar sus relojes pulsera para ser coherentes con el lugar de destino, adelantando o atrasando las agujas del reloj.³⁰ Paralelamente, el reloj biológico experimenta la necesidad de realizar el mismo ajuste, que no se logra de manera inmediata. En consecuencia las distintas variables circadianas comprometidas en los procesos de oscilación del cuerpo exhiben respuestas transitorias de ajuste distintas para cada sistema: por ejemplo, los ritmos de frecuencia cardiaca, presión arterial, actividad locomotora, catecolaminas plasmáticas; entre otros, se sincronizarán más rápidamente que los ritmos de temperatura, melatonina desechos urinarios y cortisol plasmático.^{31,32}

La diferente capacidad de ajuste de cada órgano causa temporalmente una pérdida del orden temporal interno entre los osciladores periféricos, resultando una pérdida de las relaciones de fase, normalmente estables.³³ Gradualmente y a diferentes velocidades se restablecen las relaciones de fase de los ritmos entre sí y con el nuevo horario.^{34,35} Por lo tanto el jet-lag

resultante de viajes transmeridionales ocurre cuando ciertos ritmos biológicos se encuentran fuera de fase entre sí y fuera de fase con el ciclo del día y la noche.^{5,16} En el jet-lag se produce un conflicto transitorio entre el tiempo "interno" y el tiempo "externo"; lo cual se denominada *desincronización interna*.^{36,37} (Fig. 2)

La desincronización interna tiene como consecuencia un deterioro general y transitorio de todas las funciones mentales y es la causa del malestar general que reportan muchos viajeros.^{38,39} Las consecuencias de los vuelos transmeridianos son mucho cansancio durante el día, menor grado de concentración y alerta, desorientación, "destemporalización", así como irritabilidad y depresión.^{40,41} Son frecuentes también los *desórdenes* gastrointestinales derivados de la ingestión de alimentos en un horario inusual, tales como indigestión, diarrea, constipación, acidez estomacal y riesgo de úlceras gástricas y duodenales. Este estado de desincronización interna es transitorio y depende del número de husos horarios que se hayan pasado. Se ha descrito que la recuperación es más rápida cuando se viaja hacia el oeste y se presenta un atraso de fase, que cuando se viaja hacia el este y se requiere un adelanto de fase.⁴⁰ Las consecuencias más graves se observan en personas que viajan constantemente y que el tiempo entre un viaje y otro no permite la resincronización interna. Estas personas se caracterizan por estados crónicos de cansancio,

dificultad en la concentración, irritabilidad y menor grado de alerta durante el día, así como amnesia temporal, debilidad general y ansiedad.²⁸

LA DESINCRONIZACIÓN EN TRABAJADORES EN TURNOS (Shiftwork)

Desde hace varios siglos, ya existían jornadas de trabajo diurnas y nocturnas, especialmente en las actividades industriales extractivas y de los servicios de salud. En 1556, el médico Georg Bauer, describió en su libro "De Re Metallica", las dificultades de salud por las que pasaban los mineros del tercer turno (o turno nocturno). Escrito hace 443 años, este libro relata una situación que ocurre actualmente sólo que ahora en proporciones mayores.⁴¹

El trabajo rotatorio o en turnos es una modalidad de organización laboral imprescindible para cualquier sociedad moderna. Se estima que en la actualidad un 20% de la población laboral realiza algún tipo de trabajo en turnos en variadas áreas, que comprenden tanto al sector de servicios como al industrial.⁴² Las proyecciones indican que para la segunda década del siglo XXI aproximadamente un 40% de la población activa realizará alguna forma de trabajo en turnos.⁴³

El trabajo por turnos supone el trabajo fuera de las horas normales del día; es decir que los trabajadores por turnos pueden trabajar por la tarde, a la mitad de la noche, trabajar horas

extras o días muy largos; también pueden trabajar algunas veces en horario normal. Muchos trabajadores por turnos tienen horarios rotatorios, lo que supone cambios de las horas de trabajo de la mañana a la tarde o del día a la noche. Estos cambios ocurren en días diferentes de una semana o en un mes. Los policías y los bomberos, por ejemplo, a menudo tienen calendarios de trabajo que rotan. Otros trabajadores pueden trabajar un turno "permanente" y trabajar solamente por la noche o por la tarde. Por lo tanto los turnos de trabajo pueden ser de 8 o de 12 horas, o bien de 24 x 24 horas. Los turnos pueden ser rotatorios (la situación más común), fijos, o una mezcla de ambos.⁴³

Desde el punto de vista cronobiológico, y cualquiera que sea el esquema de trabajo en turnos que se adopte, se produce siempre una reducción de las horas de sueño y una alteración de los ritmos circadianos. Esto lleva a una situación de cansancio y de estrés crónico en el trabajador de turnos rotatorios, que se asocia a tres factores principales: (a) la alteración de los ritmos circadianos; (b) la fatiga y la alteración del sueño; (c) las alteraciones de la vida de relación doméstica y social.⁴³

Con relación a los ritmos circadianos, el turno de trabajo requiere, en general, que un individuo esté alerta cuando su sistema circadiano señala el reposo, lo cual es un momento inadecuado de su ciclo sueño-vigilia.^{44,45} Debido a el proceso de ajuste del sistema circadiano al cambio repentino de horario en

el nuevo turno es lento y requiere una semana aproximadamente (un día por cada hora de diferencia entre turnos) el trabajador nocturno está en general desincronizado.^{46,47} La presencia de sincronizadores externos (el día y la noche) en antagonismo con el requerimiento impuesto por los turnos (una sociedad diurna para individuos que quieren conciliar el sueño durante el día), afecta negativamente a la adaptación.

Un 60-70% de los trabajadores en turnos se queja de alteraciones del sueño y de fatiga aumentada durante el turno nocturno. Es común, que el trabajador lo atribuya a la falta de sueño. Una consecuencia extrema de la privación de sueño es la llamada "parálisis nocturna", episodios de 1-2 minutos de duración, en los cuales los individuos están conscientes de lo que ocurre a su alrededor pero son incapaces de actuar. Esto explica tanto incidentes menores como accidentes de trabajo graves (de clara predominancia nocturna), así como tragedias industriales del tipo de Chernobyl o el derrame petrolero del Exxon Valdez.^{3,48}

El sueño en un trabajador en turnos puede estar alterado tanto por factores endógenos como exógenos.^{3,49} Los factores endógenos provienen del sistema circadiano, preparado para el despertar en el momento que el trabajador de turno nocturno pretende tener su descanso.^{50,51} Es común, que el trabajador atribuya su falta de descanso al ruido del tráfico, los gritos de los niños, etc., sin percibir que, en realidad, es su sistema circadiano que indica

dormir de noche y actividad de día, el responsable de los trastornos de sueño. Esto conduce a una inadecuación social y doméstica, al impedir al trabajador cumplir adecuadamente con sus obligaciones familiares y sociales. En este sentido, los conflictos sociales y familiares, por ejemplo la incidencia de divorcios, es significativamente mayor en personas que realizan trabajo en turnos.

Con relación a las secuelas en la salud producidas por el trabajo en turnos, existe un aumento significativo en el número de consultas médicas y bajas por enfermedad en este grupo de trabajadores. Las quejas más comunes son el cansancio, la fatiga, irritabilidad, aumento del consumo de medicamentos, alteraciones menstruales, etc.⁵² Otras alteraciones específicas más comunes son la ganancia de peso,⁵²⁻⁵⁵ las alteraciones gastrointestinales, comprendiendo a las gastritis en todas sus variantes y a la úlcera gastroduodenal; en segundo término, las alteraciones cardiovasculares⁵⁶ y cáncer de mama en mujeres.^{15,26,44,57} (Fig. 3). En distintos estudios, a partir de los 5 años de exposición al trabajo en turnos, estas alteraciones aparecen con mayor incidencia que en la población general.⁴⁸

La demanda social creciente del trabajo en turnos, hace necesario tomar decisiones sobre las características y tipos de turnos a realizar, pero hasta el momento sigue siendo un grave problema laboral.

ALTERACIONES DE LOS RITMOS BIOLÓGICOS POR VEJEZ

Un factor determinante en el funcionamiento del reloj biológico y la expresión de los ritmos circadianos es la edad. Al envejecer se observan cambios generales en las funciones del reloj biológico que se manifiestan en pérdida de la amplitud de los ritmos y a mostrar inestabilidad en la sincronización día a día (o sea una menor precisión del reloj para ajustarse al día solar). Se produce además una pérdida en la capacidad de respuesta y ajuste a cambios impuestos sobre el reloj, como los producidos por el trabajo en turnos rotatorios y por los vuelos transmeridionales.^{40,41,58} Se cree que estas alteraciones asociadas al envejecimiento se deben directamente al deterioro del reloj, cuyas células componentes son neuronas y como tales son incapaces de reproducirse. Un reloj joven y bien constituido, y sus correctas conexiones es capaz de generar ritmos robustos de gran amplitud, esto es con diferencias significativas entre los valores mínimos y los máximos; mientras que la fuerza de un reloj envejecido decrece junto con la amplitud de los ritmos que controla. La amplitud es un indicador de la "fuerza del oscilador" o de la resistencia ante manipulaciones exógenas.²¹ De modo que, los ritmos de menor amplitud de los ancianos indican una menor capacidad de transmitir y controlar la ritmicidad del cuerpo.⁵⁹ El mal funcionamiento del reloj biológico se hace

evidente en la fragmentación producida entre las fases del ritmo de sueño/vigilia manifestándose sueños cortos durante el día e interrupciones y decrementos del sueño nocturno.³ (Fig.4) En las personas de mayor edad los síntomas del jet-lag se intensifican y el tiempo de adaptación suele dilatarse. Estos hechos son consecuentes con el envejecimiento, existiendo una mayor tendencia a la desincronización interna^{5,41,60} que en ocasiones lleva a la desaparición de ciertas funciones circadianas. Existen algunos estudios sobre ritmos y envejecimiento que sugieren un reloj más rápido en su funcionamiento, lo que explicaría tal vez la tendencia de los mayores para acostarse y levantarse temprano.⁶¹

MEDIDAS PARA EVITAR O REMEDIAR LA DESINCRONIZACIÓN INTERNA.

Debido a que el estilo de vida moderno impone cada vez más las actividades en contraposición a las señales naturales del día y la noche, surge la necesidad de ofrecer alternativas para aliviar los malestares asociados a una desincronización interna y sobretodo para evitar enfermedades.

Para mejorar la calidad del sueño, se ofrecen terapias para la organización de una rutina de sueño en particular para aquellos trabajadores en turnos nocturnos. Las siestas breves, durante el turno prolongado, mejoran el rendimiento laboral; las siestas previas al turno de noche, también mejoran la adaptación. En

diversos estudios, el uso de la melatonina ha sido beneficioso para facilitar el proceso de reposo en horarios no adecuados para el sueño, como cuando se requiere dormir por la mañana después de la jornada de trabajo nocturno.^{62-64.}

Asimismo tanto en estudios en el lugar de trabajo como en estudios de trabajo en turnos simulados, la exposición a luz intensa durante el horario de trabajo (fototerapia), y el descanso en cámaras oscuras, favorecen la resincronización de los ritmos y mejoran la calidad del sueño.^{65,66} Tanto la modificación del ambiente luminoso laboral como el uso de la melatonina serán, probablemente, los recursos de elección en los próximos años, para minimizar las consecuencias de una "Sociedad de 24 Horas", sin descanso nocturno, a la que se enfrentará el hombre en el siglo XXI.

REFERENCIAS

1. Golombek D. CRONOBIOLOGIA HUMANA: ritmos y relojes biológicos en la salud y en la enfermedad. Editorial Universidad Nacional de Quilmes. Bernal, Buenos Aires, Argentina. 2007.
2. Gruart A, Delgado JM, Escobar C y Aguilar R. Los relojes que gobiernan la vida. Fondo de cultura económica, 2002.
3. Duniap J., Jennifer Loros, De Coursey P.J. Crhronobiology. Biological timekeeping. Sinauer Associates, Inc Publishers. Sunderland Massachusetts, USA. 2004.
4. Aschoff J. Circadian Rhythms in Man. Science. 1965. Jun 11; 148:1427-32.
5. Buijs RM, la Fleur SE, Wortel J, Van Heyningen C, Zuiddam L, Mettenleiter TC, Kalsbeek A, Nagai K, Mijijima A. The suprachiasmatic nucleus balances sympathetic and parasympathetic

output to peripheral organs through separate preautonomic neurons. J Comp Neurol. 2003;464(1):36-48.

6. Hastings MH, Reddy AB, Maywood ES. A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease. Nat Rev Neurosci. 2003; 4(8):649-61.

7. Welsh DK, Logothetis DE, Meister M, Reppert SM. Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. Neuron, 1995; 14(4):697-706.

8. Schwartz WJ, Gross RA, Morton MT. The suprachiasmatic nuclei contain a tetrodotoxin-resistant circadian pacemaker. Proc Natl Acad Sci 1987;Mar;84(6):1694-8.

9. Yamauchi S, Isejima H, Matsuo T, Okura R, Yagita K, Kobayashi H, Okamura H: Synchronization of cellular clocks in the suprachiasmatic nucleus. Science 2003; 21;(302):1408-12.

10. Klein DC, Moore RY, Reppert SM. The mind's clock. NY: Oxford University Press, 1991.

11. Klerman EB, Rimmer DW, Dijk DJ, Kronauer RE, Rizzo JF, Czeisler CA. Non-photic entrainment of the human circadian pacemaker. Am J Physiol. 1998;274:991-6.

12. Stephan FK. The "other" circadian system: food as a Zeitgeber. J Biol Rhythms. 2002;17(4):284-92.

13. Minors DS, Waterhouse JM. Anchor sleep as a synchronizer of rhythms on abnormal routines. Int J Chronobiol.1981;7(3):165-88.

14. Healy D, Waterhouse JM. The circadian system and the therapeutics of the affective disorders. Pharmacol Ther. 1995;65(2):241-63.

15. Knutson KL, Spiegel K, Penev P, Van Cauter E. The metabolic consequences of sleep deprivation. Sleep Med Rev. 2007;11(3):163-78.

16. Lavie, P. Sleep-wake as a biological rhythm. Annu Rev Psychol 2001; 52,277-303.

17. Mistlberger RE, Skene DJ. Nonphotic entrainment in humans? J Biol Rhythms.2005;4:339-52.

18. Pearson H. Medicine: Sleep it off. *Nature* 2006;443 (7109): 245 - 370.
19. Mrosevsky N. Locomotor activity and non-photic influences on circadian clocks. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 1996;3:343-72.
20. Waterhouse, J.; Minors, D.; Folkard, S. Lack of evidence that feedback from lifestyle alters the amplitude of the circadian pacemaker in humans *Chronobiol Int.* 1999 Jan;16(1):93-107.
21. Waterhouse J, Reilly T, Atkinson G, Edwards B. Jet lag: trends and coping strategies *Lancet* 2007; 369 (9567):1117-29.
22. Winget, C.M., De Roshia, C.W., Markley, C.L., Holley, D.C. A review of human physiological and performance changes associated with desynchronizes of biological performance. *Aviat Space Environ Med.*, 2006; 55: 1085-1096.
23. Nagano M, Adachi A, Nakahama K, Nakamura T, Tamada M, Meyer-Bernstein E, Sehgal A, Shige-yoshi Y. An abrupt shift in the day/night cycle causes desynchrony in the mammalian circadian center. *Journal of Neuroscience* 2003;23(14):6141-51.
24. Ribeiro DC, Hampton SM, Morgan L, Beacon S, Arendt J. Altered postprandial hormone and metabolic responses in a simulated shift work environment. *J. Endocrinol.* 1998;158(3):305-10.
25. Spiegel K, Weibel L, Gronfier C, Brandenberger G, Follenius M. Twenty-four-hour prolactin profiles in night workers. *Chronobiol Int.* 1996;13(4):283-93.
26. Salgado-Delgado R, Angeles-Castellanos M, Buijs R. and Escobar C. Internal desynchronization in a model of night-work by forced activity in rats. *Neuroscience.* 2008; 154 922-931
27. Van Cauter E, Holmbäck U, Knutson K. Impact of Sleep and Sleep Loss on Neuroendocrine and Metabolic Function *Hormone Research* 2007;67 (Suppl. 1):2-9.
28. Spiegel, D., Sephton, S. Night shift work, light at night, and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2002; 94,530-533.
29. Weitzman E. Biologic rhythms and hormone secretion patterns. *Hosp Pract.* 1976; 11(8):79-86.
30. Spitzer, R.L., Terman, M., Terman, J., Williams, J.B. Columbia jet lag scale. *Biometrics Research, NY State Psychiatric Institute.* 1997

31. Graeber, R.C. Jet lag and sleep disruption. En Kryger, M.H., Roth, T., Dement, W.C. (Eds.). *Principles and practice of sleep medicine.* Philadelphia: WB Saunders.1989.
32. Winget Cm, Deroshia Cw, Markley DC. Review of human physiological and performance changes associated with desynchronizes of biological rhythms. *Aviat Space Environ Med.* 1984;55(12):1085-96.
33. Gander P.H., Kronauer R.E., Graeber R.C. Phase shifting two coupled circadian pacemakers: implications for jet lag. *Am J Physiol.* 1985; 249: R704-R719.
34. Dawson D., Encel N., Lushington K. Improving adaptation to simulated night shift: timed exposure to bright light versus daytime melatonin administration. *Sleep* 1995; 18, 11-21.
35. Reddy AB, Field MD, Maywood ES, Hastings MR. Differential resynchronisation of circadian clock gene expression within the suprachiasmatic nuclei of mice subjected to experimental jet lag. *J Neuroscience,* 2002; 22(17):7326-30.
36. Cardinali, D. Cronobióticos: cómo mover los engranajes del reloj biológico. *Scientific American Latinoamérica* 2002; 1,43-49.
37. Mellor E. F. Shift work and flextime: How prevalent are they? *Monthly Labor Review* 1996; 109:14-21.
38. Reilly, T., Atkinson, G., Waterhouse, J. *Biological rhythms and exercise.* Oxford: Oxford University Press, 1997.
39. Wright, J.E., Vogel, J.A., Sampson, J.B., Knappik, J.J., Patton, J.F., Daniels, W.L. Effects of travel across time zones (jet lag) on exercise capacity and performance. *Aviat Space Environ Med.*, 2005; 54:132-137.
40. Moline, M.L., Pollack, C.P., Monk, T.H. Age-related differences in recovery from simulated jet lag. *Sleep*, 1992; 15: 8-40.
41. Touitou, Y. Some aspects of the circadian time structure in the elderly. *Gerontology* 1982; 1: 53-67.
42. Knutson A. Health disorders of shift workers *Occupational Medicine* 2004; 53:103-108.
43. Golombek D. Cronobiología Humana: en busca del tiempo perdido. *Ciencias,* 2001; abril-junio 62:38-44.

44. Weibel L, Spiegel K, Follenius M, Ehrhart J, Brandenberger G. Internal dissociation of the circadian markers of the cortisol rhythm in night workers. *Am J Physiol*, 1996;270:608-13.

45. Weibel L, Spiegel K, Gronfier C, Follenius M, Brandenberger G. Twenty-four-hour melatonin and core body temperature rhythms: their adaptation in night workers. *Am J Physiol*. 1997; 272:948-54.

46. Weibel L and Brandenberger G. Disturbances in Hormonal Profiles of Night Workers during Their Usual Sleep and Work Times. *Journal of Biological Rhythms* 1998; 13:3.

47. Simon, C., L. Weibel, And G. Brandenberger. Twentyfour- hour rhythms of plasma glucose and insulin secretion rate in regular night workers. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2000;278: 413-420.

48. Akerstedt T, Kecklund G, and Johansson S. Shift work and mortality. *Chronobiol Int.* 2004; 21(6):1055-61.

49. Brandenberger G. and Weibel L. The 24-h growth hormone rhythm in men: sleep and circadian influences questioned, *J. Sleep Res.* 2004;13: 251-255.

50. Buijs RM, Kalsbeek A. Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nat Rev Neurosci.* 2001;2(7):521-6.

51. Van Reeth D. Sleep and Circadian Disturbances in Shift Work: Strategies for Their Management . *Hormone Res*,1998;49 :158-162.

52. Karlsson B, Knutsson A, Lindahl B. population based study of 27485 people having a metabolic syndrome? Results from a Is there an association between shift work and nighwork. *Occup Environ Med.* 2005; 72:427-32.

53. Bartol-Munier, Gouxmelen S, Pevet P, Challet E. Combined effects of high-fat feeding and circadian desynchronization. *Int J Obes* 2006; 30(1):60-7.

54. Gangwisch JE, Malaspina D, Boden-Albala B, Heymsfield SB. Inadequate sleep as a risk factor for obesity: analyses of the NHANES. *Sleep.* 2005;28(10):1289-96.

55. Karlsson B, Knutsson A, Lindahl B. Is there an association between shift work and having a metabolic syndrome? Results from

a population based study of 27,485 people. *Occup Environ Med.* 2001;58(11):747-52.

56. Boggild H, Knutsson A. Shift work, risk factors and cardiovascular disease. *Scand J Work Environ Health.* 1999; 25(2):85-99.

57. Davis S, Mirick DK, Stevens RG. Night shift work, light at night, and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93(20):1557-62.

58. Gander P., Nguyen D., Rosekind M., Connell L. Age, circadian rhythms, and sleep in flight crews. *Aviat Space Environ Med.* 1993; 64:89-95.

59. Reid K, Dawson D. Comparing performance on a simulated 12 hour shift rotation in young and older subjects *Occup Environ Med* 2001; 58:58-62.

60. Weber RA. Influence of physical workload on freerunning circadian rhythms of man. *Pluegers Arch.* 1979;381(2):119-26.

61. Guignard MM, Pesquies PC, Serrurier BD, Merino DB, Reinberg AE. Circadian rhythms in plasma levels of cortisol, dehydroepiandrosterone, delta 4-androstenedione, testosterone and dihydrotestosterone of healthy young men. *Acta ndocrinol* 1980;94(4):536-45.

62. Deacon S., Arendt J. Adapting to phase shifts, I. An experimental model for jet lag and shift work. *Physiol Behav* 1996; 59,665-673.

63. Folkard S., Arendt J., Clark M. Can melatonin improve shift workers' tolerance of the night shift? Some preliminary findings. *Chronobiol Int* 1993; 10, 315-320.

64. Dunlap J. Molecular Bases for Circadian Clocks. *Cell*, 1999;96, 271-290, January 22.

65. Chiesa J., Golombek D. Fisiología de la Desincronización por Vuelos Transmeridianos de Larga Duración (Jet-Lag) *Actas de Fisiología*, 1999; 5: 21-36.

66. Haus E, Smolensky M. Biological clocks and shift work: circadian dysregulation and potential long-term effects. *Cancer Causes Control* 2006;17:489-500.

Figura 1.

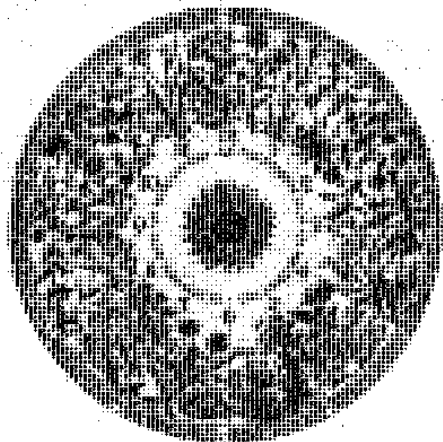


Fig. 1. El reloj floral de Linneo, con el cual puede saberse la hora (entre las 6 AM y las 6 PM) de acuerdo a qué flores están abiertas o cerradas en el campo.

Tabla 1

<i>Tipo de ritmo</i>	<i>Periodo</i>	<i>Ejemplo</i>
Ultradiano	0.1 seg	Electroencefalograma
	1 seg	Ritmo cardiaco
	6 seg	Ritmo respiratorio
	60 min	Secreciones hormonales
	90 min	Alternancia de estados de sueño
Circadiano	24 h	Actividad-reposo Temperatura corporal
Infradiano	28 días	Ciclo menstrual
	365 días	Hibernación

Tabla 1. Periodo de los ritmos biológicos clasificados de acuerdo a su frecuencia.

Figura 2

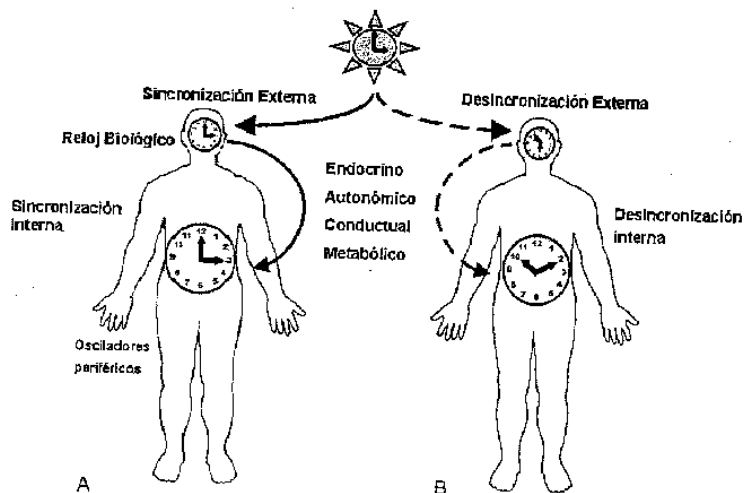


Fig.3. Representación esquemática de un individuo sincronizado con su ambiente (sano) (A) y otro desincronizado (enfermo) (B). En A, la línea continua representa una correcta relación de fase del reloj biológico (NSQ) con el medio ambiente conocida como sincronización externa y la correcta relación de fase del reloj con sus osciladores periféricos conocida como sincronización interna. En B. La línea discontinua representa un individuo con desincronización externa, es decir no existe una relación de fases del NSQ con el medio ambiente. En la desincronización interna se plantea que existe una correcta relación entre el reloj y el medio externo, pero una alteración en la salida de señales rítmicas del reloj hacia el resto del organismo, que da como consecuencia un desacoplamiento del organismo con su propio reloj.

Figura 3

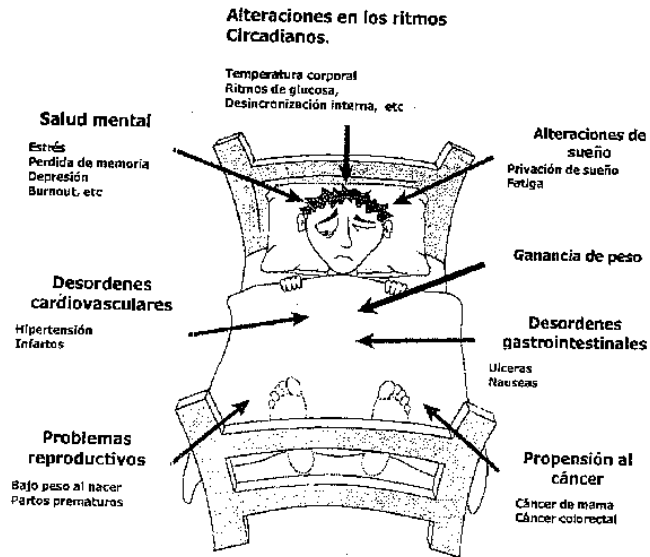


Fig. 3. Las secuelas en la salud producidas por el trabajo en turnos son variadas, esta figura resume las alteraciones en la salud más comunes. (Modificado. Nature Reviews, vol 6 may 2005).

Figura 4

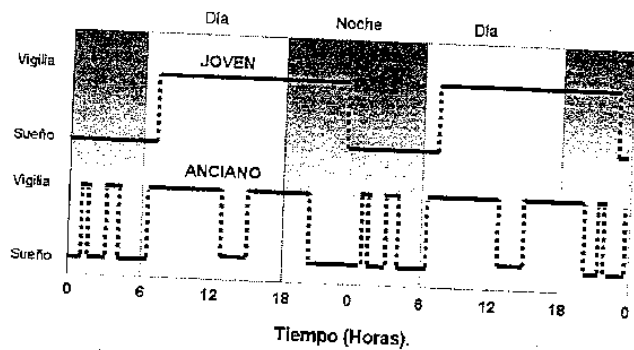


Fig.4. Cambios en el ciclo de sueño-vigilia con el envejecimiento. Con la edad aumentan los despertares nocturnos, lo que supone una mayor fragmentación del sueño y somnolencia diurna. Además se produce un avance de fase, es decir, se adelanta la hora de inicio del sueño y del despertar.

EXPECTANCY FOR FOOD OR EXPECTANCY FOR CHOCOLATE REVEALS TIMING SYSTEMS FOR METABOLISM AND REWARD

M. ÁNGELES-CASTELLANOS,^a
R. SALGADO-DELGADO,^a K. RODRÍGUEZ,^a
R. M. BUIJS^b AND C. ESCOBAR^{a*}

^aDepartamento de Anatomía, Edificio B 4º Piso, Fac de Medicina Universidad Nacional Autónoma de México, México DF 04510, México

^bDepartamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas Universidad Nacional Autónoma de México, México DF 04510, México

Abstract—The clock gene protein *Per 1* (*PER1*) is expressed in several brain structures and oscillates associated with the suprachiasmatic nucleus (SCN). Restricted feeding schedules (RFS) induce anticipatory activity and impose daily oscillations of c-Fos and clock proteins in brain structures. Daily access to a palatable treat (chocolate) also elicits anticipatory activity and induces c-Fos expression mainly in corticolimbic structures. Here the influence of daily access to food or chocolate was explored by the analysis of the oscillatory patterns of *PER1* in hypothalamic and corticolimbic structures. Wistar rats were exposed to RFS or to daily access to chocolate for 3 weeks. Persistence of food or chocolate entrained rhythms was determined 8 days after cessation of the feeding protocols. RFS and chocolate induced a phase shift in *PER1* rhythmicity in corticolimbic structures with peak values at zeitgeber time 12 and a higher amplitude in the chocolate group. Both RFS and chocolate groups showed an upregulation of *PER1* in the SCN. Food and chocolate entrained rhythms persisted for 8 days in behavior and in *PER1* expression in the dorsomedial hypothalamic nucleus, accumbens, prefrontal cortex and central amygdala.

The present data demonstrate the existence of different oscillatory systems in the brain that can be activated by entrainment to metabolic stimuli or to reward and suggest the participation of *PER1* in both entraining pathways. Persistence and amplification of *PER1* oscillations in structures associated with reward suggest that this oscillatory process is fundamental to food addictive behavior. © 2008 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: food-entrainment, reward, clock genes, suprachiasmatic nucleus, hypothalamus, addiction.

Circadian rhythms are driven by the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus (SCN), and are coupled to the light dark cycle (Klein et al., 1991). Time keeping mecha-

nisms in the SCN are driven by a set of clock genes (*per1*, *per2*, *per3*, *cry1*, *cry2*, *clock* and *bmal1*), which transcription/translation cycles produce oscillations with a 24 h cycle (Dunlap, 1999; Okamura, 2004). Other brain structures and peripheral tissues also express clock genes in a circadian manner and their oscillations are mainly driven directly or indirectly by the SCN (Guo et al., 2005; Buijs and Kalsbeek, 2001). The detection of clock genes or the resulting proteins in the brain as well as in peripheral organs has indicated that the circadian system consists of multiple oscillators. Interestingly, when food is restricted to a few hours daily, mealtime not only exerts a powerful entraining force on metabolic functions (Escobar et al., 1998; Satch et al., 2006) but also entrains clock gene expression in peripheral oscillators and uncouples their daily rhythm from the SCN (Damiola et al., 2000; Hara et al., 2001; Stokkan et al., 2001). Moreover this, restricted feeding schedule (RFS) at a predictable time elicits food anticipatory activity (FAA) characterized by behavioral arousal and increased locomotor activity 2–3 h prior to mealtime.

RFS induces c-Fos expression in hypothalamic regions involved in mediating metabolic and arousal signals to the rest of the brain (Ángeles-Castellanos et al., 2004; Gooley et al., 2006; Meynard et al., 2005). In addition, c-Fos is induced in corticolimbic structures involved in hedonic and motivational processes (Ángeles-Castellanos et al., 2007; Mendoza et al., 2005). RFS entrain daily cycles of *per1* and *per2* products in the dorsomedial nucleus of the hypothalamus (DMH) (Mieda et al., 2006) and in structures of the corticolimbic system (Ángeles-Castellanos et al., 2007; Verwey et al., 2007; Waddington Lamont et al., 2007; Wakamatsu et al., 2001) indicating that RFS is able to induce daily oscillations in brain systems involved in energy homeostasis and motivation for food.

Motivational factors involved in food entrainment can be dissected from homeostatic factors by providing to rats fed *ad libitum* daily at a fixed time a piece of chocolate, sucrose or sweet milk (Mistlberger and Rusak, 1987; Abe and Rusak, 1992; Mendoza et al., 2005). This procedure does not induce a negative metabolic state in the rats or a cycle of daily fasting–feeding alternation. Daily scheduled access to chocolate elicits anticipatory activity of short duration and elicits c-Fos expression in corticolimbic structures and not in hypothalamic nuclei (Mendoza et al., 2005), indicating that a daily rewarding stimulus is sufficient to elicit behavioral expectations and to induce strong anticipatory neuronal activation in corticolimbic structures.

The present study was designed to determine whether a daily predictable palatable treat entrains oscillations in

*Corresponding author. Tel: +55-5623-2422; fax: +55-5623-2425. E-mail address: escocarolina@gmail.com (C. Escobar).

Abbreviations: Acc, nucleus accumbens; Acc-Core, nucleus accumbens sub-region core; Acc-Shell, nucleus accumbens sub-region shell; AL, *ad libitum* group; ARC, arcuate nucleus; BLA, basolateral amygdala; CeA, central amygdala; CH, chocolate entrainment group; DMH, dorsomedial hypothalamic nucleus; FAA, food anticipatory activity; FE, food entrainment group; LD, light/dark; PeF, perifornical area; *PER1*, protein *Per1*; PFC, prefrontal cortex; PVT, paraventricular thalamic nucleus; RFS, restricted feeding schedules; SCN, suprachiasmatic nucleus; VMH, ventromedial nucleus; ZT, zeitgeber time.

similar brain areas as those entrained by RFS. Therefore expression of the clock gene protein *Per1* (*PER1*) was used as indicator of such daily temporal activation. In order to demonstrate the endogenous nature of this oscillation and to reject that temporal patterns were elicited by the daily stimulus, persistence of the temporal patterns was explored in food and chocolate entrained rats 8 days after interruption of the entraining protocol. The present data indicate that corticolimbic structures contain circadian oscillators mainly driven by the reward of chocolate, while hypothalamic oscillations are specifically driven by food.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals and general housing conditions

Adult male Wistar rats weighing between 250 and 300 g at the beginning of the experiment were housed in individual transparent acrylic cages and were maintained in isolated lockers in a sound-proof monitoring room with a 12-h light/dark (LD) cycle (lights-on at 06:00 h defined as zeitgeber time (ZT) 0), constant temperature (24 ± 1 °C), circulating air and free access to food (Rodent Laboratory Chow 5001; Purina, Minnetonka, MN, USA) and water, unless otherwise stated. Experimental procedures were approved and conducted according to the ethical committee at the Medical Faculty UNAM, Mexico. Experiments conformed to international guidelines on the ethical use of animals; procedures were aimed at minimizing the number of animals used and their suffering.

Groups and food entrainment

After 2 weeks' acclimatization in the monitoring cages rats were randomly assigned to one of three groups: *ad libitum* feeding control (AL; $n=24$), food entrainment (FE; $n=24$) or chocolate entrainment (CH; $n=24$). The FE group had access to food for 2 h/day, from 12:00 to 14:00 h (ZT6–ZT8). Rats assigned to the CH group, had always free access to food and received daily at ZT6, 5 g of a commercial chocolate bar containing 10% of proteins, 51% of carbohydrates and 34% fat for a caloric value of 550 kcal/100 g. After 2 weeks in the feeding schedule rats were anesthetized and perfused at one of four temporal points to complete a 24 h cycle: ZT0, ZT6, ZT12 and ZT18 (ZT0 denotes time of lights on). Four of the control and FE subjects included were used for a prior study (Angeles-Castellanos et al., 2007), however two additional subjects were included for each group and temporal point to replicate our previous findings, thus resulting six subjects per temporal point.

In order to explore persistence of the food and chocolate entrained patterns 16 additional rats were randomly assigned to a food (FE-P; $n=8$) or chocolate (CH-P; $n=8$). Entrainment group and were exposed to the same monitoring conditions and entrainment protocol, as described. After 2 weeks' RFS, rats were left *ad libitum* for 5 days followed by 3 days in fasting and for CH rats the delivery of the palatable treat was interrupted and rats were left *ad libitum*. On day 8 after cessation of entraining protocol rats were perfused at two time points ZT6 and ZT12 (low and high point of the daily curve, respectively).

General activity monitoring system

For behavioral monitoring rats were placed in individual transparent acrylic cages (45 × 30 × 35 cm) positioned on plates with movement sensors in soundproof lockers housing eight cages and controlled lighting conditions. Experimental groups were maintained in separate lockers in order not to influence mutual behavior.

The detection system was developed in our group with the contributions from Nico Bos in Amsterdam the Netherlands and

the Mexican biomedical company Omniaiva. Sensors placed under the cages detect continuously general activity. Behavioral events were collected with a digitized system and automatically stored every minute in a PC for further analysis with a system developed for our laboratory SPAD9 based on Matlab.

Double-plotted actograms were obtained by organizing activity counts in 15 min intervals with the SPAD9. Due to different detection threshold among sensors, movement counts were normalized to the proportional percentage of the daily activity. Mean activity waveforms were constructed for the baseline and for the last 8 days of food or chocolate entrainment. In order to determine persistence of behavioral patterns activity, wave forms were constructed for the FE group with data for the 2 days in fasting (persistence) or for the CH group with data of the following 5 days in *ad libitum* feeding after interrupting chocolate delivery.

The intensity of FAA was calculated by totaling the normalized counts of activity displayed by the rats 1 h before meal or chocolate time. The intensity of persistence was estimated in fasting (FE; 2 days) or *ad libitum* (CH; 5 days) for the same 1 h interval. Activation in both conditions was compared with the expected activity during basal conditions.

Immunohistochemistry

Rats were anesthetized with an overdose of sodium pentobarbital (Sedal-Vet 65 mg/ml), and were perfused transcardially with 250 ml of 0.9% saline followed by 250 ml of fixative 4% paraformaldehyde in phosphate buffer saline (PBS, 0.1 M, pH 7.2). Brains were removed, postfixed for 24 h and cryoprotected in 30% sucrose for 3–4 days. Brains were frozen and cut in sections of 40 μ m at -18 °C. Sections were serially collected in four series. The first series was processed for *PER1* immunohistochemistry. Free floating sections were incubated in *PER1* antibody raised in goat (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) for 72 h at 4 °C. This was followed by incubation in secondary antibody (rabbit anti-goat; Vector Laboratories) 1:200 in PBSGT for 2 h at room temperature, followed by incubation in avidin-biotin complex (0.9% avidin and 0.9% biotin solutions; Vector Laboratories) in PBSGT for 2 h at room temperature. Tissue was then reacted in diaminobenzidine (0.5 mg/ml, in Trizma buffer 7.2) with hydrogen peroxide (35 μ l, 30% H_2O_2), mounted, dehydrated and coverslipped with mounting medium for microscopy (Estellanzew; Merck cat. HX614429). Brains of the three groups and for different time points were processed simultaneously in order to standardize the intensity of the staining and background.

Cell count

In order to quantify *PER1* positive cells in hypothalamic and forebrain areas, one representative section for each structure was selected in accordance with the stereotaxic atlas from Paxinos and Watson (1998). In the hypothalamus the expression of *PER1* in the SCN was quantified at the level of bregma -1.30 , while the number of *PER1* positive cells in the DMH, the ventromedial nucleus (VMH), the perifornical area (PeF) and the arcuate nucleus (ARC) was quantified in a posterior section (bregma -3.30). For corticolimbic areas we analyzed the prefrontal cortex (PFC) at the level of bregma 2.70 and the nucleus accumbens (Acc). Subdivided and evaluated in two sub-regions core (Acc-Core) and shell (Acc-Shell) at bregma 2.20. The paraventricular nucleus of the thalamus (PVT) was analyzed in two levels bregma -1.40 and -1.80 ; and the amygdala subdivided in basolateral (BLA) and central (CeA) was analyzed at the level of bregma -2.80 .

Images of selected sections were obtained with a 20X ocular using a computerized image system (Image-Pro plus 5.1; mediaCibernetic) attached to a light microscope (Olympus BX41). Cells positive to *PER1* were counted bilaterally in the selected section with the image processing program (imageJ) of the National Institutes of Health (NIH Image). To minimize the number of false

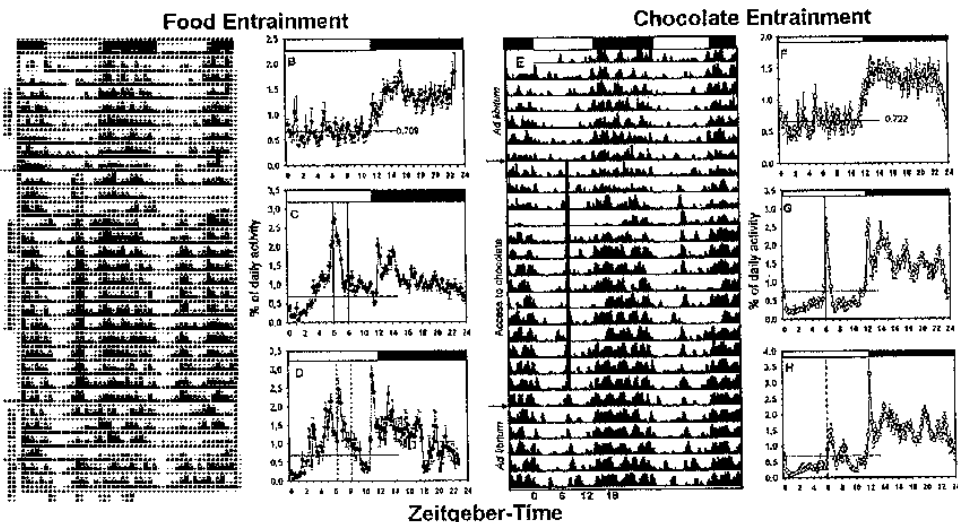


Fig. 1. Representative double-plotted general activity actograms for a food entrained (A) and chocolate entrained (E) rat. Mean activity profile of eight rats in *ad libitum* (B, F), 2 weeks under food restriction (C) or under chocolate restriction (G), show the differential response in intensity and duration for anticipatory activity. Lower graphs show persistence of entrained activity after 5 days in *ad libitum* and 2 days in fasting (D) or for 5 days in *ad libitum* after chocolate entrainment (H). White and black bars represent the LD cycle, horizontal line represents the mean activity during the light phase. The rectangle and line in ZT6 represent food or chocolate access (respectively).

positives, background optic density was established for each section in a nearby region lacking PER1. Stained cells that reached or surpassed 2× the background optic density were considered positive and were included, whereas cells under this staining threshold were discarded. A single examiner, who was blind to the treatment conditions, performed all counts.

Data analysis

Behavioral data for the intensity of FAA and persistence were classified by group and were compared with a one-way ANOVA followed by a Tukey post hoc test with significant values set at $P < 0.05$.

The number of PER1 positive cells for each structure was classified for group and time and is represented as mean ± standard error of the mean. Data for the entrained groups were compared with the *ad libitum* control with a two-way ANOVA for independent measures with a factor for group and a factor for time. The two-way ANOVA was followed by a Tukey post hoc test with significant values set at $P < 0.01$. The number of PER1 positive cells for the persistence groups was compared between temporal points (ZT6 and ZT12) with a one-way ANOVA. Statistical analysis was performed with the program Statistica version 4.5 (StatSoft, Inc. 1993).

RESULTS

Visual inspection of actograms indicated that scheduled food access produced anticipatory activity in all the rats, characterized by increased general activity at least 1 h prior to and at the moment of mealtime (Fig. 1A). Scheduled chocolate access produced increased activity briefly prior and at the moment of chocolate delivery (Fig. 1E).

Average activity waves confirmed the expression of FAA in the FE group and a brief activation just before the moment of chocolate delivery for the CH group (Fig. 1C and 1G). After cessation of the entraining protocol a clear persistence of the entrained behavioral pattern at the expected mealtime was observed 7 days later in fasting for the FE-P group and at least 7 days in *ad libitum* for the CH-P group (Fig. 1A, D, E, H). Further analysis indicated that during entrainment as well as during persistence the intensity of activity for the 3 h prior to mealtime was significantly dif-

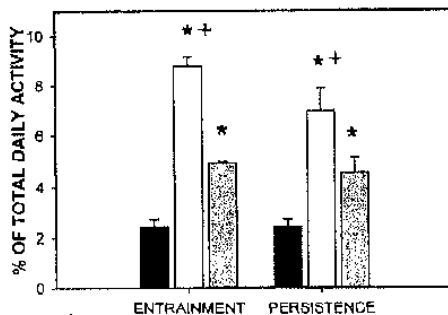


Fig. 2. Total normalized activity of rats for 1 h prior to mealtime for the *ad libitum* baseline (black). The food entrained group (white) and the chocolate group (gray). * Significant difference vs. the *ad libitum* rats ($P < 0.01$); + statistical difference between food entrained and chocolate group ($P < 0.01$).

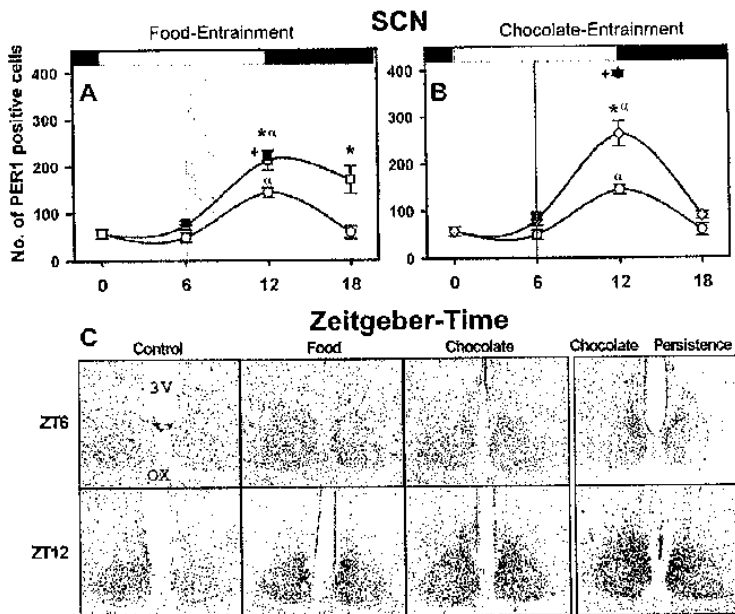


Fig. 3. Total cell number expressing PER1 protein in the SCN of *ad libitum* controls (white circles), food entrained (gray squares, A) and chocolate entrained (gray rhombus, B) rats at four temporal points and in persistence for FE-P group (black squares) and CH-P group (black rhombus). ZT0 represents time of lights on, the white and black bars represent the L/D cycle. Food or chocolate was delivered at ZT6 indicated by the rectangle and vertical line respectively on the x axis. * Statistical difference between FE or CH and the *ad libitum* rats ($P < 0.01$); * significant difference between the peak and lower temporal points of the same group; * statistical difference between two temporal points in the persistence group ($P < 0.01$). In C representative microphotographs at ZT6 and ZT12 of PER1 expression in the SCN. 3V=Third ventricle; OX=Optic chiasm.

ferent from the activity observed in the baseline (Fig. 2). The one-way ANOVA indicated significant difference among groups (baseline vs. FAA $F(2,19)=57.87$; $P < 0.00001$), and during the persistence interval (baseline vs. persistence $F(2,19)=16.04$; $P < 0.00001$).

The *ad libitum* group showed a diurnal pattern of PER1 protein expression in the SCN, with peak values at ZT12 (Fig. 3). Neither food nor chocolate entrainment modified the phase of PER1 expression in the SCN, however both conditions induced up-regulation of the daily peak and this effect was enhanced in the CH group. Statistical analysis indicated significant difference between AL and FE groups ($F(1,40)=25.88$; $P < 0.00001$), a significant effect of time ($F(3,40)=30.92$; $P < 0.00001$) and for the interaction group \times time ($F(3,40)=5.89$; $P < 0.001$) and between AL and CH groups ($F(1,40)=27.52$; $P < 0.00001$) due to time ($F(3,40)=64.85$; $P < 0.00001$) and the interaction of both factors ($F(3,40)=8.94$; $P < 0.0001$). In the FE-P group, after the refeeding-fasting protocol, PER1 expression maintained the same levels and temporal pattern as the FE group. (Fig. 3 left). The one-way ANOVA confirmed a significant temporal difference between ZT6 and ZT12 ($F(1,6)=893.67$; $P < 0.00001$). In the CH-P group, after 8 days without chocolate access PER1 expression in the SCN maintained the same phase but with increased peak

levels at ZT12 (Fig. 3 right), statistically different from ZT6 ($F(1,6)=215.77$; $P < 0.00006$). The increased levels of PER1 expression were mainly due higher cell counts in the dorsomedial SCN. In this region at ZT12 the control group had a mean of 110 ± 11.8 positive cells, the FE 136.8 ± 6.7 , the CH 177.9 ± 12.9 , the FE-P 148.5 ± 20.5 and the CH-P 350.7 ± 30.7 .

In the DMH no daily rhythmicity in the expression of the PER1 protein was observed for the *ad libitum* group (Fig. 4). FE induced a rhythm with peak values at ZT12 (6 h after mealtime), significantly higher than values observed along the daily cycle in *ad libitum* condition. Statistical analysis indicated significant difference between groups ($F(1,40)=35.95$; $P < 0.00001$), a significant effect of time ($F(3,40)=31.43$; $P < 0.00001$) and for the interaction group \times time ($F(3,40)=42.67$; $P < 0.00001$). In the FE-P group the food-entrained pattern was maintained with lower values, but keeping a significant statistical difference between ZT6 and ZT12 ($F(1,6)=96.95$; $P < 0.00001$). Daily chocolate access also modified the temporal pattern from that observed in the *ad libitum* controls (Fig. 4 right), with high values at ZT0 and ZT12 (6 h after chocolate access). The two-way ANOVA indicated significant difference between groups ($F(1,40)=10.21$; $P < 0.00001$) due to time ($F(3,40)=31.07$; $P < 0.00001$) and the interaction of both

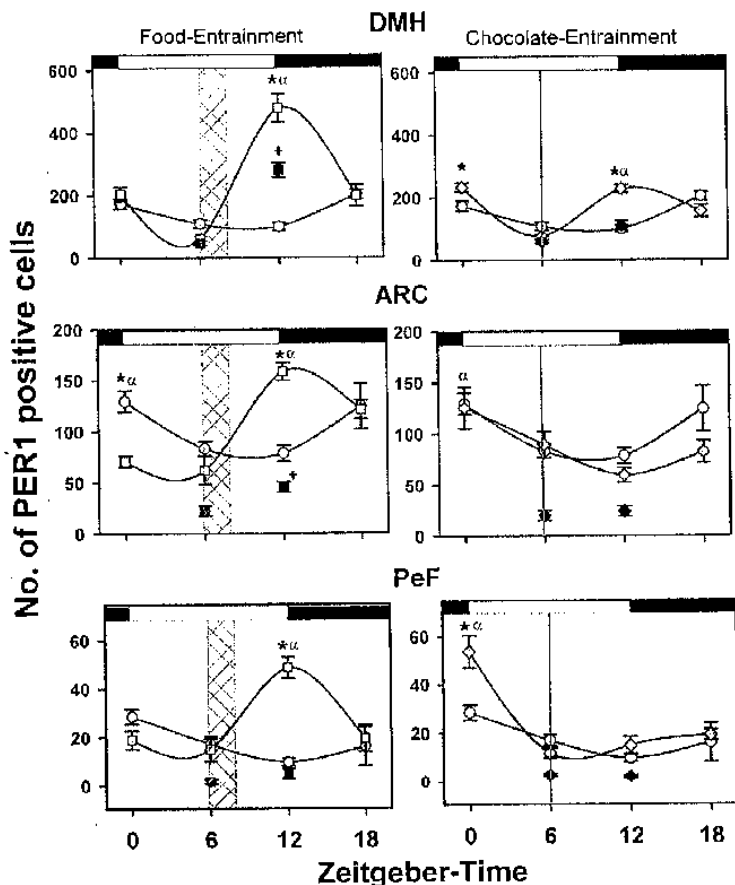


Fig. 4. Total cell number expressing PER1 protein in the DMH, ARC and PeF. The effect of food entrainment is shown on the left and chocolate entrainment on the right. The *ad libitum* controls (white circles), FE group (gray squares) and CH group (gray rhombus) at four temporal points and in persistence for FE-P group (black squares) and CH-P group (black rhombus) * statistical difference between FE or CH and the *ad libitum* rats ($P < 0.01$); † significant difference between the peak and lower temporal points of the same group; † statistical difference between two temporal points in the persistence group ($P < 0.01$). Other indications as in Fig. 3.

factors group \times time indicated statistical differences ($F(3,40)=23.04$; $P < 0.0001$). This pattern did not persist after interruption of chocolate entrainment.

The ARC, which is a structure involved in receiving humoral and metabolic signals from the periphery exhibited a diurnal rhythm of PER1 expression in the *ad libitum* control, with high values during the night, when rats usually feed (Fig. 4). In the FE group the daily peak was shifted toward ZT12 (6 h after meal access). The two-way ANOVA indicated no difference between groups ($F(1,40)=0.01$; $P=NS$) but significant difference due to time ($F(3,40)=9.48$; $P < 0.0001$) and due to the interaction of both factors group \times time ($F(3,40)=15.56$; $P < 0.0001$). After 5 days *ad*

libitum and 3 days in fasting, PER1 expression in the FE-P group exhibited low amplitude but still significant higher levels at ZT12 ($F(1,6)=169.92$; $P < 0.0001$). Daily access to chocolate did not modify the temporal pattern of PER1 expression, which remained similar to the AL group and no statistical difference was obtained between groups ($F(3,40)=2.97$; $P=NS$), a significant effect was obtained for the factor time ($F(3,40)=8.52$; $P < 0.001$), and not for the interaction group \times time ($F(3,40)=1.50$; $P=NS$). After 8 days without chocolate access PER1 did not express a temporal difference ($F(1,6)=4.8$; $P=NS$; Fig. 6 right).

In the PeF no daily oscillation in the expression of the PER1 protein was observed (Fig. 4 bottom), but RFS

induced a significant rhythm with peak values at ZT12 (6 h after mealtime), as observed in the DMH and ARC. Statistical analysis indicated significant difference between *ad libitum* and RFS groups ($F(1,40)=6.74$; $P<0.01$), a significant effect of time ($F(3,40)=4.14$; $P<0.01$) and for the interaction group \times time ($F(3,40)=13.33$; $P<0.0001$). After the refeeding–fasting protocol the food-entrained temporal pattern was not maintained, thus no difference was observed between ZT6 and ZT12 ($F(1,6)=2.15$; $P=NS$). Daily chocolate delivery produced a peak at ZT0 (6 h before chocolate access) in the PeF (Fig. 4 right). The two-way ANOVA indicated significant difference between *ad libitum* and CH group ($F(1,40)=6.55$; $P<0.01$) due to time ($F(3,40)=23.58$; $P<0.0001$) and the interaction of both factors group \times time indicated statistical differences

($F(3,40)=5.50$; $P<0.002$). After 8 days without chocolate values of PER1 expression were lower than those observed in the *ad libitum* and RFS groups. Due to the sampling it was not possible to define the persistence of the peak observed at ZT0.

In the VMH the expression of PER1 was very scarce and in some cases nonexistent, no temporal pattern could be determined for the different groups (data not shown).

In both Acc subregions (Acc-Core and Acc-Shell) a daily temporal pattern in PER1 expression was observed in the *ad libitum* group with peak values at ZT18, RFS shifted the daily peak to ZT12 (Fig. 5 left). Statistical analysis indicated a significant difference between groups ($F(1,38)=77.10$; $P<0.001$ for the Acc-Core; $F(1,39)=0.56$; $P<0.0001$ for the Acc-Shell), a significant effect of

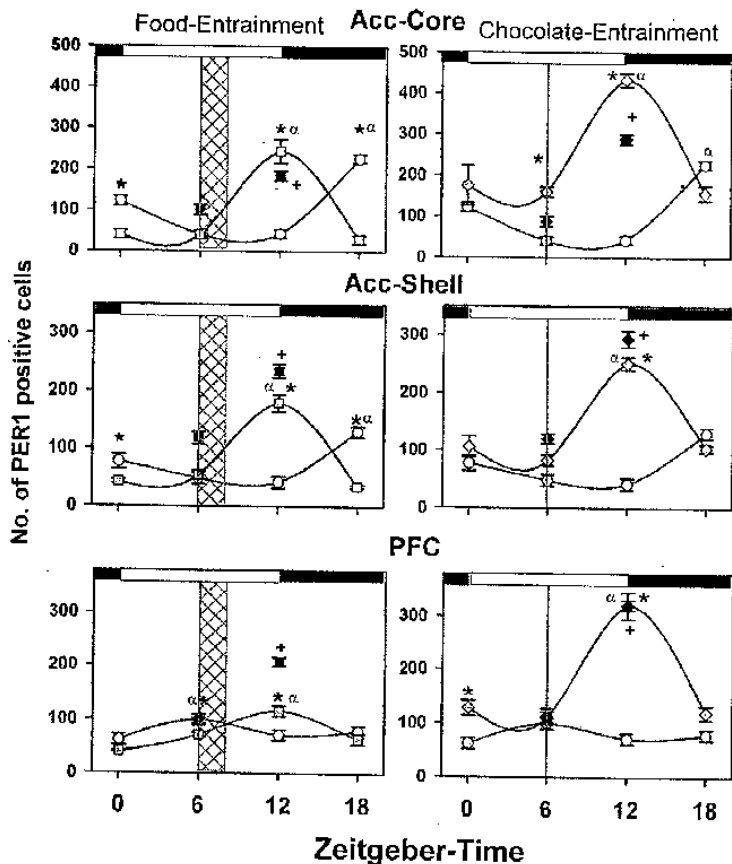


Fig. 5. Total number of cells expressing PER1 protein in the two sub-regions of Acc and PFC. The *ad libitum* controls (white circles), FE group (gray squares) and CH group (gray rhombus) at four temporal points and in persistence for FE-P group (black squares) and CH-P group (black rhombus). * statistical difference between FE or CH and the *ad libitum* rats ($P<0.01$); α significant difference between the peak and lower temporal points of the same group; + statistical difference between two temporal points in the persistence group ($P<0.01$). Other indications as in Fig. 3.

time ($F(3,38)=425.29$; $P<0.00001$ for the Acc-Core; $F(3,39)=29.86$; $P<0.00001$ for the Acc-Shell) and for the interaction group \times time ($F(3,38)=1.41$; $P<0.00001$ for the Acc-Core; $F(3,39)=101.65$; $P<0.00001$ for the Acc-Shell). After the refeeding–fasting protocol a significant temporal difference persisted between ZT6 and ZT12 in both Acc subregions ($F(1,6)=39.04$; $P<0.0007$, for Acc-Core; $F(1,6)=75.76$, $P<0.0001$, for Acc-Shell). Chocolate entrainment also shifted the daily peak (acrophase) to ZT12 and, increased significantly the amplitude of the rhythm in both Acc subregions (Fig. 5 right). The two-way ANOVA indicated significant difference between AL and CH groups ($F(1,39)=8.94$; $P<0.0001$ for Acc-Core; $F(1,39)=96.97$, $P<0.00001$ for Acc-Shell), due to time ($F(3,39)=1.97$; $P<0.0001$ for Acc-Core; $F(3,39)=30.11$, $P<0.0001$ for Acc-Shell) and the interaction of both factors group \times time ($F(3,39)=5.55$; $P<0.0001$ for Acc-Core; $F(3,39)=68.21$, $P<0.0001$ for Acc-Shell). After interruption of chocolate delivery for 8 days the chocolate entrained temporal pattern persisted in both Acc subregions (Fig. 5), and the temporal difference between ZT6 and ZT12 remained statistically significant ($F(1,6)=231.66$; $P<0.0005$ for Acc-Core; $F(1,6)=110.96$, $P<0.0001$ for Acc-Shell).

The PFC exhibited daily PER1 protein oscillations in control *ad libitum* with a peak at ZT6. RFS induced a shift of the PER1 peak to ZT12 (Fig. 5 bottom) as observed in the Acc. Statistical analysis did not indicate a significant difference between groups ($F(1,40)=2.51$; $P=NS$). But significant effect by time ($F(3,40)=38.01$; $P<0.0001$) and for the interaction group \times time ($F(3,40)=30.54$; $P<0.0001$). In the FE-P group PER1 expression maintained the same temporal pattern as the FE group with even higher amplitude between ZT6 and ZT12, the one-way ANOVA indicated significant difference between the two time points ($F(1,6)=136.82$; $P<0.0001$). In the CH group the acrophase of PER1 expression was also shifted to ZT12 and with increased amplitude (Fig. 5). The two-way ANOVA confirmed significant difference between AL and CH groups ($F(1,40)=153.40$; $P<0.00001$), due to time ($F(3,40)=41.98$; $P<0.0001$) and the interaction of both factors group \times time ($F(3,40)=51.88$; $P<0.0001$). After 8 days without chocolate access PER1 expression maintained the temporal pattern imposed by daily chocolate access and with the same peak level at ZT12 ($F(1,6)=684.08$; $P<0.0001$).

In the CeA and BLA no daily temporal pattern in PER1 expression was observed under *ad libitum* conditions (Fig. 6). In the CeA, RFS induced a low amplitude oscillation with high values at ZT12, however statistical analysis indicated no significant difference between groups ($F(1,40)=2.96$; $P=NS$), a significant effect of time ($F(3,40)=9.30$; $P<0.0001$) and no effect due to the interaction group \times time ($F(3,40)=1.11$; $P=NS$). After 8 days the temporal pattern induced by RFS persisted with higher amplitude and thus was statically significant ($F(1,6)=81.84$; $P<0.0001$). In the BLA food entrainment did not induce any effect on PER1 expression. Statistical analysis confirmed no significant effects among groups ($F(1,40)=0.33$; $P<NS$), in the time ($F(3,40)=1.36$; $P=NS$) and due to the interaction group \times time ($F(3,40)=0.81$; $P=NS$). In contrast chocolate entrainment induced a significant oscillation in both CeA

and BLA with acrophase at ZT12 (Fig. 6 right). The two-way ANOVA indicated a significant difference between AL and CH groups ($F(1,40)=7.28$; $P<0.01$ for CeA; $F(1,40)=7.78$, $P<0.008$ for BLA), due to time ($F(3,40)=56.24$; $P<0.00001$ for CeA; $F(3,40)=22.36$, $P<0.0001$ for BLA) and the interaction of both factors group \times time ($F(3,40)=24.12$; $P<0.00001$ for CeA; $F(3,40)=24.68$, $P<0.0001$ for BLA). In CeA the chocolate entrained temporal pattern persisted with the same amplitude as during the entrained condition (Fig. 6 right), the temporal difference between ZT6 and ZT12 was statistically significant ($F(1,6)=81.84$; $P<0.0001$). In contrast in the BLA the chocolate induced rhythm did not persist ($F(1,6)=2.59$; $P=NS$).

The PVT exhibited daily PER1 protein oscillations in *ad libitum* with a peak at ZT0. RFS induced a shift of the PER1 peak to ZT6 (Fig. 6), statistical analysis indicated a significant difference between groups ($F(1,40)=26.23$; $P<0.0001$) by time ($F(3,40)=14.06$; $P<0.0001$) and for the interaction group \times time ($F(3,40)=50.79$; $P<0.0001$). In the FE-P group PER1 expression maintained the same temporal pattern as the FE group. The one-way ANOVA indicated significant difference between time points ZT6 and ZT12 ($F(1,6)=13.10$; $P<0.01$). In the CH group the acrophase of PER1 expression remained at ZT0, however with increased amplitude (Fig. 5). The two-way ANOVA confirmed significant difference between groups ($F(1,40)=136.08$; $P<0.00001$), due to time ($F(3,40)=59.28$; $P<0.00001$) and the interaction of both factors group \times time ($F(3,40)=27.27$; $P<0.00001$). After 8 days without chocolate access PER1 expression remained similar to the AL and to the CH group. The one-way ANOVA did not indicate significant difference between ZT6 and ZT12 ($F(1,6)=2.6$; $P=NS$).

DISCUSSION

The present study shows that RFS as well as daily chocolate entrainment produce behavioral activation that persists for 7 days after cessation of the feeding protocol. It also provides evidence that RFS and not chocolate induces daily PER1 oscillations in the hypothalamus, indicating that this structure is not essential for the expression of chocolate anticipating behavior. Food and especially daily chocolate entrainment induces pronounced oscillations in structures of the corticolimbic system, resetting the acrophase to 6 h after the stimulus. After interruption of the entraining protocols, the food entrained PER1 oscillations persisted for at least eight cycles in the DMH. Likewise chocolate and food entrained patterns persisted in the Acc (Acc-Core and Acc-Shell), PFC and CeA, which are areas involved in the motivation for feeding and arousal, moreover chocolate induced oscillations attained higher amplitude.

In rats expecting a daily meal, FAA starts about 1–2 h earlier than in rats expecting a daily sweet treat. We have reported this different anticipatory response in a previous study (Mendoza et al., 2005) and we have speculated that the longer and more intense FAA associated with food entrainment might be due to the catabolic state and empty

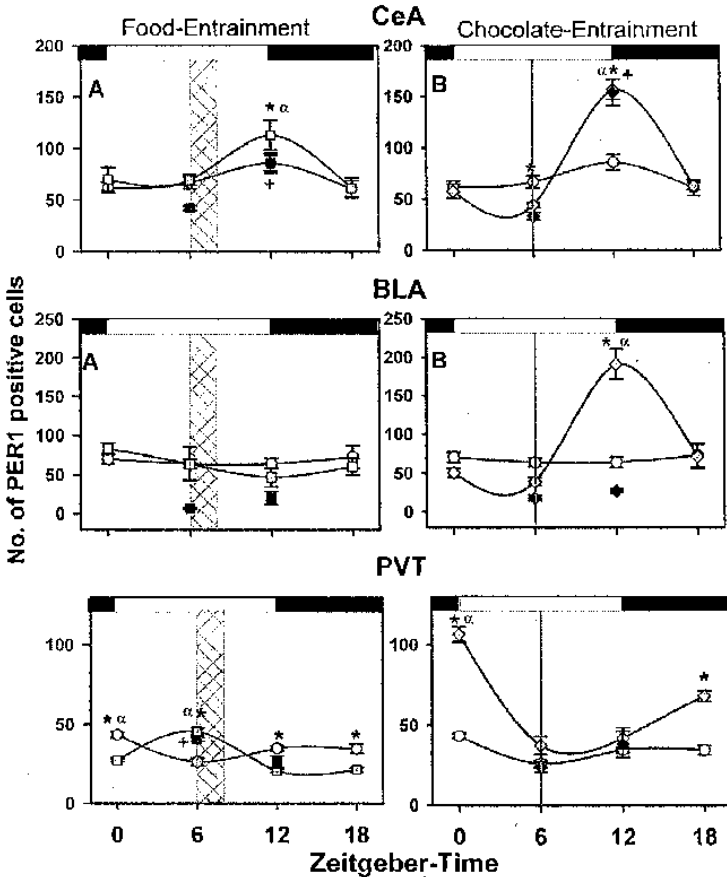


Fig. 6. Total number of cells expressing PER1 protein in the CeA, BLA and PVT. The *ad libitum* controls (white circles), FE group (gray squares) and CH group (gray rhombus) at four temporal points and in persistence for FE-P group (black squares) and CH-P group (black rhombus). * statistical difference between FE or CH and the *ad libitum* rats ($P < 0.01$); ** significant difference between the peak and lower temporal points of the same group; † statistical difference between two temporal points in the persistence group ($P < 0.01$). Other indications as in Fig. 3.

stomach that rats endure several hours previous to meal-time (Escobar et al., 1996; Martínez-Merlos et al., 2004). In contrast, access to a sweet treat produces a short but timely activation at the expected treat time, suggesting a precise 24 h timing system, independent of metabolic factors, at the basis of such activation. A recent study also found differential activation between food and chocolate entrained rats (Verwey et al., 2007). After interrupting the entrainment protocols both entrained behavioral patterns persisted for at least seven cycles demonstrating the endogenous nature of these oscillations. In *ad libitum* conditions the behavioral activation at the expected chocolate time could be observed with a brief, timely and precise bout of activity, while persistence of the food entrained

rhythm lasted longer and was observed in fasting conditions only, as described previously (Mistlberger, 1994; Stephan, 1981, 2001). Both conditions indicate the presence of a timekeeping system that once entrained, leads subjects to search for food at the conditioned time for many cycles. This system may underlie addictive feeding behavior and the observation that PER1 oscillation did not persist in the hypothalamus in chocolate entrained animals may suggest that mainly accumbens, PFC and amygdala are involved in this type of behavior.

Ad libitum fed rats exhibited a clear diurnal rhythm of PER1 in the SCN with a peak at ZT12 as previously described (Lamont et al., 2005; Amir et al., 2004). This temporal organization was not modified by RFS or by

chocolate entrainment, which is in agreement with previous reports describing that rats when kept in a LD cycle, food or chocolate entrainment do not modify the phase of c-Fos or clock gene products in the SCN (Damiola et al., 2000; Hara et al., 2001; Waddington Lamont et al., 2007; Wakamatsu et al., 2001; Mendoza et al., 2005). However, the present data indicate that both RFS and daily chocolate access induced an up-regulation of PER1 expression at ZT12. This peak was mainly enhanced in the chocolate group, suggesting that arousal or the motivational state associated with chocolate entrainment provides information to the SCN and also influences the activity of the SCN. A possible input of limbic information to the SCN could be the PVT, which shows anticipatory PER1 expression in food and chocolate entrained rats. It is well described that arousal is a non-photic stimulus and produces inhibition of c-Fos activity in the SCN (Escobar et al., 2007; Mistlberger et al., 2003; Mistlberger and Skene, 2004; Mrosovsky, 1996), the upregulation of PER1 (mainly in the dorsomedial part) argues for a role of the SCN in this anticipatory activity.

RFS specifically induced oscillations in hypothalamic structures involved in energy balance and feeding behavior. RFS set the daily rhythm of PER1 expression in the ARC, DMH and PeF to ZT12, 6 h after mealtime, this effect was exclusive for RFS and was not produced by chocolate delivery. The fact that chocolate did not produce this activation and that after the refeeding–fasting protocol the food entrained pattern did not persist or was dampened in the ARC and PeF, suggests that oscillations observed during RFS were a response to the daily meal and depend on an hourglass or a dampening oscillator. During this entrainment process the ARC and PeF may play a relevant role in transmitting food-related signals to other brain regions. In addition to the ARC, metabolic signals also enter the brain by the autonomic system and brain stem nuclei. This dual pathway explains why food entrainment is not prevented in rats bearing subdiaphragmatic vagotomy, bearing lesions of the vagal complex (Comperatore and Stephan, 1990; Davidson et al., 2000, 2001) or of the ARC (Mistlberger and Antle, 1999).

Interestingly other structures like the VMH that are known to play a role in metabolic functions and feeding behavior exhibited only very limited expression of PER1, which did not allow quantitative evaluation. In contrast with other hypothalamic structures, food entrained oscillations persisted in the DMH for up to eight cycles. Persistence for two cycles of food entrained PER1 oscillations was previously reported by Mieda et al. (2006). The role of the DMH on food entrainment is controversial (Landry et al., 2007; Gooley and Saper, 2007). The DMH is proposed as an integrator, and key regulator for the expression of food-entrained circadian rhythms (Gooley et al., 2006; Saper et al., 2005) because RFS entrain cellular activity in the DMH (Angeles-Castellanos et al., 2005; Gooley et al., 2006; Mieda et al., 2006). Contrasting with these data, lesions in the DMH do not completely abolish FAA (Gooley et al., 2006; Landry et al., 2006, 2007). Apparently the relevance of the DMH as integrator of food entrained rhythms relies

on its projections to different brain areas, promoting the sleep–wake cycle, arousal, feeding, endocrine, and body temperature rhythms (Thompson et al., 1996; Aston-Jones, 2005; Harris and Aston-Jones, 2006). The fact that the present data show that chocolate hardly entrains PER1 oscillation in the DMH indicates that the effect of RFS on the DMH is probably triggered by signals of the animal's metabolic state.

The present results demonstrate that daily scheduled access to chocolate had a powerful but selective influence on areas of the brain that are known to be involved with the motivational and reward systems for feeding (Berthoud, 2007; Kelley et al., 2005) and did not modify the systems involved in regulating homeostasis. The same structures entrained by daily chocolate access (Acc-Core and Acc-Shell, CeA and PFC) were also entrained by RFS albeit with much lower amplitude. A similar effect by both, chocolate and RFS, on these structures indicates that not only chocolate but also RFS access induces a motivational or reward state. Herein the present data show chocolate, to have special strong effects. A previous study using PER2 as reporter of rhythmicity did not find entrainment of limbic structures by daily Ensure access (Verwey et al., 2007). The main difference with the present study is that animals were allowed to ingest the nutritional complex to satiety and that authors explored different structures with a different reporter. Present data are in agreement with the evidence that Acc-Core is a constituent of a circuit mediating anticipatory actions, better known as "wanting" response (Berridge and Robinson, 2003; Cardinal and Everitt, 2004) and that the Acc-Shell contributes to the hedonic response and motivation for sweet and palatable food (Berthoud, 2004). Also, the Acc-Core and PFC are related with the expectancy of reward by an attractive diet especially with high concentrations of carbohydrates and fat, leading to changes in dopamine release (Bassareo and Di Chiara, 1999; Berridge and Robinson, 2003). In this respect it is remarkable that both Acc-Shell and PFC show an undiminished or increased PER1 expression respectively in RFS or chocolate persistence indicating a special role for these structures. The present study demonstrates that a rewarding treat can start or entrain daily oscillations within fore-brain structures that are known to mediate addictive behavior (Kelley et al., 2005). Further studies need to explore the role of these oscillations on palatable treat expectation in relation with the dopaminergic reward system in order to understand the temporal regulation of addictive processes, especially since such food addictive processes may underlie the development of obesity and uncontrolled eating (Trinko et al., 2007).

CONCLUSION

In conclusion, the present data demonstrate that scheduled food or chocolate access entrains daily oscillations of the clock gene PER1 in structures involved in homeostasis and reward, which may lead to the identification of motivational feeding systems. These oscillations remained for at least 8 days after the interruption of the feeding sched-

ule. The persistence and amplification of these oscillations in structures associated with reward suggest that this oscillatory process may form part of temporal addictive behavior. The present data support our hypothesis that (food) anticipatory behavior depends on a multi-oscillatory system. Whether the induction of PER1 oscillation really signifies autonomous oscillations in these brain regions or is a reflection of the activation of a larger neuronal circuit will be a matter of future investigation.

Acknowledgments—This study was supported by grants DGAPA PAPIIT: IN-203803 and 203907, CONACYT 43950-M and ECOS NORD MÉXICO-FRANCIA M04S02.

REFERENCES

- Abe H, Rusak B (1992) Anticipatory activity and entrainment of circadian rhythms in Syrian hamsters exposed to restricted palatable diets. *Am J Physiol* 263:R118–R124.
- Amir S, Waddington E, Robinson B, Stewart J (2004) A circadian rhythm in the expression of PERIOD2 protein reveals a novel SCN-controlled oscillator in the oval nucleus of the bed nucleus of the stria terminalis. *Neuroscience* 24:781–790.
- Ángeles-Castellanos M, Aguilar-Roblero R, Escobar C (2004) c-Fos expression in hypothalamic nuclei of food-entrained rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286:R159–R165.
- Ángeles-Castellanos M, Mendoza J, Escobar C (2005) Food entrainment modifies the c-Fos expression pattern in brain stem nuclei of rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288:R678–R684.
- Ángeles-Castellanos M, Mendoza J, Escobar C (2007) Restricted feeding schedules phase shift daily rhythms of c-Fos and protein Per1 immunoreactivity in corticolimbic regions in rats. *Neuroscience* 144:344–355.
- Aston-Jones G (2005) Brain structures and receptors involved in alertness. *Sleep Med Rev Suppl* 1:S3–S7.
- Bassareo V, Di Chiara G (1999) Modulation of feeding-induced activation of mesolimbic dopamine transmission by appetitive stimuli and its relation to motivational state. *Eur J Neurosci* 11(12):4389–4397.
- Berridge KC, Robinson TE (2003) Parsing reward. *Trends Neurosci* 26:507–513.
- Berthoud HR (2004) Mind versus metabolism in the control of food intake and energy balance. *Physiol Behav* 61:781–793.
- Berthoud HR (2007) Interactions between the “cognitive” and “metabolic” brain in the control of food intake. *Physiol Behav* 91(5):486–499.
- Buijs RM, Kalsbeek A (2001) Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nat Rev Neurosci* 2(7):521–526.
- Cardinal RN, Everitt BJ (2004) Neural and psychological mechanisms underlying appetitive learning: links to drug addiction. *Curr Opin Neurobiol* 14:156–162.
- Comperatore CA, Stephan FK (1990) Effects of vagotomy on entrainment of activity rhythms to food access. *Physiol Behav* 47:671–678.
- 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* 279:R1295–R1304.
- Davidson AJ, Aragona BJ, Stephan FK (2001) Persistence of meal entrained circadian rhythms following area postrema lesions in the rat. *Physiol Behav* 74:349–354.
- Dunlap JC (1999) Molecular bases for circadian clocks. *Cell Rev* 96:271–290.
- 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, Martínez-Merlos MT, Angeles-Castellanos M, Miñana MC, Buijs RM (2007) Unpredictable feeding schedules unmask a system for daily resetting of behavioural and metabolic food entrainment. *European Journal of Neuroscience*, Vol. 26, pp 2804–2814.
- Gooley JJ, Schomer A, Saper CB (2005) The dorsomedial hypothalamic nucleus is critical for the expression of food-entrainable circadian rhythms. *Nat Neurosci* 9(3):398–407.
- Gooley JJ, Saper (2007) Is food-directed behavior an appropriate measure of circadian entrainment to restricted daytime feeding? *J Biol Rhythms* 22:479–483.
- Guo H, Brewer JM, Champhekar A, Harris RB, Bittman EL (2005) Differential control of peripheral circadian rhythms by suprachiasmatic-dependent neural signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:3111–3116.
- 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.
- Harris G, Aston-Jones G (2006) Arousal and reward: a dichotomy in orexin function. *Trends Neurosci Rev* 29(10):571–577.
- Kelley AE, Schiltz CA, Landry FC (2005) Neural systems recruited by drug- and food-related cues: Studies of gene activation in corticolimbic regions. *Physiol Behav* 86:11–14.
- Klein DC, Moore RY, Reppert SM (1991) Suprachiasmatic nucleus: the mind's clock. New York: Oxford University Press.
- Lamont EW, Robinson B, Stewart J, Amir S (2005) The central and basolateral nuclei of the amygdala exhibit opposite diurnal rhythms of expression of the clock protein Period2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:4180–4184.
- Landry GJ, Simon MM, Webb IC, Mistlberger RE (2006) Persistence of a behavioral food-anticipatory circadian rhythm following dorsomedial hypothalamic ablation in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290:R1527–R1534.
- Landry GJ, Yamakawa CR, Webb IC, Mear RJ, Mistlberger RE (2007) The dorsomedial hypothalamic nucleus is not necessary for the expression of circadian food-anticipatory activity in rats. *J Biol Rhythms* 22:467–478.
- Martínez-Merlos MT, 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* 181:53–63.
- Mendoza J, Angeles-Castellanos M, Escobar C (2005) Entrainment by a palatable meal induces food-anticipatory activity and c-Fos expression in reward-related areas of the brain. *Neuroscience* 133:293–303.
- Meynard MM, Valdés JL, Recabarren M, Serón-Ferré M, Torralba F (2005) Specific activation of histaminergic neurons during daily feeding anticipatory behavior in rats. *Behav Brain Res* 158:311–319.
- Mieda M, Williams SC, Richardson JA, Tanaka K, Yanagisawa M (2006) The dorsomedial hypothalamic nucleus as a putative food-entrainable circadian pacemaker. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(32):12150–12155.
- 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 mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev* 18:171–195.
- Mistlberger RE, Antle MC (1999) Neonatal monosodium glutamate alters circadian organization of feeding, food anticipatory activity and photic masking in the rat. *Brain Res* 842(1):73–83.
- Mistlberger RE, Antle MC, Webb IC, Jones M, Weinberg J, Fotlock 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.
- Mistlberger RE, Skene DJ (2004) Social influences on mammalian circadian rhythms: animal and human studies. *Biol Rev Camb Philos Soc* 79:533–556.
- Mroskovsky N (1996) Locomotor activity and non-photic influences on circadian clocks. *Biol Rev* 71:343–372.
- Okamura H (2004) Clock genes in cell clocks: roles, actions, and mysteries. *J Biol Rhythms* 19:388–399.
- Paxinos G, Watson C (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. New York: Academic Press.
- Saper CB, Scammell TE, Lu J (2005) Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nat Rev* 437:1257–1263.
- Saloh Y, Kawai H, Kudo N, Kawashima Y, Mitsuimoto A (2006) Time-restricted feeding entrains daily rhythms of energy metabolism in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290(5):R1276–R1283.
- Stephan FK (1961) 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. In: *Circadian clocks* (Takahashi JS, Turek FW, Moore RY, eds), pp 223–246. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- 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.
- Thompson RH, Canteras NS, Swanson LW (1996) Organization of projections from the dorsomedial nucleus of the hypothalamus: a PHA-L study in the rat. *J Comp Neurol* 376:143–173.
- Trinko R, Sears RM, Guamieri DJ, DiLeone RJ (2007) Neural mechanisms underlying obesity and drug addiction. *Physiol Behav* 91(5):499–505.
- Verwey M, Khoja Z, Stewart J, Amir S (2007) Differential regulation of the expression of *Period2* protein in the limbic forebrain and dorsomedial hypothalamus by daily limited access to highly palatable food in food-deprived and free-fed rats. *Neuroscience* 147(2):277–285.
- Waddington Lamont E, Harbour VL, Barry-Shaw J, Renteria Diaz L, Robinson B, Stewart J, Amir S (2007) Restricted access to food, but not sucrose, saccharine, or salt, synchronizes the expression of *Period2* protein in the limbic forebrain. *Neuroscience* 144(2):402–411.
- Wakamatsu H, Yoshinobu 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 of *mPer1* mRNA in the cerebral cortex and hippocampus but not in the suprachiasmatic nucleus of mice. *Eur J Neurosci* 13:1190–1196.

(Accepted 2 June 2008)
(Available online 7 June 2008)

1 THE SUPRACHIASMATIC NUCLEUS PLAYS AN ACTIVE ROLE DURING
2 FOOD ENTRAINMENT
3
4

5 Manuel Angeles-Castellanos¹, Katia Rodriguez¹, Roberto Salgado-Delgado¹, Ruud M.
6 Buijs² and Carolina Escobar¹
7
8
9

10
11
12
13
14
15 ¹ Departamento de Anatomía, Fac de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de
16 México and ² Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de
17 Investigaciones Biomédicas
18 Universidad Nacional Autónoma de México, México DF 04510, México
19
20
21

22 Corresponding Author:
23
24
25
26
27
28
29
30

31 Carolina Escobar
32 Departamento de Anatomía
33 Edificio B 4º Piso
34 Fac de Medicina UNAM
35 México DF 04510,
36 Mexico
37 escocarolina@gmail.com
38 ++5255-5623-2422
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64

Short title: Participation of suprachiasmatic nucleus in food entrainment oscillator

Key words: Limbic system, hypothalamus, circadian rhythms, anticipatory activity, metabolic rhythms, SCN lesions

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64

ABSTRACT

Daily feeding schedules entrain temporal patterns of behaviour, metabolism, neuronal activation and clock gene expression in diverse brain areas while the suprachiasmatic nucleus (SCN), the biological clock, remains coupled to the light / dark cycle. Bilateral lesions of the SCN do not abolish or interfere with food entrained behavioural and hormonal rhythms. Therefore it is suggested that the food entrained and the light entrained systems are independent of each other although in *ad libitum* conditions they remain coupled. In spite of strong evidence for two independent systems, special circumstances uncover interplay between the light and the food entrained systems, and indicate modulation of the SCN activity by restricted feeding. This study explored the influence of the SCN on food entrained rhythms. Food entrained temporal profiles of behaviour, corticosterone, glucose and Fos-IR and Per1 expression in the hypothalamus and corticolimbic structures were explored in rats bearing bilateral SCN lesions (SCNX). Food anticipatory activity and the food entrained corticosterone peak were expressed with earlier onset and higher intensity in SCNX rats as compared with the intact controls. Likewise food entrainment induced higher c-Fos positive neurons in the hypothalamus anticipating a meal in SCNX rats, while a decreased c-Fos response was observed in corticolimbic structures. Also, up regulation of the PER1 peak was observed in hypothalamic structures, especially in the DMH, while in some limbic structures PER1 rhythmicity was dampened. Present results indicate that the SCN participates actively during food entrainment modulating the response of hypothalamic and corticolimbic structures, possibly to prevent them from uncoupling from the LD cycle.

ABBREVIATIONS

Acc: Nucleus Accumbens
Acc-Core: Regions Core of Accumbens
Acc-Shell: Region Shell of Accumbens
ARC: Arcuate Nucleus
CeA: Central Amygdala
Ctrl: Control group
DD: Constant Darkness
DMH: Dorsomedial hypothalamic nucleus
FAA: Food Anticipatory Activity
Fos: Protein of gene *c-fos*
Fos-IR: c-Fos immunoreactivity
LD: Light / Dark Cycle
PeF: Perifornical Area
PER1: Protein of clock gene *per1*
PER1-IR: Per1 immunoreactivity
PVT: Paraventricular Thalamic Nucleus
RFS: Restricted feeding schedules
SCN: Suprachiasmatic Nucleus
SCNX: Suprachiasmatic lesion group
ZT: Zeitgeber Time

INTRODUCTION

Restricted feeding schedules (RFS) organize daily rhythms around meal-time. The rats under RFS develop arousal, foraging and increased locomotor activity preceding food access, which has been termed as food anticipatory activity (FAA). Associated with this behavioural activation, serum corticosterone, core temperature (Krieger et al., 1977; Krieger, 1979; Martinez-Merlos et al., 2004) and temporal patterns of neuronal activation in diverse brain areas, shift their phase in anticipation to the daily meal (Angeles-Castellanos et al., 2004, 2007, 2008; Gooley, 2006). RFS have proven to be strong entraining signals for the daily expression of clock genes in peripheral tissues (i.e. liver digestive system), overriding the temporal signals provided by the suprachiasmatic nucleus (SCN); (Damiola et al., 2000; Balsalobre et al., 2000; Stokkan et al., 2001; Rutter et al., 2001; Brown et al., 2002; Hirota et al., 2002; Davidson et al., 2003). Likewise feeding schedules entrain clock genes in brain areas related with feeding behavior while the SCN the biological clock, remains coupled to the light / dark cycle (LD); (Amir et al., 2004; Hara et al., 2001; Mieda et al., 2006; Angeles-Castellanos et al., 2007, 2008) This evidence has indicated that metabolic cues preferentially synchronize peripheral oscillators independently of signals from the SCN, (Schibler, 2005) and has suggested independent mechanisms between food and light entrained systems (Stephan, 2002). The independency of food entrained rhythms from the SCN was first indicated with studies proving evidence that food entrained rhythms persisted after performing bilateral lesions of the SCN (Krieger et al., 1977; Phillips and Mikulka, 1979; Stephan et al., 1979; Boulos et al., 1980). Thereafter further

1 studies confirmed that bilateral lesions of the SCN do not interfere with the
2 expression of anticipatory activity (Stephan et al., 1979; Phillips and Mikula,
3 1979; Mistlberger, 1994) nor with food entrained corticosterone peak and
4 temperature rhythms (Honma et al., 1989, 1992; Krieger et al., 1977). The
5 independence of both food and light entrained systems has been further
6 confirmed by studies describing that food entrainment does not modify temporal
7 patterns of clock gene expression in the SCN (Hara et al., 2001; Balsalobre et
8 al., 2000; Stokkan et al., 2001) and does not modify the onset of the SCN driven
9 nocturnal activity (Stephan, 1981; Escobar et al., 2007; Mistlberger, 1994).
10 In spite of strong evidence for two independent systems, diverse studies have
11 indicated that special circumstances uncover interplay between the light and the
12 food entrained systems. Long intervals of RFS with regular food result in
13 entrainment of Per2 in the SCN and of free running behavioral patterns (Castillo
14 et al., 2004) indicating an interaction of feeding cues and the SCN. This
15 process is especially evident in CS mice, characterized by exhibiting a weak
16 clock gene control of circadian rhythms (Abe et al., 2007; Horikawa et al.,
17 2003). Likewise, in rats maintained in constant darkness (DD) general
18 locomotor activity and body temperature are entrained with a timed hypocaloric
19 diet, which induces weight loss and a strong negative metabolic state (Challet et
20 al., 1996). This same diet promotes a phase advance of photic entrained
21 locomotion and mPer1 rhythms in animals maintained in an LD cycle (Caldelas
22 et al., 2004; Challet et al., 1997, 1998; Mendoza et al., 2005). In protein
23 malnourished rats a similar process was observed, in which the free running
24 behavioral activity was entrained to RFS (Salazar-Juarez et al., 2003). Both
25 procedures indicate that the SCN receives information of the metabolic state

1 and that extreme caloric or protein restriction interfere with the activity or
2 become potent entraining signals for the SCN.

3 We have recently described that in food entrained rats the neuronal activity in
4 the SCN, measured with c-Fos immunoreactivity (Fos-IR), is decreased at the
5 time when rats are exhibiting anticipatory activity, as compared with rats that
6 where expecting food but did not anticipate (Escobar et al., 2007). We have
7 also reported that feeding schedules can produce up-regulation of the Per1
8 immunoreactivity (PER1-IR) daily peak in the SCN without modifying the SCN
9 driven temporal pattern (Angeles-Castellanos et al., 2008).

10 Altogether there is evidence suggesting input of the food-entrained systems to
11 the SCN while little is known whether the SCN can influence the activity of food
12 entrained systems. The present study was aimed to determine the participation
13 of the SCN in food entrained rhythms. We hypothesized that the SCN interferes
14 with the expression of food entrained rhythms in behaviour, metabolism and
15 neuronal response, possibly as a strategy to maintain the organism coupled to
16 the LD cycle. Consequently bilateral lesions of the SCN will result in
17 disinhibition and stronger process of food entrainment leading to increased FAA
18 and food entrained patterns of neuronal activation as compared with intact
19 animals.

20 The effects of SCN lesions were explored on the temporal profile of behaviour,
21 corticosterone, glucose, Fos-IR and Per1-IR expression in the hypothalamus
22 and corticolimbic structures of food-entrained intact (Control) and SCN lesioned
23 rats (SCNX).

MATERIALS AND METHODS

Animals and general housing conditions

Adult male Wistar rats weighing between 200 to 250g at the beginning of the experiment were housed in individual cages and were maintained in a soundproof monitoring room with a 12:12 h light-dark cycle, lights-on at 07:00, defined as ZT0 and light off at 19:00 defined as ZT12. The room was maintained at a constant temperature of $22 \pm 1^\circ\text{C}$ and with continuous air flow. Rats had free access to food (Rodent Laboratory Chow 5001) and water, unless otherwise stated. Experimental procedures used in this study were in strict accordance with the Mexican norms for animal handling Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, which conforms to international guidelines for animal handling, and were approved by the Ethics Committee in the Medicine Faculty UNAM. All efforts were made to minimize the number of animals and their suffering.

Groups and Food Entrainment

After two weeks of acclimation to the monitoring system rats were randomly assigned to an intact SCN control group (Ctrl), or to an SCN lesion group (SCNX). After surgical procedures rats were allowed for at least a month to recover before starting food entrainment. Rats of both groups were exposed to restricted feeding schedules for 3 weeks, whereby rats were fed for 2 h daily from 1300 to 1500, corresponding to ZT6-ZT8. After 3 weeks of the feeding protocol rats were anesthetized and perfused at one of six temporal points ($n=4$ per temporal point): 07, 10, 13, 16, 19 and 01 geographic hours (ZT0, ZT3, ZT6, ZT9, ZT12 and 18). At the end of the second week of food-entrainment a

second group of rats under the same conditions received an intrayugular cannula and at the end of the third week blood samples were obtained to determine glucose and corticosterone rhythms.

General Activity monitoring system

The individual rat cages (45x30x35 cm) were placed on plates with movement sensors in soundproof lockers with controlled lighting conditions. The detection system was developed in our group with the contributions from Nico Bos in Amsterdam the Netherlands and the Mexican biomedical company Omniaiva. Sensors as previously reported (Escobar et al., 2007). Behavioral events were collected with a digitized system and automatically stored with a PC in 15 min intervals for further analysis with a system developed for our laboratory SPAD9 based on Matlab.

For each rat double-plotted actograms were obtained, movement counts were normalized to the proportional percentage of the daily activity and mean activity waveforms were obtained for the baseline and for the last 10 days of the food entrainment protocol.

The intensity of FAA was estimated by obtaining the total counts of activity displayed by the rats before food time. Number of counts were grouped on an hour basis and represented for 4, 3, 2 and 1 h before meal.

Surgical procedure for SCN lesions

Rats assigned to the SCNX group were anesthetized with a mixture of ketamine (90 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) and were placed in a stereotaxic frame for rats (David Kopf model 900). Rats received bilateral lesions directed

1 to the SCN, using stainless-steel insect-pins insulated with with epoxy paint
2 except at the tips (0.20mm). The pin tips were lowered according to coordinates
3
4 bregma 0, lateral +0.2 from the midsagittal sinus, and -9.4 ventral from the dural
5
6 surface. One mA of direct current was delivered for 30 seconds with a lesion
7
8 maker elaborated in our group. Rats were left to recover for at least one month
9
10 in their home cages and their spontaneous activity was monitored to verify
11
12 arrhythmicity in a LD cycle. Only rats that showed arrhythmic activity after visual
13
14 inspection of the actogram and analysis with the χ^2 -periodogram were included
15
16 for the SCN group.
17
18
19
20
21
22
23

24 Surgical procedure for intra-jugular cannula insertion

25 At the end of the 2nd food entrainment week rats underwent surgery to implant
26
27 a jugular cannula (Ctrl n=8, SCN n=8). animals were anesthetized with Zoletil
28
29 100 (Virbac 0.01 ml/100 g) and cannulated in the internal jugular vein with a
30
31 polyethylene silicon tube (0.025 in. i.d. and 0.047 in. o.d.; Silastic Laboratory
32
33 tubing; Dow Corning Corp., Midland, MI, USA) filled with heparin (500 U/ml) as
34
35 anti-coagulant. The outer end of the cannula was fixed in the back between
36
37 both shoulder blades and clotted with a small needle. Rats were allowed to
38
39 recover during the 4 days. And blood samples were obtained distributed in 2
40
41 days to cover a 24 h cycle of 3 h intervals (ZT0, ZT3, ZT6, ZT9, ZT12, ZT18).
42
43 Blood samples (500 μ l) were collected in Eppendorf tubes (1.8 ml) containing a
44
45 clot-activator gel and were centrifuged at 2500 r.p.m. during 5 min, serum was
46
47 stored in 50 μ l aliquots at 45°C until assay. Aliquots were processed with
48
49 colorimetric methods for determination of glucose, and with ELISA for
50
51 corticosterone.
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64

1. Glucose and corticosterone determinations

2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
Glucose was estimated from a 10 μ l sample using a commercial colorimetric kit
(No.70478; Hycel de México), which is based in the reaction between glucose
and fenol-4-aminofenazona as chromogen and was measured at 500 nm.
Corticosterone was determined with Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
(ELISA) with a commercial Kit rat corticosterone (Diagnostic Systems
Laboratories (DSL) Webster Texas USA), and converted with a standard curve
to serum corticosterone. Daily temporal profiles were compared among groups
and with relation to the LD cycle.

Histology and Immunohistochemistry

The last day of the entrainment protocol rats were anesthetized with an
overdose of sodium pentobarbital (Anestosal 65 mg/ml), and were perfused
transcardially with 250 ml of 0.9% saline followed by 250 ml of fixative 4%
paraformaldehyde in phosphate buffer saline (PBS, 0.1M, pH 7.2). Brains were
removed, post fixed for 24 h and cryoprotected in 30% sucrose for 3-4 days.
Brains were frozen and cut in sections of 40 μ m at -18°C. Sections were serially
collected in 4 sets, one set was stained with cresyl violet acetate (Sigma
Chemical Company) for confirmation of the complete SCN lesion. A second set
of sections was processed for Fos-IR and a third set was processed for PER1-
IR.
Free floating sections were incubated in c-Fos antibody raised in rabbit (1:2500;
Santa Cruz biotechnology, Santa Cruz, CA) or in PER1 raised in goat (1:1000;
Santa Cruz biotechnology, Santa Cruz, CA) in phosphate buffer 0.1M, ph 7.2
with 0.9% saline, 1% goat serum, and 0.3% Triton X-100 (PBSGT) for 72 hrs.

This was followed by incubation in secondary antibody, goat anti-rabbit for Fos or rabbit anti-goat for PER1 (Vector Laboratories) 1:200 in PBSGT for 2 h at room temperature, followed by incubation in avidin-biotin complex (0.9% avidin and 0.9% biotin solutions; Vector Laboratories) in PBSGT for 2 h at room temperature. Between each incubation sections were rinsed 3 times for 10 minutes in PBS. Tissues were reacted with diaminobenzidine (50mg/100ml) and hydrogen peroxide (35 µl, 30% H₂O₂) to obtain a redish brown color. Tissues were mounted, dehydrated and coverslipped with microscopy Entellan (Merck).

Cell Count

In order to quantify Fos-IR and PER1-IR positive cells in hypothalamic and forebrain areas, three representative sections for each structure were selected in accordance with the stereotaxic atlas from Paxinos and Watson, (1998). In forebrain areas we analyzed the nucleus accumbens (Acc) at bregma 2.20, 1.70 and 1.60mm. The Acc was then subdivided and evaluated in its two sub-regions core (Acc-Core) and shell (Acc-Shell); the paraventricular thalamic nucleus (PVT) was analyzed at level of bregma -1.60, -1.80 and -1.88mm; and the central amygdala (CeA) at level of bregma -2.56, -2.80 and -3.14.

In the hypothalamus three posterior sections were selected at level bregma -2.80, -3.14 and -3.30mm containing the dorsomedial (DMH), perifornical (PeF), and the arcuate nucleus (ARC).

Images of selected sections were digitized at a 20X magnification using a computerized image system (Image-Pro plus 5.1; mediaCibemetic) attached to a light microscope (Olympus BX41). Cells positive to Fos-IR and PER1-IR were counted bilaterally in the selected sections with the image processing program

(ImageJ) of the National Institutes of Health (NIH Image). To minimize the number of false positives, background optic density was established in a nearby region lacking Fos-IR or PER1-IR, stained cells that reached or surpassed 2X the background optic density were considered positive and were included, whereas cells under this staining threshold were discarded. A single examiner, who was blinded to treatment conditions, performed all counts.

Data Analysis

Data for FAA were classified by group and hour and were compared with a two-way ANOVA for the factors group (2 levels) and hour (5 levels).

Serum concentration of glucose, and corticosterone was compared with a two-way ANOVA for the factors group (2 levels) and time (6 levels) as a factor of repeated measures for the metabolic measurements.

The number of Fos-IR and PER1-IR positive cells in the sections for each structure was classified for group and time and are represented as mean \pm standard error of the mean. Data for the 2 groups were compared with a two-way ANOVA for independent measures with a factor for group (2 levels) and a factor for time (6 levels). The two-way ANOVA was followed by a Tukey post hoc test with significant values set at $p < 0.05$. Statistical analysis was performed with the program Statistical version 4.5 (StatSoft, Inc. 1993).

To highlight the response of Fos-IR in anticipation and after the meal, we included data from control *ad libitum* rats at ZT6 and ZT9, previously reported by our group (Angeles-Castellanos et al., 2004; 2007).

RESULTS

Actograms indicated robust nocturnal patterns in intact control rats and complete loss of rhythmicity in about 80% of rats exposed to bilateral electrolytic lesion of the SCN (Figure 1D and G). Average activity confirmed the diurnal activity rhythm in the control group and the arrhythmic pattern in SCN group in a LD cycle and under food *ad-libitum* conditions (Figure 1E, H). Sections processed with cresyl violet confirmed the complete or partial lesions in the SCN. Subjects that proved to have complete lesions were included in the analysis (Figure 1A and B) while rats bearing incomplete or failed lesions were discarded (Figure 1C).

Actograms clearly indicate that in the Ctrl group RFS produced anticipatory activity in all the rats, characterized by increased general activity at least 2 hours prior to and at the moment of meal time (Figure 1D). In SCN rats RFS also produced FAA, and for most cases it was and higher of earlier onset than controls (Figure 1F and I). A further analysis representing the total activity per hour prior to food access indicated an early onset of FAA in the SCN group with increased significant activity 3h prior to meal time while the intact group exhibited increased significant values only 1 h previous to the scheduled meal (Figure 2A). The two way ANOVA indicated significant difference between Ctrl and SCX groups ($F(1,14)=6.04$; $p<0.02$), a significant effect of time ($F(5,70)=25.76$; $p<0.0001$) and no interaction group X time ($F(5,70)=2.15$; $p=NS$).

Glucose and Corticosterone Entrainment

In the Ctrl group feeding schedules entrained the daily corticosterone rhythm with highest levels anticipating meal time (Figure 2B). The SCN rats also

showed high corticosterone levels anticipating the scheduled meal, but with higher levels and an earlier onset than the intact controls. Mean daily values were significantly higher in the SCN group than the controls. The two-way ANOVA indicated statistical difference between Ctrl and SCNX groups ($F(1,30)=38.58$; $P<0.0001$) a significant effect for the factor time ($F(5,30)=10.13$; $P<0.0001$), and for the interaction group X time ($F(5,30)=9.9$; $P<0.001$). Serum glucose in the Ctrl group showed peak values after the daily meal while no response of glucose was observed for the SCX group (Figure 2C). The two-way ANOVA indicated no difference between Ctrl and SCNX groups ($F(1,33)=4.02$; $P=NS$) a significant effect for the factor time ($F(5,33)=5.1$; $P<0.001$), and significant effect in the interaction group X time ($F(5,33)=3.3$; $P<0.01$).

C-Fos expression

In both Ctrl and SCNX groups Fos-IR was observed in all hypothalamic and limbic structures analyzed for this study. In control rats the ARC, DMH and PeF showed significantly increased Fos-IR in anticipation and after meal time, Fos-IR values at ZT6 and ZT9 were significantly higher than values at ZT0 or ZT3 and also higher than values expected for *ad libitum* rats as previously reported for the same time point (Angeles-Castellanos et al., 2004; see Figure 3 white bars at ZT6 and ZT9).

Similarly for the ARC, DMH and PeF, the SCN group exhibited higher Fos-IR neurons in anticipation (ZT6) to food than the intact controls, also the DMH showed significantly increased values after feeding (Figure 3). The two-way ANOVA evidenced a significant difference between the Ctrl and SCNX for the

ARC groups ($F(1,35)=7.28$; $P<0.01$), for the DMH ($F(1,35)=16.27$; $P<0.0002$) but not for the PeF ($F(1,35)=2.55$; $P=NS$). A significant effect for the factor time was obtained for the ARC ($F(5,35)=12.06$; $P<0.0001$), for the DMH ($F(5,35)=35.96$; $P<0.0001$) and for the PeF ($F(2,35)=19.78$; $P<0.001$) and for the 3 structures ANOVA indicated a significant effect due to the interaction group X time $F(5,35)=7.09$; $P<0.001$ for the ARC, $F(5,35)=13.15$; $P<0.001$ for the DMH and $F(5,35)=3.4$; $P<0.01$ for the PeF.

In the limbic structures (Acc-Core, Acc-Shell in the PVT and CeA) the control group exhibited significant high Fos-IR values in anticipation and during the next 6 after food access (ZT6, ZT9 and ZT12) as compared with ZT0, ZT3 and previously reported for *ad libitum* rats (Figure 4). In contrast to the response observed in hypothalamic nuclei Fos-IR in the limbic structures of SCN rats was significantly lower than in intact rats. In spite of lower values in both Accumbens subregions and in the PVT the SCN rats showed anticipatory Fos-IR prior to food access at ZT6 and activity after feeding at ZT9 significantly different from ZT0. In contrast, in the SCN rats the CeA did not show anticipatory activation preceding mealtime, but only a peak at ZT9 in response to meal access. The two-way ANOVA confirmed significant difference between Ctrl and SCN groups (Acc-Core: $F(1,35)=26.96$; $P<0.0001$; Acc-Shell: $F(1,35)=22.10$; PVT $F(1,35)=48.01$; $P<0.0001$ and CeA $F(1,34)=135.27$; $P<0.0001$), also significant difference in the factor time (Acc-Core: $F(5,35)=13.9$; $P<0.0001$; Acc-Shell: $F(5,35)=14.03$; $P<0.0001$; PVT $F(5,35)=6.31$; $P<0.0002$; and CeA $F(5,34)=18.48$; $P<0.0001$) and the interaction of group X time (Acc-Core: $F(5,35)=3.93$; $P<0.006$; Acc-Shell: $F(5,35)=3.31$; $P<0.01$; PVT $F(5,35)=3.08$; $P<0.02$; and CeA $F(5,34)=2.01$; $P=NS$).

Circadian expression of PER1

Daily rhythms of PER1-IR expression were identified in all structures for both Ctrl and SCN groups (Fig. 5 and 6).

In the ARC and DMH nuclei, both involved in metabolic homeostasis, the Ctrl and SCN groups showed similar daily food entrained patterns of PER1-IR, however with higher amplitude (Fig. 5A). Especially for the DMH a significant increase in the amplitude was observed in the SCN group at the peak associated with anticipation (ZT12). The two-way ANOVA indicated a significant difference between groups for the DMH ($F(1,26)=24.84$; $p<0.0001$) and no difference for the ARC ($F(1,27)=1.27$; $p=NS$); significant difference due to time (ARC: $F(5,27)=28.98$; $p<0.0001$, DMH: $F(5,26)=48.27$; $p<0.0001$) and due to the interaction of both factors group X time (ARC: $F(5,27)=3.67$; $p<0.01$ and DMH: $F(5,26)=4.47$; $p<0.004$). In the PeF the expression of PER1-IR was very scarce and in most cases inexistent, no temporal pattern could be determined for the different groups (data not shown).

In both Acc subregions (Core and Shell) and in the CeA, food entrainment imposed a daily peak at ZT12 in both groups Ctrl and SCN (Figure 6A, 6B and 6D), however in the SCN group the daily pattern in the Acc-Core was significantly disrupted. In the PVN the food entrained peak was at ZT6 for the Ctrl group while in the SCN group peak values were reached at ZT12 as observed in other limbic areas (Figure 6C). Statistical analysis indicated significant difference between groups for Acc-Core ($F(1,35)=34.16$; $p<0.0001$) and for the PVT: $F(1,35)=9.66$; $p<0.003$, but not for Acc-Shell ($F(1,35)=0.53$; $p=NS$) or for CeA: $F(1,30)=4.11$; $p=NS$. For the effect of time the two way

ANOVA indicated a significant effect for all corticolimbic structures: for the Acc-Core ($F(5,35)=17.22$; $p<0.0001$) for the Acc-Shell ($F(5,35)=47.23$; $p<0.00001$), for the CeA ($F(5,30)=14.49$; $p<0.00001$) and for the PVT ($F(5,35)= 7.67$; $p<0.0001$). Then interaction of group X time was significant for both Acc subregions ($F(5,35)= 4.44$; $p<0.003$ for the Acc-Core; $F(5,35)=14.10$; $p<0.00001$ for the Acc-Shell) for the PVT ($F(5,35)= 11.97$; $p<0.0001$), but not for the CeA ($F(5,30)= 2.06$; $p=NS$).

Discussion

In agreement with previous reports, complete SCN lesions abolished circadian rhythms of general activity and did not interfere with the expression of anticipatory activity, and food entrained corticosterone rhythms (Krieger et al., 1977; Stephan, 1983; Mistlberger, 1994; Honma et al., 1989). The present study showed that food entrained rhythms of Fos-IR and PER1-IR, persisted in animals bearing bilateral lesions of the SCN and moreover in agreement with the observed increase in behavioural anticipatory behaviour and increased anticipatory corticosterone peak, the Fos-IR anticipatory increase in hypothalamic nuclei was significantly higher as compared to the intact controls. Present data demonstrate that in the absence of the SCN, the food entrained corticosterone peak and food entrained cellular activation in the hypothalamus are expressed with higher intensity suggesting a possible disinhibition due to removal of an inhibitory influence exerted by the SCN. This change in intensity of FAA rhythms suggests that during daytime food entrainment, the SCN interacts with hypothalamic nuclei involved in activity and corticosterone regulation and exerts an inhibitory influence. We can speculate that this

influence can be aimed at keeping the outputs coupled to the light/dark cycle in order to avoid internal desynchronization.

A number of studies have shown that in the nocturnal rat inhibition of the SCN coincides with the expression of locomotor activity (Schaap and Meijer, 2001) and that increased activity of the SCN coincides with inhibition of locomotion activity (Buijs et al., 1999; Meijer et al., 1992; Meijer and Schwartz, 2003). In a previous study we described inhibition of the daily Fos-IR expression in the SCN in rats anticipating food while in hungry rats that were not able to predict and anticipate the meal, the daily Fos-IR expression in the SCN persisted similar to undisturbed *ad libitum* rats (Escobar et al., 2007). Like wise it is demonstrated that the SCN has an inhibitory influence on corticosterone secretion. Rats bearing bilateral lesions of the SCN show higher average values of corticosterone and in response to a stressful stimulus (Buijs et al., 1993). Direct anatomical outputs between SCN and hypothalamic nuclei, include the ARC and DMH, (Leak and Moore, 2001; Abrahamson et al., 2001), two nuclei involved in coordinating metabolic processes and behavioural activation (Yi et al., 2006; Aston-Jones et al., 2001). These projections enable the SCN to transmit rhythmicity to metabolic and arousal systems and they enable the SCN to keep their activity coupled to the LD cycle (Aston Jones et al., 2001).

Contrary to the effects observed in the hypothalamus, in the limbic system all structures showed decreased Fos-IR activity in anticipation and as a response to food, suggesting a significant influence of the SCN for the neuronal activation during anticipatory activity. Feeding schedules shift PER1-IR peaks in the corticolimbic structures to ZT12, except in the PVT that shifts to ZT6, as we

1 have described previously (Angeles-Casellanos et al., 2007). In SCN rats
2 general patterns were not modified and food entrained rhythms of PER1-IR did
3 not vary significantly in the Acc-Shell and CeA. However in SCN rats we
4 observed in the PVT a shift to ZT12 suggesting a restraining effect from the
5 SCN and disinhibition after the lesion. It is known that both nuclei have a direct
6 bidirectional anatomical relationship (Moga et al., 1995; Novak et al., 2000), and
7 it is suggested to provide a pathways for visceral and motivational aspects of
8 behaviour (Moga et al., 1995).

9 It is important to note that in the Acc-Core we observed an up-regulation of the
10 circadian expression of PER1-IR, this structure has been related to the
11 behaviour of expectancy and anticipation named "Wanting" (Ahn and Phillips,
12 2002; Berridge and Robinson, 2003; Cardinal and Everitt, 2004) and could be
13 related with the increased intensity of FAA observed in the SCN rats.

14 An unexpected finding was the loss of food-entrained rhythm of glucose in rats
15 with SCN lesions. It is well documented that the daily glucose rhythm exhibits a
16 nocturnal peak and is driven by the SCN (Cailotto et al., 2005; La Fleur et al.,
17 1999; LaFleur, 2003). Restricted feeding schedules modify this pattern
18 producing a food related increase immediately after feeding (Escobar et al.,
19 2005). Thus the loss of the food-entrained glucose peak after SCN lesion
20 indicates a relevant input of the SCN to mediate this response and confirm the
21 dependence of the glucose rhythm on SCN integrity.

22 A main effect of SCN lesions was observed in the cellular activation and
23 rhythmicity of the DMH. Both markers of activity Fos-IR and PER1-IR were up-

24 regulated after SCN lesions. The DMH, is suggested to be one of the main
25 regulators of food entrained rhythms (Gooley et al., 2006), it plays a critical role
26 for the expression of circadian rhythms due to direct projections from the SCN
27 (Watts and Swanson, 1987; Buijs et al., 1994) and it integrates metabolic
28 signals for the regulation of feeding and energy consumption (Aston Jones et
29 al., 2001; Thompson et al., 1996). Therefore it is suggested that a food
30 entrained oscillator may be located in the DMH (Gooley et al., 2006). Present
31 data do not rule out this possibility and they point out a significant strengthening
32 of food entrained patterns after SCN lesions especially in this nucleus
33 confirming the control of the SCN on the DMH daily rhythms and the relevance
34 of DMH for food entrainment.

35 Altogether evidence indicates an inhibitory modulation of the SCN on
36 hypothalamic activity, on general locomotion and corticosterone secretion.
37 Although the SCN is not necessary to express food-entrained rhythms, it
38 participates actively during food entrainment, modulating the response of
39 hypothalamic and corticolimbic structures, possibly to prevent them from
40 uncoupling from the LD cycle. Further studies will need to explore the functional
41 mechanisms of the pathways regulating this interaction and the reciprocal
42 exchange of metabolic and temporal signals between the light and the food
43 entrained systems.

44 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank MD. Siraam Cabrera Vasquez for technical assistance in corticosterone analyzes. This study was supported by grants CONACyT 43950-M and PAPIIT-UNAM IN-203907; IN205809.

REFERENCES

- Abe H, Honma S, Honma K (2007) Daily restricted feeding resets the circadian clock in the suprachiasmatic nucleus of CS mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292: R607-R615.
- Abrahamson EE, Leak RK, Moore RY (2001) The suprachiasmatic nucleus projects to posterior hypothalamic arousal systems. *Neuroreport* 12:435-440.
- Ahn S, Phillips AG (2002) Modulation by central and basolateral amygdalar nuclei of dopaminergic correlates of feeding to satiety in the rat nucleus accumbens and medial prefrontal cortex. *J Neurosci* 22:10958-10965.
- Amir S, Waddington E, Robinson B, Stewart J (2004) A circadian rhythm in the expression of PERIOD2 protein reveals a novel SCN-controlled oscillator in the oval nucleus of the bed nucleus of the stria terminalis. *Neuroscience* 24:781-790.
- Ángeles-Castellanos M, Aguilar-Roblero R, Escobar C (2004) C-Fos expression in hypothalamic nuclei of food-entrained rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286: R159-R165.

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

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

Aston-Jones G, Chen S, Zhu Y, Oshinsky ML (2001) A neural circuit for circadian regulation of arousal. *Nat Neurosci* 4:732-738.

Balsalobre A, Brown SA, Marcacci L, Tronche F, Kellendonk C, Reichardt HM, Schütz G, Schibler U (2000) Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science* 289:2344-2347.

Berridge KC, Robinson TE (2003) Parsing reward. *Trends in Neurosciences* 26:507-513.

Boulos AM, Rosenwasser AM, Terman M (1980), Feeding schedules and the circadian organization of behaviour in the rat. *Behav Brain Res* 1:39-65.

Brown SA, Zumbrunn G, Fleury-Olela F, Preitner N, Schibler U (2002) Rhythms of mammalian body temperature can sustain peripheral circadian clocks. *Curr.Biol* 12:1574-1583.

1 Buijs RM, Kalsbeek A, Van der Woude TP, Van Heerikhuizen JJ, Shinn S (1993)
2 Suprachiasmatic nucleus lesion increases corticosterone secretion. *Am J*
3 *Physiol* 264:R1186-R1192.
4
5
6
7
8
9
10 Buijs RM, Hou YX, Shinn S, Renaud LP (1994) Ultrastructural evidence for
11 intra- and extranuclear projections of GABAergic neurons of the
12 suprachiasmatic nucleus. *J Comp Neurol* 340:381-391.
13
14
15
16
17
18
19 Buijs RM, Wortel J, Van Heerikhuizen JJ, Feenstra MG, Ter Horst GJ, Romijn
20 HJ, Kalsbeek A (1999) Anatomical and functional demonstration of a
21 multisynaptic suprachiasmatic nucleus adrenal (cortex) pathway. *Eur J Neurosci*
22 11:1535-1544.
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64

Caillotto C, La Fleur SE, Van Heijningen C, Wortel J, Kalsbeek A, Feenstra M,
Pévet P, Buijs RM (2005) The suprachiasmatic nucleus controls the daily
variation of plasma glucose via the autonomic output to the liver: are the clock
genes involved? *Eur J Neurosci* 22:2531-2540.

Caldelas I, Feillet CA, Dardente H, Eclancher F, Malan A, Goumelien S, Pévet
P, Challet E (2004) Timed hypocaloric feeding and melatonin synchronize the
suprachiasmatic clockwork in rats, but with opposite timing of behavioral output.
Eur J Neurosci 22:921-929.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64

Cardinal RN, Everitt BJ (2004) Neural and psychological mechanisms
underlying appetitive learning: links to drug addiction. *Curr Opin Neurobiol*
14:156-162.

Castillo MR, Hochstetler KJ, Tavamier RJ, Greene DM, Built-to 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 (1996) 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, Vivien-Roels B, Malan A (1997) Phase-advanced daily
rhythms of melatonin, body temperature, and locomotor activity in food-
restricted rats fed during daytime. *J Biol Rhythms* 12:65-79.

Challet E, Solberg LC, Turek FW (1998) Entrainment in calorie-restricted mice:
conflicting zeitgebers and free-running conditions. *Am J Physiol* 274:R1751-
R1761.

Damiola F, Le Minh N, Preitner N, Kommann B, Fleury-Olefa 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.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64

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.

Escobar C, Angeles-Castellanos M, Solis-Salazar T, and Mendoza J (2005) Metabolic parameters are food-entrained in rats made cirrhotic by chronic CCl4 treatment. *Biological Rhythm Research* 36:39-45.

Escobar C, Martínez-Merlos MT, Angeles-Castellanos M, Miñana-Solis MC, Buijs RM (2007) Unpredictable feeding schedules unmask a system for daily resetting of behavioural and metabolic food entrainment. *Eur J Neurosci* 26:2804-2814.

Gooley JJ, Schomer A, Saper CB (2008) The dorsomedial hypothalamic nucleus is critical for the expression of food-entrainable circadian rhythms. *Nat Neurosci* 9:398-407.

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.

Hirota T, Okano T, Kokame K, Shirohani-Ikejima H, Miyata T, Fukada Y (2002) Glucose down-regulates Per1 and Per2 mRNA levels and induces circadian gene expression in cultured Rat-1 fibroblasts. *J Biol Chem* 277: 44244-44251.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64

Honma S, Honma K, Hiroshige T (1989) Methamphetamine induced locomotor rhythm entrains to restricted daily feeding in SCN lesioned rats. *Physiol Behav* 45: 1057-1065.

Honma S, Kanematsu N, Honma K (1992) Entrainment of methamphetamine-induced locomotor activity rhythm to feeding cycles in SCN lesioned rats. *Physiol Behav* 52: 843-850.

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.

Krieger DT, Hauser H, Krey LC (1977) Suprachiasmatic nuclear lesions do not abolish food-shifted circadian adrenal and temperature rhythmicity. *Science* 197:396-399.

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

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64

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

La Fleur SE (2003) Daily rhythms in glucose metabolism; suprachiasmatic nucleus output to peripheral tissue. *J Neuroendocrinol* 153:315-322.

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

Martinez-Merlos MT, 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 Endocrinology* 181:53-63.

Mendoza J, Graf C, Dardente H, Pevet P, Challet E (2005) Feeding cues alter clock gene oscillations and photic responses in the suprachiasmatic nuclei of mice exposed to a light/dark cycle. *J Neurosci* 25:1514-1522.

Meijer JH, Schwartz WJ (2003) In search of the pathways for light-induced pacemaker resetting in the suprachiasmatic nucleus. *J Biol Rhythms* 18:235-49.

Meijer JH, Rusek B, Gänshirt G (1992) The relation between light-induced discharge in the suprachiasmatic nucleus and phase shifts of hamster circadian rhythms. *Brain Res* 598:257-263.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64

Mieda M, Williams SC, Richardson JA, Tanaka K, Yanagisawa M (2006) The dorsomedial hypothalamic nucleus as a putative food-entrainable circadian pacemaker. *Proc Natl Acad Sci* 103:12150-12155.

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

Moga MM, Weis RP, Moore RY (1995) Efferent projections of the paraventricular thalamic nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 359:221-238.

Novak CM, Harris JA, Smale L, Nunez AA (2000) Suprachiasmatic nucleus projections to the paraventricular thalamic nucleus in nocturnal rats (*Rattus norvegicus*) and diurnal Nile grass rats (*Arvicornis niloticus*). *Brain Res* 874:147-157.

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

Phillips JL, Mikulka PJ (1979) The effects of restricted food access upon locomotor activity in rats with suprachiasmatic nucleus lesions. *Physiol Behav* 23: 267-262.

Rutter J, Reick M, Wu LC, McKnight SL (2001) Regulation of clock and NPAS2 DNA binding by the redox state of NAD cofactors. *Science* 293: 510-514.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64

Salazar-Juarez A, Aguilar-Roblero R, Parra L, Escobar C (2003) Restricted feeding schedules modulate free-running drinking activity in malnourished rats. *Biol Rhythm Res* 34: 459-474.

Schaap J, Meijer JH (2001) Opposing effects of behavioural activity and light on neurons of the suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci* 13:1955-1962

Schibler U (2005) The daily rhythms of genes, cells and organs. *Biological clocks and circadian timing in cells*. *EMBO Rep* S9-S13.

Stephan FK, Swann JM, Sisk CL (1979) Entrainment of circadian rhythms by feeding schedules in rats with suprachiasmatic lesions. *Behav Neural Biol* 25: 545-554.

Stephan FK (1981) Limits of entrainment to periodic feeding in rats with suprachiasmatic lesions. *J Comp Physiol* 143: 401-410.

Stephan FK (1983) Circadian rhythm dissociation induced by periodic feeding in rats with suprachiasmatic lesions. *Behav Brain Res* 7:81-98.

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.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64

Thompson RH, Canteras NS, Swanson LW (1996) Organization of projections from the dorsomedial nucleus of the hypothalamus: a PHA-L study in the rat. *J Comp Neurol* 376:143-173.

Watts AG, Swanson LW (1987) Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: II Studies using retrograde transport of fluorescent dyes and simultaneous peptide immunohistochemistry in the rat. *J Comp Neurol*. 258:230-252.

Yi CX, Van der Vliet J, Dai J, Yin G, Ru L, Buijs RM (2006) Ventromedial arcuate nucleus communicates peripheral metabolic information to the suprachiasmatic nucleus. *Endocrinology* 147:283-294.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64

FIGURE LEGENDS

Figure 1

Photomicrographs of representative of complete SCN lesion (A and B) and an incomplete SCN lesion (C) are presented. Representative double plotted general activity actograms for Intact rat under food entrained (D) and two representative actograms of SCN lesion (G) rats. Mean activity profile of 8 rats in *ad libitum* (E and H), 3 weeks under food restriction (F and I), show the differential response in intensity and duration for anticipatory activity. White and black bars represent the LD cycle, horizontal line represents the mean activity during the light phase. The rectangle in ZT6 represents food access. 3V= Third ventricle; OX= Optic chiasm.

Figure 2

in (A) normalized total activity of rats, each hour for 5 hours before the time of food, the Ctrl group (black), and SCN group (gray). * = statistical difference Ctrl and SCN group under food entrained ($p < 0.01$) (a or b) = statistical difference of temporal point between basal activity -5h for Ctrl and SCN respectively. (B) Temporal profile of serum corticosterone, and (C) temporal profile of serum glucose, in Ctrl group (black circles) and Lx (gray circles) entrained for 3 weeks to restricted feeding schedules. (*) indicate significant difference between groups and (+) indicate statistical different between temporal points of the same group. White and black bars represent the LD cycle. The rectangle in ZT6 represents food access.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64

Figure 3

Temporal pattern for the number of Fos-IR cells in hypothalamic structures in food-entrained Ctrl rats (black bars) and their SCN rats (gray bars). The white bars in ZT6 and ZT9 represent the number of Fos-IR expect in *ad libitum* rats, data reported previously. The horizontal bar on the abscissa represents food access. White and black bars represent the LD cycle. Values are mean \pm SE. Significant difference between Ctrl and Lx groups: (*) $P < 0.001$; The letters indicate statistical different between temporal points of the same group. (a) Ctrl group and (b) SCN Group. The low panel show representative micrographics in ZT6 for two groups; 3V= Third ventricle; f = Fomix.

Figure 4

Temporal pattern for the number of Fos-IR cells in corticolimbic structures in food-entrained Ctrl rats (black bars) and their SCN rats (grey bars). The horizontal bar on the abscissa represents food access. Values are mean \pm SE. Significant difference between Ctrl and SCN groups: (*) $P < 0.001$; The letters indicate statistical different between temporal points of the same group. (a) Ctrl group and (b) SCN Group. White and black bars represent the LD cycle. Other indications as in figure 3.

Figure 5

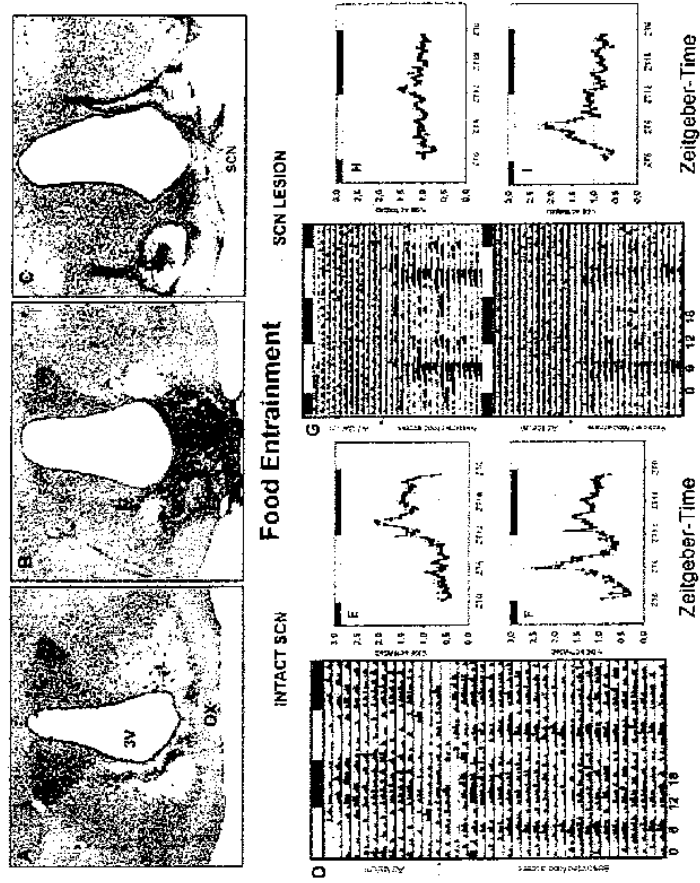
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64

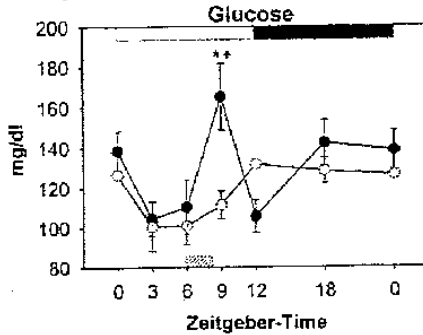
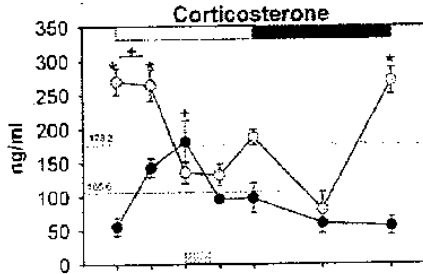
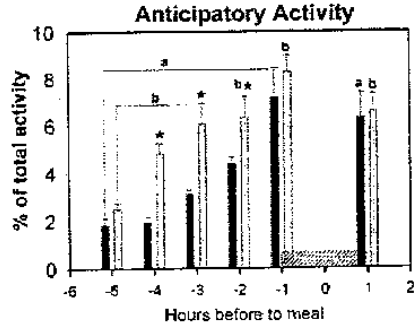
Total cell number expressing PER1 protein in the hypothalamic nuclei. The effect of food entrainment is shown on both groups. The controls (black circles), SCN group (grey circles), (*) = statistical difference between Ctrl and SCN rats ($p < 0.001$); the low panel show representative micrographics in ZT0 and ZR12 low and high expression of PER1 respectively for two groups. Other indications as in figure 3.

Figure 6

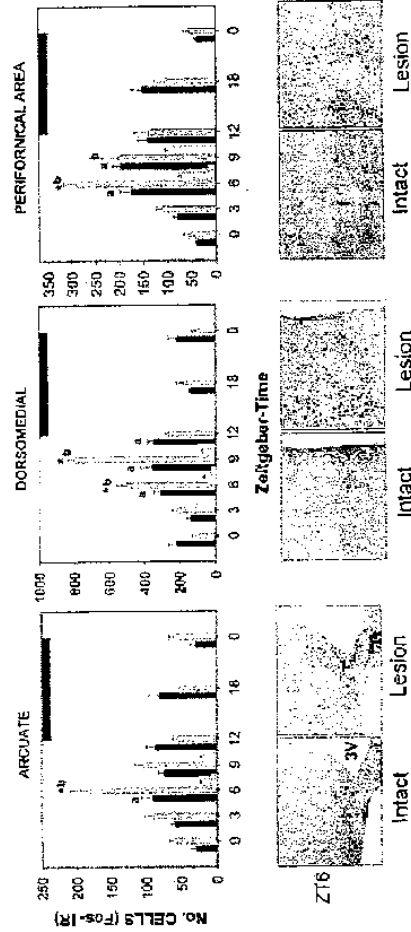
Total number of cells expressing PER1 protein in the corticolimbic regions of the Ctrl (black circles), SCN group (grey circles) * = statistical difference between Ctrl and the SCN rats ($p < 0.001$). Other indications as in figure 3

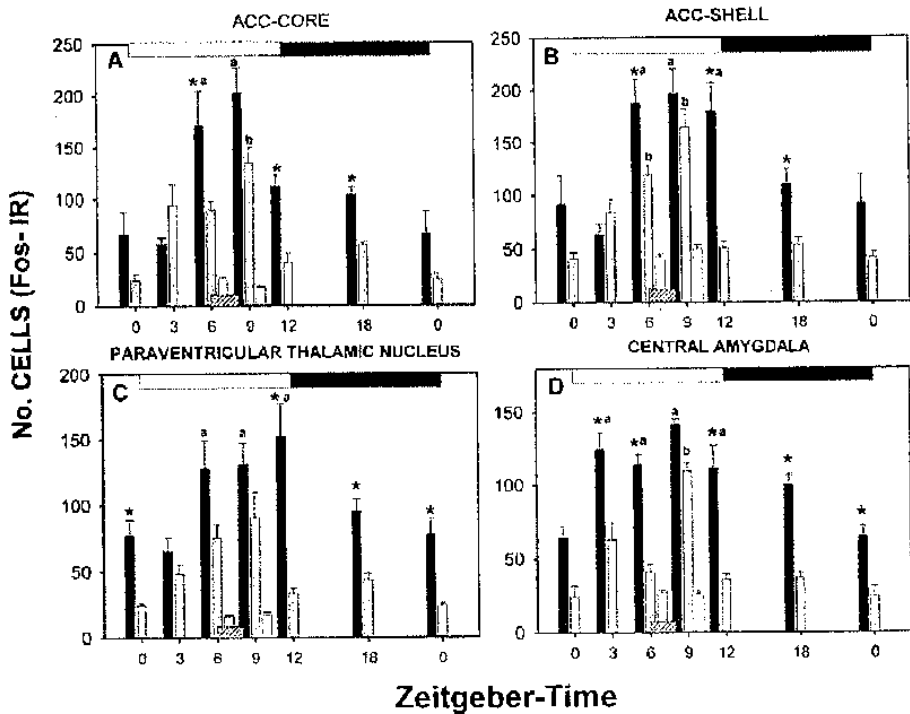
Click here to download high resolution image



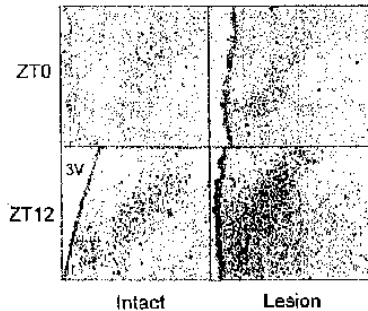
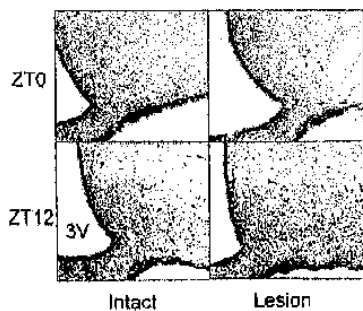
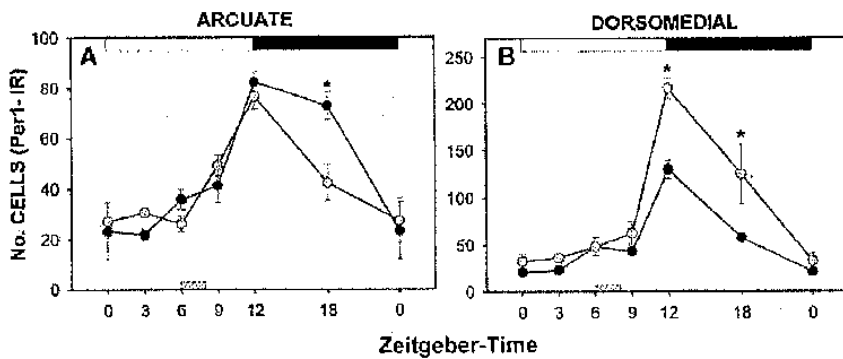


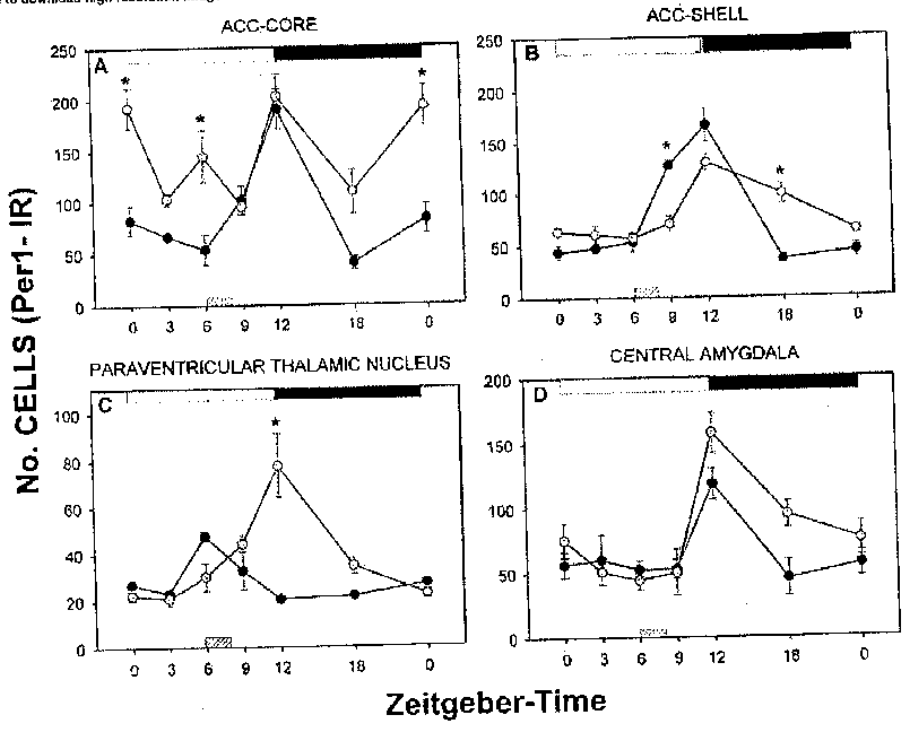
HYPOTHALAMUS





HYPOTHALAMUS





Zeitgeber-Time

Monografía

Cronobiología médica. Fisiología y fisiopatología de los ritmos biológicos

Manuel Ángeles-Castellanos,¹ Katia Rodríguez,¹ Roberto Salgado,¹ Carolina Escobar¹

¹ Laboratorio de Ritmos Biológicos y Metabolismo, Departamento de Anatomía, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

El amor hace pasar el tiempo; el tiempo hace pasar el amor
Proverbio italiano.

Introducción

La cronobiología es considerada la ciencia que estudia los ritmos biológicos en todos sus niveles de organización; es creciente el interés de comprender la organización temporal de las funciones y de la conducta.

El estudio de los ritmos biológicos también explora problemas prácticos tales como los efectos del horario de verano, la variabilidad en análisis clínicos, problemas asociados al sueño, dosificación de fármacos, etc.

El estudio de los ritmos biológicos de manera experimental es complejo, ya que involucra un correcto diseño experimental, análisis de resultados y una representación gráfica adecuada; además, requiere de un buen conocimiento de la fisiología. La vida es un movimiento permanente, hasta con observar cualquier evento a nuestro alrededor para darnos cuenta de que la naturaleza no es estática, al contrario es fluctuante y sobre todo rítmica, un ejemplo son los ciclos de las estaciones del año, los ciclos lunares y los ciclos diarios de luz - oscuridad. Es evidente que los ritmos del ambiente influyen sobre la actividad de los organismos, en función de la temperatura, de la cantidad de luz o de la disponibilidad de comida. Es clara la influencia de las fluctuaciones geofísicas sobre variables fisiológicas y conductuales y sobre trastornos de salud. Pero no fue sino hasta 1971, en que apareció la cronobiología médica como un apartado de la cronobiología recién nacida en el año 1960.¹

Inicialmente, los ritmos hormonales fueron objeto de interés por parte de la endocrinología durante los años 70 y 80. En seguida la cronopatología despertó el interés por los procesos rítmicos, fisiológicos y fisiopatológicos, asociados a la morbilidad y mortalidad en algunas enfermedades vasculares, respiratorias, metabólicas, etc. Surgió el interés de conocer los aspectos temporales de los accidentes cardiovasculares como base para aplicar un enfoque cronofarmacológico y cronoterapéutico. Debido a los viajes transoceánicos que pro-

ducen el fenómeno conocido como el «Jet-lag», se enfatizó la necesidad de conocer el orden temporal de fenómenos fisiológicos, que pueden generar deficiencias en habilidades psicomotrices, alteraciones en el ciclo sueño-vigilia, fatiga durante el día, trastornos gastrointestinales, cefaleas y alteraciones afectivas.^{1,4}

De la homeostasis a la cronostasis

En 1842 el médico y fisiólogo Claude Bernard (1813-1878), planteó la existencia de un medio interno que debía mantenerse constante. Pero no fue sino hasta 1928 que el biólogo Walter Cannon (1871-1945) acuñó el término homeostasis (Del griego *homo* que significa «similar», y *stasis*, «estabilidad») y que se definió como el conjunto de mecanismos que tienden a la estabilidad en la composición bioquímica de los líquidos, células y tejidos, para mantener la vida.⁵

La teoría homeostática resulta insuficiente para explicar algunos fenómenos, como la ingestión de alimento, necesidad previa a cambios en los niveles de metabolitos que mantienen el balance energético. Es decir, existen mecanismos que inician el complejo proceso de búsqueda y consumo de alimento antes de que suceda una hipoglucemia severa, de la misma manera que la saciedad en el consumo de alimento ocurre antes de la absorción completa de nutrientes. Esto indica que se cuenta con otro tipo de sistemas para la regulación fisiológica, capaces de detectar y prevenir un estímulo que producirá alteraciones en el sistema homeostático. Estos cambios de tipo predictivo, incluyen a los ritmos biológicos, y son considerados como una forma de adaptación conductual y fisiológica en respuesta al medio ambiente cambiante y cíclico. Se ha acuñado el término de Cronostasis que define aquellos mecanismos que transmiten un orden temporal a diversos procesos fisiológicos, que ajustan el tiempo biológico con el geofísico y coordinan la progresión temporal de distintos procesos fisiológicos y conductuales entre sí. La forma en que la cronostasis opera es a través del sistema circadiano.^{6,7}

El sistema circadiano y su importancia

El sistema circadiano se encuentra formado por las siguientes estructuras: 1) un reloj biológico que en los mamíferos se sitúa en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo (NSQ); 2) las vías de sincronización, encargadas de proporcionar al reloj la información de las señales externas. Principalmente el tracto retino-hipotalámico transmite la información luminosa de la retina hacia el NSQ para mantener una congruencia entre el reloj y el medio ambiente; y finalmente 3) las vías eferentes que transmiten las señales a los sistemas efectores que expresan los diferentes ritmos fisiológicos y conductuales.^{6,9}

Ejemplos de sistemas eferentes son: el eje hipotálamo-hipofisario-suprarrenal, los sistemas cardiovascular, inmunitario, hematopoyético, el ciclo celular, la glándula pineal, etc. Todos estos sistemas se sincronizan con el NSQ a través de señales neuronales o sustancias que interactúan con ellos, que pueden ser las hormonas y neurotransmisores.

Desincronización y enfermedad

El humano como uno más de los organismos que viven en un medio fluctuante, es vulnerable a sufrir alteraciones de su maquinaria cronobiológica, que se pueden clasificar en desincronización externa y desincronización interna.

Desincronización externa

Es la pérdida de coherencia entre las fluctuaciones del medio externo y las oscilaciones generadas por el reloj. Éstas pueden producirse por una alteración o daño de las vías de sincronización o por una alteración de la señal de sincronización. Esto se produce por un viaje a través de varios husos horarios. Dependiendo de la dirección del viaje, se genera un adelanto o un retraso de las horas, lo cual produce una pérdida de relación entre la hora geográfica del lugar y la función de los efectores. Este fenómeno es conocido como «jet-lag». Otro ejemplo de este tipo de desincronización, se debe a una incongruencia de las actividades del individuo con las señales de sincronización externas. Un ejemplo son los trabajadores nocturnos, que se ven forzados a trabajar de noche y a dormir de día. Las consecuencias pueden ser irritabilidad, trastornos gastrointestinales, enfermedades cardiovasculares, síndrome metabólico y aumento en la incidencia de cáncer. Este problema lo comparten varios de los trabajadores de la salud que son sometidos a horarios rotatorios de trabajo, entre ellos los estudiantes de postgrado en medicina (residentes); la fatiga y las alteraciones del ciclo sueño-vigilia, propician errores quirúrgicos y mala atención al paciente; también propician accidentes automovilísticos y de tipo ocupacional. Un ejemplo lamen-

table de este tipo fue la explosión de la planta de energía nuclear de Chernobyl, en 1986. Se cree que los operadores se encontraban fatigados y estaban trabajando en el punto temporal de menor eficiencia circadiana (1:23 a.m.). Con estos ejemplos se puede señalar que la ignorancia o desatención de la fisiología de los ritmos biológicos puede ser la causante de accidentes y de mal rendimiento laboral.^{10,11}

Desincronización interna

Es la pérdida de relación entre las oscilaciones del reloj y el resto del organismo. Se plantea que existe una correcta relación entre el reloj y el medio externo, pero una alteración en la salida de señales rítmicas hacia el resto del organismo o bien en la transmisión de éstas a los efectores. Ésta también puede ser desarrollada en trabajadores nocturnos o en pacientes con enfermedades cronicodegenerativas como la diabetes, la hipertensión y el cáncer. Para la diabetes se sugiere que el punto de regulación de la glucosa, así como el de la insulina siguen el ritmo circadiano, por lo que se plantea que en pacientes diabéticos se pierde la comunicación entre el reloj y los órganos periféricos, entre ellos el páncreas y el hígado.¹² Recientemente se ha estudiado la contribución del sistema nervioso autónomo en la comunicación neuronal del NSQ con la periferia, dando como resultado un estado de desincronización interna y pérdida de la coherencia entre los ritmos de diferentes variables, entre ellas la glucosa, la insulina y el cortisol.¹³

Como podemos ver se requiere el conocer los ritmos conductuales y fisiológicos, su mantenimiento y su relación con el medio externo. Por ejemplo, para la interpretación de análisis clínicos de muestras tomadas a horas distintas. El conocer las variaciones temporales permitirá interpretar la relación del nivel máximo o mínimo con su ritmo circadiano, que nada tienen que ver con alguna patología o tratamiento en específico.

Cronofarmacología y cronoterapia

Sabiendo pues que muchos parámetros fisiológicos se organizan en función del tiempo, es lógico establecer que no sólo es necesaria la cantidad correcta de un medicamento, sino también saber dosificarlo en el tiempo correcto. Refiriéndonos directamente a los medicamentos, un individuo puede variar su susceptibilidad y capacidad de absorción dependiendo de la hora en que se administren. En consecuencia ha surgido la *cronofarmacología*, para el estudio de las características funcionales de algunas drogas y poder optimizar su uso en algunas patologías.¹⁴ La *cronocinética* de un fármaco hace referencia a las diferencias de los efectos producidas en cuanto a absorción, distribución y eliminación según la hora de administración.

La cronoterapia propone una modificación a los esquemas de tratamiento preestablecidos; en oncología existen una gran cantidad de estudios que demuestran y ponen en evidencia la importancia de los ritmos biológicos y la cronocinética de los agentes anticancerosos.¹³ Es importante mencionar que la duración del ciclo celular varía según el tipo de tejido, siendo la duración promedio del ciclo completo de aproximadamente 24 horas. Los fármacos utilizados en la terapia oncológica tienen un efecto citotóxico sobre las células durante la fase proliferativa del ciclo celular. El número de células en fase de síntesis de DNA y mitosis varía a lo largo de las 24 horas, de tal manera que los mecanismos responsables de esta regulación circadiana actúan sobre los factores de crecimiento, receptores de membrana y/o sobre sistemas enzimáticos. Por ejemplo: la enzima timidilato-sintetasa, esencial para la síntesis de ADN, es la única enzima que sintetiza *de novo* al nucleótido deoxitimidilato monofosfato, requerido para la síntesis del ADN. La inhibición de esta enzima detiene la división celular y es el mecanismo de acción fundamental del 5-Fluorouracilo (5FU). Que debería darse en dosis bajas por la noche y altas en el día, sin olvidar que lo ideal sería darlo en el momento de menos mitosis (Nadir) del ritmo circadiano del tejido sano o en su caso durante la acrofase o pico máximo mitótico del cáncer en cuestión.¹⁷ Así se dañaría menos a las células sanas y sería más agresivo contra las células cancerosas. La relevancia clínica de estos experimentos se apoya en la documentación de los ritmos en tumores humanos. La síntesis de DNA en células tumorales presenta cambios diarios con un rango máximo entre las 12 y

16 horas. Por ejemplo, el índice mitótico de los carcinomas mamarios humanos muestra ciclos circadianos, con un pico máximo cercano a las 15 horas del día.

Perspectivas de la cronobiología médica

La cronobiología se ha establecido como una disciplina científica, que comienza a dar explicación a fenómenos fisiopatológicos desde un punto de vista del orden temporal que sólo se habían abordado de manera descriptiva y anecdótica, dando sustento como lo hemos dicho anteriormente a esquemas no sólo terapéuticos sino también diagnósticos (figura 1). Desde el punto de vista clínico existen algunas especialidades que ya identifican un componente cronobiológico, tanto en el diagnóstico como en el tratamiento de algunas patologías. Se habla ya de la «cronocardiología», «cronopsiquiatría» o «crono-oncológicas», disciplinas que se añaden a las ya establecidas «cronofisiología» y «cronofarmacología», y esperamos que muy pronto se pueda hablar de la «cronomedicina».

La cronobiología de esta forma proporciona nuevas herramientas de análisis y de tratamiento en trastornos del sueño, y contribuye de forma especial en el conocimiento de trastornos psiquiátricos, como la depresión estacional. En este momento y en varios lugares del mundo incluyendo México, se realizan estudios cronobiológicos de enfermedades cronicodegenerativas y se estudia a la desincronización interna como parte de la patogenia de algunas enfermedades como la obesidad y el síndrome metabólico.

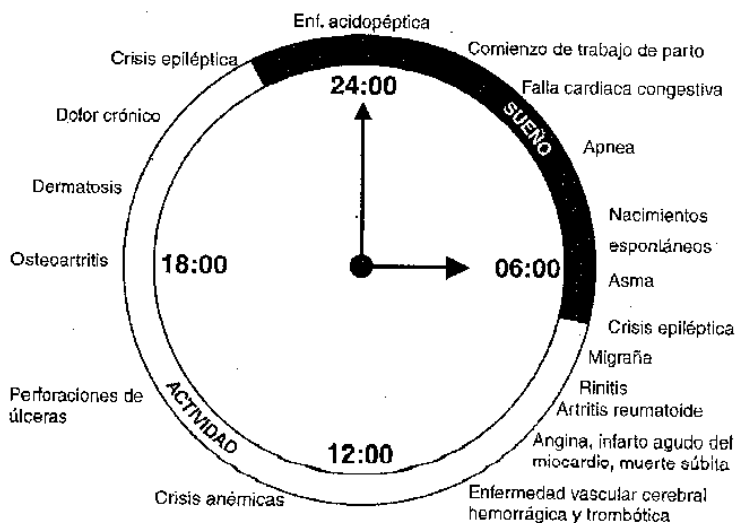


Figura 1. Diagrama de un reloj de 24 h que muestra el tiempo aproximado de actividad, seguido del tiempo de descanso en el humano, así como las horas en que inicia el trabajo de parto y se observan el mayor número de partos espontáneos. También muestra las horas dentro del ciclo circadiano en donde se manifiestan los síntomas o eventos agudos de algunas patologías. Modificado de Ohdos. *Drug Metab. Pharmacokinet* 2007.

Igualmente son de interés las modificaciones rítmicas circadianas en la biología del desarrollo, es decir los cambios que suceden desde la infancia hasta la edad adulta, y los trastornos de la ritmicidad que se presentan con la vejez. La industria farmacéutica empieza a diseñar fármacos basados en la cronobiología para liberarse en horas específicas del ciclo circadiano; así vemos las tabletas multicapa, que permiten su liberación modulada, por ejemplo: rápida en la porción proximal del intestino delgado, y lenta en su porción distal, combinando estas técnicas se pretende diseñar un sistema de liberación programada por pulsos. Las bombas de infusión son en la actualidad el método más eficaz para la liberación de uno o varios medicamentos. Un método alternativo para conseguir una liberación pulsátil de un fármaco, implica el uso de la microtecnología. Los microchips podrían constituir en el futuro la herramienta necesaria para la obtención de sistemas cronofarmacocinéticos eficaces.¹⁹

El manejo cronobiológico de pacientes aún presenta diversos problemas logísticos y metodológicos, sobre todo que no se cuenta con unidades como los dispositivos adecuados para el monitoreo continuo de las variables fisiológicas; por otro lado la atención cronobiológica de pacientes implica un seguimiento continuo y en muchos casos ambulatorio acompañado de altos costos. Desafortunadamente, los resultados que ofrece la cronobiología médica no son inmediatos ni espectaculares como acostumbramos observar con algunos tratamientos médico-quirúrgicos. Sin embargo, la cronobiología propone un mejor entendimiento y manipulación de la fisiología, utilizando sus variaciones circadianas como parte del tratamiento. Una forma de lograr un mejor avance de la cronobiología médica será incluir un cambio en la enseñanza y formación de los futuros médicos, incluyendo conceptos de ritmos biológicos y cronoterapia, que sin duda repercutirá en un mejor conocimiento de la fisiología y en mayor eficacia para la prevención de enfermedades y tratamiento de patologías.

Agradecimientos: a los proyectos CONACYT M43950 y DGAPA In203907

Referencias

1. Golombek D. La máquina del tiempo. En: Golombek D, compilador. *Cronobiología Humana: Ritmos y relojes biológicos en la salud y en la enfermedad*. Argentina: Universidad Nacional de Quilmes 2002: 21-31.
2. Ulmer W. On the role of the interactions of ions with external magnetic fields in physiologic processes and their importance in chronobiology. *In vivo* 2002; 16: 31-6.
3. Touitou Y, Haus E. *Biologic rhythms in clinical and laboratory medicine*. Berlin: Springer-Verlag, 1992.
4. Fahey C, Zee P. Circadian rhythm sleep disorders and phototherapy. *Psychiatr Clin North Am* 2006; 29: 989-1007.
5. Caponi G. Claude Bernard y los límites de la fisiología experimental. *Historia, Ciencias, Saúde -Manguinhos*. 2001; 8: 375-406.
6. Escobar C, Aguilar-Roblero R. *Motivación y conducta: sus bases biológicas*. México: Manual Moderno, 2002.
7. Mrosovsky N. *Reostasis: the physiology of change*. New York: Oxford University Press, 1990.
8. Aschoff J. A survey on biological rhythms. In: Aschoff Jürgen, editor. *Biological Rhythms*, Vol. 4 of *Handbook of Behavioral Neurobiology*. New York: Plenum Press 1981: 3-11.
9. Moore R, Eichler M. Loss of circadian corticosterone rhythm following supra-chiasmatic lesions in the rat. *Brain Research* 1972; 42: 201-206.
10. Akerstedt T, Kecklund G, Johansson S. Shift work and mortality. *Chronobiology international*. 2004; 21: 1055-1061.
11. Waterhouse J, DeCoursey P. The relevance of circadian rhythms for human welfare. In: Dunlap J, Loros J and DeCoursey P, Editores. *Chronobiology biological timekeeping*. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. publishers 2004: 325-356.
12. Buijs R, Kreier F. The metabolic syndrome: a brain disease? *J Neuroendocrinol* 2006; 18: 715-6.
13. Kalsbeek A, Palm HF, La Fleur SE, Scheer FA, Perreau-Lenz S, Ruiters M, Kreier F, Caulotto C, Buijs RM. SCN outputs and the hypothalamic balance of life. *J Biol Rhythms* 2006; 21: 458-69.
14. Ohdo S. Chronopharmacology focused on biological clock. *Drug Metab Pharmacokinet* 2007; 22: 3-14.
15. Ohdo S. Circadian rhythms in the CNS and peripheral clock disorders: chronopharmacological findings on antitumor drugs. *J Pharmacol Sci* 2007; 103: 155-8.
16. Levi P, Granda TG. Tumor-based rhythms of anticancer efficacy in experimental models. *Chronobiol Internat* 2002; 19: 21-41.
17. Kobayashi M, Wood PA, Hrushesky WJ. Circadian chemotherapy for gynecological and genitourinary cancers. *Chronobiol Internat* 2002; 19: 237-51.
18. Ross K. Circadian rhythms play role in cancer research. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98: 806-7.
19. Madrid J, Rol A. *Cronobiología básica y clínica*. España: editec@red. 2007.

Anatomía de un reloj (anatomía del sistema circadiano)

Manuel Ángeles-Castellanos, Katia Rodríguez, Roberto Salgado-Delgado, Carolina Escobar

*Departamento de Anatomía,
Facultad de Medicina,*

*Universidad Nacional Autónoma de México,
México D.F. 04510, México.*

Título corto:

Anatomía del sistema circadiano

Correspondencia:
Manuel Ángeles Castellanos
Departamento de Anatomía
Edificio B 4º Piso
Facultad de Medicina UNAM
México D.F. 04510,
Teléfono: (55) 55-23-24-22
E-mail: atatu3@hotmail.com

Resumen

Todos los organismos incluyendo el ser humano han desarrollado un sistema para la medición del tiempo. Esta capacidad permite adaptarse a fenómenos ambientales que se repiten en forma regular y constante. A este sistema se le conoce como sistema circadiano. Actualmente se sabe que el sistema circadiano se encuentra constituido por tres componentes esenciales: las vías de entrada de información, los mecanismos del reloj y las vías de salida para la transmisión de ritmicidad a otras partes del cuerpo. De las vías que proporcionan señales del ambiente para mantener sincronizado al sistema a los ciclos externos, la más poderosa es la alternancia luz/oscuridad. Esta vía de entrada de información incluye a la retina, así como al tracto retinohipotalámico. El reloj, identificado en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo, genera los ritmos aún en condiciones en que no recibe señales ambientales del tiempo. Se ubica en el hipotálamo anterior y establece contactos con otros núcleos hipotalámicos asociados a mantener la homeostasis interna. Por último, las vías eferentes o de salida se encargan de acoplar al reloj con otros sistemas efectores. Para esta función se consideran principalmente participaciones del sistema nervioso autónomo y del sistema endócrino. Debido a que en años recientes se ha demostrado que diversos tejidos viscerales pueden oscilar independientemente, se ha considerado a estos órganos periféricos como parte del sistema circadiano, lo que lo convierte en un sistema multiestructural y redundante.

Palabras clave: núcleo supraquiasmático, hipotálamo, ritmos biológicos

Abstract

A This property allows them to adapt to cyclic phenomena in our environment that are present in regular cycles. This time keeping system is known as the circadian system. It is well known that the circadian system is constituted by 3 elements: entraining pathways which enter information, the mechanisms of the clock and output pathways that transmit rhythmic signals to the rest of the body. Input pathways provide time signals from the environment in order to maintain the circadian system coupled to external cycles. The main entraining signal is the light-dark cycle. The anatomical substrate for this pathway is the retina and the retinohypothalamic tract. The clock mechanisms have been identified in the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus, it generates circadian rhythms, even when external signals are absent. This structure is located in the anterior hypothalamus and has projections to other hypothalamic nucleus involve with homeostatic functions. The output pathways keep the clock coupled to other organs. This function is accomplished via the autonomic and the endocrine systems. Because in recent years it has been shown that visceral organs can oscillate independently, peripheral tissues are now acknowledged as part of the circadian system, which is now a multistructural and redundant system.

Key words: Suprachiasmatic nucleus, hypothalamus, biological rhythm.

¿Por qué medir el tiempo?

Los organismos cubrimos diariamente una serie de funciones para sobrevivir. Ninguna de dichas funciones depende de un solo órgano, mas bien cada respuesta o función requiere de la interacción de varios órganos que forman sistemas. Estos sistemas además de estar constituidos por estructuras especializadas, cuentan con vías para la entrada y vías para la salida de información, de manera que los organismos son el conjunto de complejas redes funcionales, las cuales tratamos de comprender primeramente por medio de la anatomía, y que conocemos por su localización, forma y relaciones.

Entre las múltiples funciones que realizamos diariamente se incluye la necesidad de mantener un orden temporal. Esto es, realizar todas nuestras funciones en congruencia con los cambios diarios asociados al tiempo. Durante un ciclo de 24 horas debemos enfrentar cambios asociados al día y la noche y por lo tanto a la luz y la oscuridad; también enfrentamos oscilaciones en la temperatura ambiental, en la humedad, los sonidos provenientes de otros organismos, etc. Estos ciclos diarios se imponen a todo individuo un reto adaptativo que requiere se exhiban óptimas respuestas en concordancia con los tiempos ambientales. Es más, para una buena adaptación se requiere poder anticiparse a estos ciclos diarios, que son predecibles. En consecuencia cada individuo muestra ciclos en su conducta y fisiología, que resultan obvios en la alternancia de intervalos de actividad y sueño. Internamente se presentan oscilaciones conocidas como ritmos circadianos, que se caracterizan por manifestarse aproximadamente cada 24 horas. Por ejemplo, es posible observar picos de liberación hormonal y de funciones metabólicas a ciertas horas del día, seguidos de disminución en los niveles a otras horas. Por medio de estas fluctuaciones se logran expresar respuestas óptimas en momentos en que las circunstancias ambientales más lo requieren y por medio de estos ritmos se logra una estrategia adaptativa esencial para un medio ambiente cambiante.

Para lograr estas adaptaciones temporales todo organismo cuenta con un sistema circadiano, el cual está especializado en la medición del tiempo y en transmitir estas señales a los diversos sistemas funcionales.

Se reconoce actualmente que el sistema circadiano se encuentra constituido por 3 componentes esenciales.

- Una vía de sincronización.
- El reloj propiamente.
- Vías eferentes que acoplan el reloj a sistemas efectores que expresan las funciones circadianas o ritmos.

La anatomía del reloj

(Descubrimiento del NSQ, en dónde está y cómo funciona)

Con la hipótesis de que podía existir una región en el cerebro que funcionara como reloj biológico involucrado con la manifestación de los ritmos circadianos, Carl Richter en 1967 realizó estudios con ratas, lesionando la pared anterior del hipotálamo, y demostró que se perdía la expresión rítmica de la conducta locomotora, lo cual lo llevó a la conclusión de que existían regiones hipotálamicas probablemente responsables de la rítmica circadiana²⁴. Pero no fue sino hasta la década de los 70's cuando se realizaron estudios con trazadores de vías neuronales, que demostraron la existencia de una

comunicación directa de la vía visual al hipotálamo y que fue denominada tracto retino hipotálamico (TRH) con terminaciones específicamente en el núcleo supraquiasmático (NSQ)^{8, 15}. Las lesiones de este NSQ provocaron pérdida del ritmo de concentración plasmática de corticosterona y pérdida de los ritmos de conducta^{16, 28}, corroborando que este NSQ funciona como marcapasos interno.

El NSQ es un núcleo par localizado en la región antero-ventral del hipotálamo inmediatamente arriba del quiasma óptico, lateral a la base del tercer ventrículo, se sitúa por debajo de la zona subpreaventricular, por detrás del área preóptica medial, por delante de la retroquiasmática, y lateralmente se relaciona con la zona lateral anterior hipotálamica (Fig. 1).

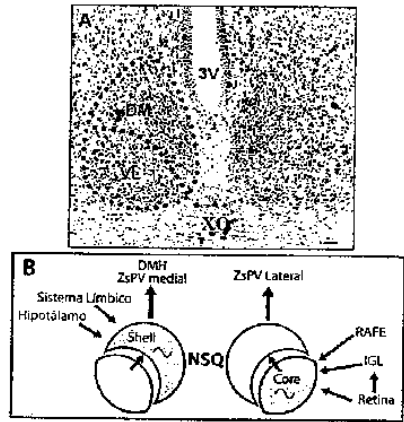


Fig. 1. Morfología del núcleo supraquiasmático de rata. A) Microfotografía (10X) de un corte coronal del hipotálamo anterior, zona en donde se muestra el NSQ en función de Núcl. La barra = 100µm. B) se muestran en un esquema las divisiones del NSQ así como las vías aferentes y eferentes más importantes. DM, dorsomedial; VL, ventrolateral; 3V, tercer ventrículo; XO, quiasma óptico; DMH, núcleo dorsomedial hipotálamico; ZSPV, zona subpreaventricular; IGL, hoja lateral intercruzada lateral.

Morfología y organización del NSQ

Los estudios morfológicos del NSQ se han realizado especialmente en roedores. En la rata el NSQ contiene alrededor de 8000 neuronas de cada lado, con un diámetro aproximado de 8-12mm. Muestra una relativa expansión dendrítica dentro del mismo núcleo; las neuronas de la porción ventrolateral o zona retino receptiva, son mucho más extensas que en la porción dorsomedial³¹.

El NSQ tiene forma ovoide y tradicionalmente se ha dividido en dos zonas; y desde el punto de vista anatómico se puede considerar una región ventrolateral (Core) y una región dorsomedial (Shell). La región ventrolateral descansa sobre el quiasma óptico y es retina-receptiva, es decir, recibe la información luminosa proveniente de las células ganglionares tipo W de la retina a través del TRH. En cambio la zona dorsal se ha asociado más a funciones integrativas, entre ellas la generación y transmisión del ritmo hacia el resto del cerebro.

Por otra parte, el NSQ también se ha subdividido en regiones específicas

de acuerdo a sus características neuroquímicas. Podemos decir que todas o casi todas las neuronas del NSQ contienen ácido γ -aminobutírico (GABA) ^{1, 19}. Sin embargo, existen regiones caracterizadas por la producción de un neuropéptido específico, un ejemplo es la vasopresina (VP), que fue el primer péptido anatómicamente descrito en neuronas de la región dorso-medial del NSQ ²⁰; también se han descrito neuronas productoras del péptido vasoactivo intestinal (VIP), segundo péptido identificado en el NSQ, específicamente en la región ventrolateral ²¹ (Fig. 1). Actualmente se sabe de otros grupos celulares que expresan otros péptidos, entre ellos encefalinas, sustancia P ^{20, 22}. Por esta razón existe controversia sobre las diversas formas en las que el NSQ debe ser dividido, sobretudo por la utilización de nuevas técnicas morfo-funcionales y moleculares, tal es así que en el hámster se han identificado hasta cinco diferentes áreas de acuerdo a la expresión de neuropéptidos y otras aún por la caracterización de expresión génica (genes reloj) ⁴. Sin embargo, la primera descripción que hemos dado es aplicable para todos los mamíferos incluyendo al ser humano.

Organización funcional del NSQ

Las neuronas del NSQ mantienen una extensa conexión con otras neuronas del mismo núcleo, de tal manera que este núcleo es una red de conexiones que comprende unidades neuronales interconectadas. Esta red muestra un ritmo circadiano en el ciclo de disparo neuronal y del consumo de glucosa con su pico máximo, llamado también acrofase, durante la fase de luz o día subjetivo ²³. La pregunta es entonces ¿el ritmo de actividad neuronal en el NSQ se genera como una consecuencia del acoplamiento de neuronas con capacidad de oscilaciones individuales? o es una propiedad emergente de la interacción neuronal? Se ha podido demostrar que las neuronas del NSQ disgregadas muestran un ritmo de actividad eléctrica circadiano independiente y sólo cuando logran tocarse son capaces de acoplar sus ritmos ²². De igual forma se sabe que no todas las neuronas del NSQ son capaces de generar oscilaciones en forma auto-sostenida, es decir, no todas son osciladores, pero que participan en el sistema de acoplamiento con las que sí lo son ¹¹. (Fig. 2).

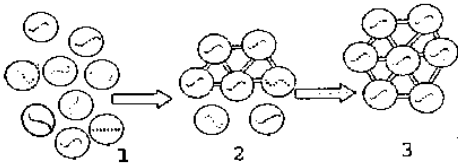


Fig. 2. Modelo que ejemplifica las neuronas del núcleo supraquiasmático. 1) cada neurona por separado muestra un ritmo con periodo diferente pero cercano a 24h; 2) cuando entran en contacto se acoplan y forman un solo ritmo, y 3) finalmente el grupo completo muestra un ritmo con periodo igual.

La adaptación del reloj al medio externo

(Las vías de sincronización)

La siguiente pregunta fue ¿para qué se requiere que el NSQ esté comunicado con la retina? Para contestar esta pregunta se diseñaron experimentos con enucleación bilateral, así como el corte de los nervios ópticos, y se pudo observar que es los animales pierden la relación de

fase con el medio ambiente pero no así su ritmo. Concluyendo entonces que el NSQ es responsable de la generación de los ritmos biológicos y que a través de la información que entra por la retina se sincroniza el ciclo luz / oscuridad.

Normalmente los ritmos circadianos se encuentran sincronizados al ciclo luz / oscuridad, sin embargo en ausencia de esta señal, se manifiestan los ritmos en forma endógena, en libre curso "free run", esto quiere decir que, sin estar sincronizado el reloj a ninguna señal ambiental, es capaz de generar ritmos con un periodo aproximado de 24 horas.

Sincronización se define como el cambio o ajuste del periodo y fase del ritmo del reloj endógeno al ciclo externo de luz / oscuridad. En este contexto la vía de sincronización es fótica o visual, sin embargo, la función del reloj puede recibir influencia de una serie de variables no fóticas, que pueden también afectar el periodo y la fase del ritmo endógeno. El sistema o las vías por las cuales llega esta información externa al NSQ son consideradas como vías de sincronización.

El tracto retino hipotalámico (TRH)

El TRH está formado por el conjunto de axones que proyectan desde la retina (neuronas ganglionares tipo W) hacia el hipotálamo anterior; este tracto es independiente de la vía visual ya que existen antecedentes en los cuales se seccionó la vía visual por detrás del quiasma óptico y se encontró que los animales perdían la capacidad y reflejos visuales, pero no de sincronización ¹³, indicando con esto que la vía de sincronización es diferente a la vía visual.

La vía de sincronización fótica es el TRH; en 1972 Moore y Lemm, demostraron que el TRH proyecta al NSQ, principalmente a la división ventrolateral, por lo que también se le ha llamado zona retino-recipiente. También se pudo observar que el TRH adicionalmente proyecta al área lateral y anterior del hipotálamo, a la zona retroquiasmática es decir por detrás del quiasma óptico y a la región retroquiasmática inmediatamente caudal al NSQ ¹².

Adicionalmente, los fotoreceptores involucrados con la sincronización parecen ser diferentes a los fotoreceptores clásicos ⁷, indicando con esto que el componente retiniano del sistema circadiano es distinto de la vía visual y especializado para la función de sincronización fótica.

Hojuela intergeniculada (IGL)

El TRH también proyecta en forma importante a la hojuela intergeniculada (IGL) del tálamo ²⁴. La IGL es una subdivisión anatómica y funcional distinta del complejo geniculado lateral; la IGL recibe inervación en forma bilateral de la retina ¹⁶ y está constituida por una población de células productoras de neuropéptido Y (NYP) y GABA ¹⁷. Este grupo de células no proyecta a otras áreas centrales, es decir no se encuentra involucrado con los mecanismos visuales, sino que proyectan de regreso en forma directa al NSQ, a la porción ventrolateral, superpuesto a las entradas de la retina, y a poblaciones neuronales que contienen encefalinas, que proyectan a la IGL contra lateral ⁶. Estas proyecciones hacia el NSQ forman el tracto geniculohipotalámico (TGH).

La IGL recibe proyecciones también del tallo cerebral principalmente de núcleos neuronales productoras de adrenalina, serotonina y acetilcolina y del área retroquiasmática ¹⁸; se cree que las entradas que recibe la IGL del

tallo cerebral y del hipotálamo constituyen para el NSQ la vía de entradas no fótica. (Fig. 3).

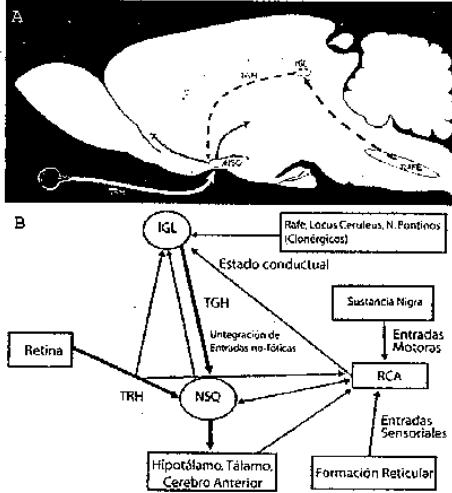


Fig. 3. Morfología y eferencia del núcleo supraquiasmático. A) Esquema de un corte longitudinal del cerebro de rata donde se muestra, el núcleo supraquiasmático y las principales vías de entrada de sincronización fótica a través del tracto retinohipotalámico (TRH) y no fótica por la vía del tracto geniculohipotalámico (TGH). B) Diagrama del tipo de señales aferentes al NSQ y su relación funcional con otras áreas del sistema nervioso central. IGL: Mielina intergeniculohipotalámica; RCA: núcleo retinoquiasmático.

Las manecillas del reloj

(Las vías de salida)

Como lo mencionamos anteriormente, una de las partes del sistema circadiano son las vías de salida o eferentes, ya que es a través de éstas como se manifiesta el reloj, es decir se expresan los ritmos. Para ello, el NSQ necesita de otras estructuras para poder transmitir su ritmicidad a todo el organismo. Por lo mismo, las células del NSQ proyectan hacia diversas zonas del hipotálamo de donde se inicia la distribución de su señal. Por ejemplo, el núcleo paraventricular hipotalámico (PVN) controla la ritmicidad circadiana de la actividad del eje adrenocorticotrópico, así como el control del ritmo de la hormona melatonina en la glándula pineal a través de proyecciones hacia el sistema nervioso autónomo⁵. Otro ejemplo son las salidas a través del núcleo dorsomedial hipotalámico (DMH), el cual mantiene el control circadiano del ciclo sueño vigilia y de alimentación, por su acción en el sistema orexigénico en el hipotálamo lateral^{2,8}. Sin embargo unas de las eferencias de mayor densidad son la zona subparaventricular, así mismo el área preóptica y el núcleo ventromedial (VMH) en el hipotálamo. Otras eferencias del NSQ hacia afuera del hipotálamo son hacia núcleos como el paraventricular talámico (PVT)²¹, así como hacia el núcleo del lecho de la estría terminalis (BNST)² sitios neuronales que son determinantes en el control circadiano principalmente del ciclo sueño-vigilia¹⁴. Por otra parte se ha mencionado la importancia del sistema nervioso autónomo como las vías de salida del reloj hacia los tejidos periféricos, a través del cual este

sistema mantiene oscilando acopladas a todos los órganos periféricos⁵.

Relojes en todos los organismos

(Osciladores periféricos, todos los órganos oscilan)

Todas las evidencias hasta el momento indican que el NSQ es el reloj principal, responsable de generar el ritmo circadiano. Sin embargo, recientemente se han encontrado mecanismos de oscilación similares a las del NSQ en otros órganos y otras zonas cerebrales, lo que sugiere la existencia de otros relojes u osciladores circadianos en el mamífero. En particular se ha descrito la expresión de oscilaciones de genes reloj, en el hígado, en el corazón y en estructuras del mismo sistema nervioso que expresan oscilaciones circadianas de estos genes en fase con el NSQ^{9,29,33,34}. Su función podría ser la de modular funciones a nivel local, por ejemplo, los ritmos de sensibilidad visual en células de la retina (conos y bastones) que parecen estar generados por un reloj intrínseco retiniano²³. Estas oscilaciones pueden propiciar la participación del resto del organismo en la manifestación de los ritmos circadianos, de tal manera que se han identificado órganos periféricos que presentan oscilaciones asociadas a muchas variables fisiológicas tales como el ritmo de consumo de glucosa (Fig. 4).

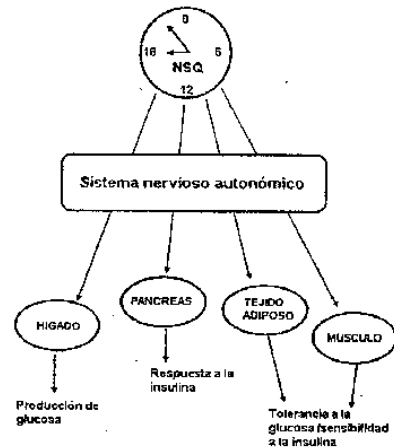


Fig. 4. Modelo esquemático del sistema de transmisión de ritmicidad al resto del organismo, en donde se observa al NSQ como el reloj principal que a través del sistema nervioso autónomo transmite su ritmicidad a los tejidos periféricos (modificado de La Fleur et al 2003).

Conclusión: El sistema circadiano es un sistema distribuido

Por lo antes planteado, podemos mencionar que el sistema circadiano es un sistema multi-oscilatorio, para el cual el NSQ es el marcapasos principal (reloj circadiano), transmitiendo el tiempo y manteniendo la congruencia temporal con el medio externo de una gran cantidad de osciladores periféricos tanto en el sistema nervioso, como en el resto del organismo. Este sistema hace referencia imaginaria a una orquesta donde el director (NSQ) lleva y marca el ritmo de una melodía, y los músicos (osciladores

periféricos) se encuentran acoplados al compás marcado por el director. De esta manera, es posible explicar de forma simple como la desincronización interna, la falta del director por enfermedad o muerte (lesión del NSQ), produce un estado arrítmico en el cual cada uno de los osciladores periféricos oscila con su propio ritmo.

Agradecimientos: a los proyectos CONACYT M43950 y DGAPA-PAPIIT IN 203907

Referencias bibliográficas

1. Abrahamson EE, Moore RY. Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Res* 2001; 916: 172-191.
2. Abrahamson EE, Leak RK, Moore RY. The suprachiasmatic nucleus projects to posterior hypothalamic arousal systems. *Neuroreport* 2001; 12: 435-440.
3. Amic S, Waddington E, Robinson B, Stewart J. A circadian rhythm in the expression of PERIOD2 protein reveals a novel SCN-controlled oscillator in the oval nucleus of the bed nucleus of the stria terminalis. *Neuroscience* 2004; 24: 781-790.
4. Antle MC, Silver R. Orchestrating time: arrangements of the brain circadian clock. *Trends in Neurosciences* 2005; 28: 145-151.
5. Buñis RM, Kaltschek A. Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nat Rev Neurosci* 2001; 7: 521-526.
6. Card JP, Moore RY. Organization of lateral geniculate-hypothalamic connections in the rat. *J Comp Neurol* 1989; 284: 135-147.
7. Card JP, Whealy ME, Robbins AK, Moore RY, Enquist LW. Two alpha-herpesvirus strains are transported differentially in the rodent visual system. *Neuron* 1991; 6: 957-962.
8. Chou TC, Scammell TE, Goolley JJ, Gaus SE, Saper CB, Lu J. Critical role of dorsomedial hypothalamic nucleus in a wide range of behavioral circadian rhythms. *J Neurosci* 2003; 23: 10691-10702.
9. Hara R, Wan K, Wakamatsu H, Aida R, Moriya T, Akiyama M, Shibata S. Restricted feeding entrains liver clock without participation of the suprachiasmatic nucleus. *Genes Cells* 2001; 6: 269-278.
10. Hendrickson A, Moe L, Noble B. Staining for autoradiography of the central nervous system. *Stain Technol* 1972; 47: 283-290.
11. Jobst EE, Allen CM. Calbindin neurons in the hamster suprachiasmatic nucleus do not exhibit a circadian variation in spontaneous firing rate. *Eur J Neurosci* 2002; 16: 2469-2474.
12. Johnson RR, Morin LP, Moore RY. Retinohypothalamic projections in the hamster and rat demonstrated using cholera toxin. *Brain Res* 1988; 462: 301-312.
13. Klein DC, Moore RY. Pineal N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase: control by the retinohypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 1979; 174: 245-262.
14. Leak RK, Moore RY. Topographic organization of suprachiasmatic nucleus projection neurons. *J Comp Neurol* 2001; 433: 312-334.
15. Moore RY, Lenn NJ. A retinohypothalamic projection in the rat. *J Comp Neurol* 1972; 146: 1-14.
16. Moore RY, Eichler VB. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res* 1972; 42: 201-206.
17. Moore RY, Speh JC. GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. *Neurosci Lett* 1993; 150: 112-116.
18. Moore RY, Card JP. Intergeniculate leaflet: an anatomically and functionally distinct subdivision of the lateral geniculate complex. *J Comp Neurol* 1994; 344: 403-430.
19. Moore RY, Speh JC, Card JP. The retinohypothalamic tract originates from a distinct subset of retinal ganglion cells. *J Comp Neurol* 1995; 352: 351-366.
20. Morin LP. Serotonergic reinnervation of the hamster suprachiasmatic nucleus and intergeniculate leaflet without functional circadian rhythm recovery. *Brain Res* 1992; 599: 98-104.
21. Novak CM, Harris JA, Smale L, Nunez AA. Suprachiasmatic nucleus projections to the paraventricular thalamic nucleus in nocturnal rats (*Rattus norvegicus*) and diurnal Nile grass rats (*Arviculantis niloticus*). *Brain Res* 2000; 874: 147-157.
22. Pickard GE. Bifurcating axons of retinal ganglion cells terminate in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet of the thalamus. *Neurosci Lett* 1985; 55: 211-217.
23. Reme CE, Braschler UF, Roberts J, Dillon J. Light damage in the rat retina: effect of a radioprotective agent (WR-77913) on acute rod outer segment disk disruptions. *Photochem Photobiol* 1991; 54: 137-142.
24. Richter CE. Sleep and activity; their relation to the 24-hour clock. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* 1967; 45: 8-29.
25. Samson WK, Said SI, McCann SM. Radioimmunologic localization of vasoactive intestinal polypeptide in hypothalamic and extrahypothalamic sites in the rat brain. *Neurosci Lett* 1979; 12: 265-269.
26. Smale L, Blanchard J, Moore RY, Morin LP. Immunocytochemical characterization of the suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet in the diurnal ground squirrel, *Spermophilus lateralis*. *Brain Res* 1991; 563: 77-86.
27. Shibata S, Moore RY. Electrical and metabolic activity of suprachiasmatic nucleus neurons in hamster hypothalamic slices. *Brain Res* 1988; 438: 374-378.
28. Stephan FK, Zucker I. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci* 1972; 69: 1583-1586.
29. Stokkan KA, Yamazaki S, Tei H, Sakaki Y, Menaker M. Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science* 2001; 291: 490-493.
30. Vandesande F, Dierckx K. Identification of the vasopressin producing and of the oxytocin producing neurons in the hypothalamic magnocellular neurosecretory system of the rat. *Cell Tissue Res* 1975; 164: 153-162.
31. Van den Pol AN. The hypothalamic suprachiasmatic nucleus of rat: intrinsic anatomy. *J Comp Neurol* 1980; 191: 661-702.
32. Welsh DK, Logothetis DE, Meister M, Reppert SM. Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* 1995; 14: 697-706.
33. Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, Ueda M, Block GD, Sakaki Y, Menaker M, Tei H. Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* 2000; 288: 682-685.
34. Yoo SH, Yamazaki S, Lowrey PL, Shimomura K, Ko CH, Buhre ED, Saper SM, Hong HK, Oh WJ, Yoo OJ, Menaker M, Takahashi JS. PERIOD2: LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci* 2004; 101: 5339-5346.

- Schiller, G.D., Pucilowski, O., Wienicke, C. y Overtstreet, D.H. (1992). Imobility-reducing effects of antidepressants in a genetic animal model of depression. *Brain Research Bulletin*, 28, 821-823.
- Valenstein, E. y Beer, B. (1962). Reinforcing brain stimulation in competition with water reward and shock avoidance. *Science*, 28, 1052-1054.
- Velázquez-Moctezuma, J. y Díaz-Ruiz, O. (1992). Neonatal treatment with clorimipramine increased immobility in forced swim test: An attribute of animal models of depression. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 42, 737-739.
- Velázquez-Moctezuma, J., Aguilar-García, A. y Díaz-Ruiz, O. (1993). Behavioral effects of neonatal treatment with clomipramine, scopolamine, and idazoxan in male rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 46, 215-217.
- Velley, L., Verney, C., Kempf, E. y Berger, B. (1988). Opposite effects of ibotenic acid and 6-hydroxydopamine lesions of the lateral hypothalamus on intracranial self-stimulation and stimulation-induced locomotion. *Neuroscience*, 25, 595-603.
- Vogel, G., Neill, D., Hagler, M. y Kors, D. (1990a). A new animal model of endogenous depression: a summary of present findings. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 14 (1), 85-91.
- Vogel, G., Neill, D., Hagler, M., Kors, D. y Hardley, P. (1990b). Decreased intracranial self-stimulation in a new animal model of endogenous depression. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 14, 65-68.
- Vogel, G., Neill, D., Kors, D. y Hagler, M. (1990c). REM sleep abnormalities in a new animal model of endogenous depression. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 14 (1), 77 - 83.
- Vogel, G., Hagler, M., Hennessey, A. y Richard, C. (1996). Dose-dependent decrements in adult male rat sexual behavior after neonatal clorimipramine treatment. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 54 (3), 605-609.
- Willner, P. (1995). Animal models of depression: validity and applications. *Advances in Biochemistry and Psycho pharmacology*, 49, 19-41.
- Willner, P., Muscat, R. y Papp, M. (1992). Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 16, 525-534.
- Willner, P. (2005). Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology*, 52, 90-110.

Capítulo 3

Hedonismo y reforzadores primarios

Carolina Escobar, Manuel Ángeles-Castellanos,
María del Carmen Miñana, Roberto Salgado,
Kattia Rodríguez Gómez

■ ADAPTACIONES EVOLUTIVAS Y ADECUACIONES AL MEDIO AMBIENTE

Los organismos, como actualmente los conocemos, son el resultado de un proceso de miles de años de evolución, durante el cual el medio externo ha retado su capacidad de supervivencia. Los ancestros de las especies actuales tuvieron que desarrollar modificaciones en su genotipo y en su fenotipo que permitieron adaptaciones a los ciclos geofísicos en la temperatura, la presión atmosférica, la humedad y demás retos impuestos por el entorno. Muchos de estos eventos se generan en nuestro planeta en forma constante o cíclica y por lo tanto son predecibles a lo largo de días, meses, años y épocas, lo cual permitió que con base en repeticiones por generaciones se desarrollaran, probaran y permanecieran aquellos mecanismos que favorecieron la supervivencia en el medio, así como los mecanismos que permitieran anticipar los ciclos del ambiente.

Los cambios súbitos e impredecibles del entorno ambiental también son retos para la supervivencia. Estos cambios han requerido de mecanismos con capacidades de adecuación rápidas y muchas veces transitorias. Para ello los organismos han requerido de sistemas de reconocimiento para dichos cambios, así como sistemas de respuesta y de retroalimentación para evaluar, si la respuesta o cambios emitidos son satisfactorios y exitosos o son ineficientes y perjudiciales. Al realizarse estas adecuaciones, los procesos de retroalimentación permiten verificar y aprender nuevas estrategias e incorporarlas a los patrones fisiológicos, anatómicos y de conducta, o bien, eliminarlas cuando no resultan exitosas. La combinación del potencial de adaptación, asociado a la capacidad de adecuación a eventos novedosos aunada a las adaptaciones evolutivas da como resultado el éxito en la supervivencia (figura 3-1).

En este capítulo analizaremos los procesos de adecuación y de respuesta primaria y los mecanismos de retroalimentación por reforzadores primarios que los modulan; también pretendemos presentar el modelo de un circuito neuronal que pudiera subyacer a estas respuestas y a los efectos de los reforzadores primarios sobre la conducta.



Figura 3-1.

En esta escena se observa un hombre de la prehistoria que tuvo que desarrollar estrategias para sobrevivir en un ambiente hostil pero predecible. Para sobrellevar largos periodos de ayuno se desarrollaron estrategias metabólicas que permitieron aprovechar al máximo pocas cantidades de comida y a lograr, a partir de esos escasos y esporádicos bocados, crecer y acumular energía para momentos de escasez. Estas adecuaciones metabólicas a la larga y después de muchas generaciones se incluyeron como cambios en el genoma y le confirieron a la especie humana la capacidad de acumular grandes cantidades de energía para sobrevivir las hambrunas. Las teorías modernas le llaman "el gen ahorrador". Actualmente se le atribuye a este gen ahorrador la facilidad con la que el ser humano moderno logra subir de peso.

■ EL CONCEPTO DE HOMEOSTASIS Y EL SURGIMIENTO DE MOTIVACIONES PRIMARIAS

Las primeras células en la Tierra surgieron de un ambiente acuoso y salino, similar al mar. Estas características que promovieron la aparición de la vida resultaron esenciales para la supervivencia celular, razón por la cual el medio acuoso es primordial aún en organismos pluricelulares, incluyendo el ser humano. Claude Bernard, en su libro *Introducción al estudio de la medicina experimental*, fue el primero en señalar la existencia de un fluido interno, que rodeaba a las células y al cual llamó **medio interno**. Señaló la relevancia de este medio como la base de la vida normal y patológica, e indicó la necesidad de estudiar la fisiología del medio interno y su interacción con el **medio externo**, entendido este último como el medio exterior de una célula o de un organismo. Para garantizar la vida, el medio interno, requiere cumplir con propiedades particulares o específicas que deben mantenerse relativamente constantes, tales como una temperatura cercana a los 36-37°C, un grado de alcalinidad cercano a pH de 7.2, así como una concentración definida de oxígeno, de glucosa, de proteínas, iones, etc. Claude Bernard también señaló la necesidad de que este medio interno mantuviera relaciones y un equilibrio con los cambios que se presentan regularmente en el medio externo. Por otra parte, a principios del siglo XX, Walter Cannon introdujo el término **homeostasis** para referirse a los procesos que permiten a una célula o a un organismo, mantener constantes las características de su medio interno. Los mecanismos que regulan a estos procesos han sido motivo del estudio de los fisiólogos, quienes hasta la fecha tratan de comprender los enigmas de los cuales depende la vida. Muchos de estos procesos han mostrado involucrar sistemas complejos y redundantes, que involucran diversos órganos, hormonas y sistemas neuronales, lo cual hace aún más difícil su comprensión. Un modelo general de cómo debiera estar constituido un sistema homeostático se puede ver en la figura 3-2. En dicha figura se muestra que para mantener constante y regulada una variable (p. ej., la glucosa), se requiere de un controlador, el cual cuenta con la información del valor de regulación óptimo para una variable fisiológica, también llamado **punto de ajuste** (del inglés *set point*), el cual debe mantenerse dentro de un rango muy estrecho. El controlador cuenta con **sensores** especializados que le informan del valor de la variable dentro del organismo, compara constantemente los niveles de la variable con el valor de regulación óptimo y cuando se detecta una desviación o error, manda señales a sistemas efectores para corregir la desviación detectada. Los efectores pueden ser de diversos tipos: principalmente de tipo neuronal y constituyen sistemas rápidos de respuesta; de tipo endocrino, hormonal, que constituyen sistemas más lentos pero duraderos; y de tipo conductual que permiten intervenir y modificar el entorno, cuando las dos estrategias previas no pudieron corregir el desvío.

Cada variable que requiere mantenerse constante cuenta con un sistema de control, como el descrito anteriormente, por lo que en los organismos multicelulares existen un sinnúmero de estos controladores para la mayoría de las variables

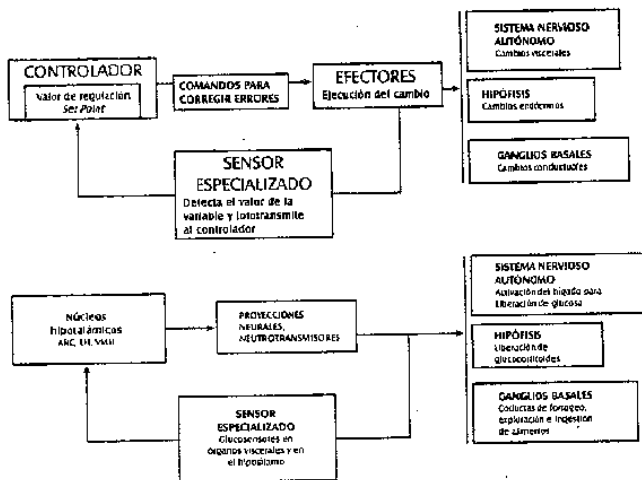


Figura 3-2.

Modelo de retroalimentación negativa para mantener la homeostasis en organismos complejos. En la parte de arriba se muestran los elementos del modelo teórico. En la parte de abajo se muestra un ejemplo de cómo podría entenderse este modelo para el mantenimiento fisiológico de la homeostasis de la glucosa.

fisiológicas reguladas. En los mamíferos se ha identificado al hipotálamo, localizado en la base del cerebro, como un conjunto de células que funcionan como controladores. En el hipotálamo se localizan células especializadas para monitorear niveles de hormonas, la temperatura corporal, la glucosa, etc. Además al hipotálamo llegan señales provenientes de la periferia indicando el estado funcional de las vísceras, así como niveles o concentraciones de oxígeno, de energía, acidez, salinidad, etc. Por ello podríamos considerar al hipotálamo como un gran controlador e integrador de la homeostasis interna. Así mismo se sabe que el hipotálamo manda proyecciones a diversos sistemas del cuerpo para modificar funciones viscerales, endocrinas y de conducta. Las vías más importantes por las que transmite su señal al organismo son el sistema nervioso autónomo, la glándula hipófisis y los ganglios basales (figura 3-3). Gracias al sistema nervioso autónomo logra una

respuesta rápida mediada por cadenas de fibras nerviosas hacia las vísceras; por medio de la hipófisis logra respuestas hormonales, que son más lentas pero prolongadas. Cuando estas dos estrategias no logran restituir la homeostasis, entonces requiere elaborar estrategias de conducta para que el individuo corrija la situación en su entorno. Para esta última opción, se requiere generar una fuerza interna que lleve al individuo a moverse y llevar a cabo acciones (ver ejemplo inferior en la figura 3-2). A esta fuerza se le llama motivación y por tratarse de una acción que corregirá un desequilibrio homeostático, se le llama motivación primaria. Para elaborar esta estrategia conductual participan los ganglios basales y otras estructuras cerebrales que se discutirán más adelante.

■ LOS REFORZADORES PRIMARIOS

La pérdida de la homeostasis resulta amenazante para la vida, razón por la cual cuando esto sucede en el organismo se desencadena un estado de malestar general, dolor, irritabilidad o ansiedad. La sensación desagradable resultante motiva entonces al individuo a buscar un remedio. Como se mencionó previamente, el individuo emite una respuesta que ocasiona un cambio en su condición y resulta primordial que sepa evaluar las consecuencias de su acción. Cuando la respuesta fue adecuada, se provoca la presencia de una situación favorable que lleva a un estado de bienestar. Por su resultado positivo, esta respuesta se repetirá en el futuro cuando vuelva a presentarse el desequilibrio. Por el contrario, cuando se realiza una acción poco exitosa, el malestar continúa y en ocasiones se incrementa, lo cual lleva a reconocer acciones poco eficaces y a evitarlas en el futuro. En este caso el individuo prueba emitir conductas variadas hasta lograr que se presenten los estímulos o eventos que propicien mejorar su estado general. La experiencia dada por la evaluación de las consecuencias le confiere al individuo una experiencia de aprendizaje que moldea la conducta y aumenta su acervo de respuestas para resolver necesidades homeostáticas. Por lo anterior, otro elemento esencial para un modelo de homeostasis es el sistema que evalúa los resultados de la conducta y les asigna un valor hedónico o aversivo a las consecuencias. Esto se expone con mayor detalle a continuación.

Emitir una conducta es parte de la naturaleza biológica de los organismos y es indispensable para interactuar con el medio externo y sobrevivir. Los efectos o consecuencias de la conducta, permiten que el individuo reconozca el beneficio o perjuicio de su acción y por su efecto hedónico, propiciarán que el individuo repita o no la conducta. Cuando el resultado es positivo o satisfactorio, la acción realizada permite la aparición de un estímulo o evento que permite resolver la pulsión, a esta consecuencia benéfica se le llama reforzador. Por sus efectos benéficos el individuo tenderá a aumentar la frecuencia con que repita dicha conducta. Sin embargo, cuando el resultado es negativo o perjudicial, el individuo tratará de no volver a repetir dicha conducta, a este estímulo se le llama castigo.

Las consecuencias de nuestros actos se aprenden y van modulando el repertorio de conductas en cada individuo. A esta relación se le denomina **aprendizaje de asociación**, ya que se asocia con la conducta previa con sus resultados. Algunas de estas relaciones se adquieren desde edades tempranas o inclusive se consideran que son innatas, ya que son tan esenciales para la vida que se presentan desde los primeros momentos de la vida. Un ejemplo es la sensación de placer que otorga un vaso de agua cuando estamos acalorados o deshidratados. Esta consecuencia debió tener un origen muy temprano en la vida del individuo, ya que satisface una necesidad tan esencial que no hemos tenido que aprender, la satisfacción de la frescura del líquido en la boca, se experimentó desde el inicio de nuestra vida y es una sensación compartida por todos los individuos. De igual manera podemos referirnos a la ingestión de alimento después de un ayuno, la obtención de calor cuando tenemos frío, etc. Estas acciones resuelven necesidades o motivaciones primarias y esenciales para la vida, por tal motivo no se aprenden, sino que forman parte del repertorio básico de cada individuo. A la consecuencia positiva que se presenta posterior a una conducta emitida y que no necesita aprendizaje se le define como **reforzador primario**, su efecto positivo sobre el organismo es innato y satisface una necesidad vital para la vida (cuadro 3-1). Por lo anterior, a los reforzadores primarios se les denomina también **reforzadores innatos** o **reforzadores incondicionados** (figura 3-3). El efecto para promover que la conducta se repita con mayor frecuencia depende de alguno de estos dos procesos: 1) que al emitirse la conducta sea seguida de la aparición de un estado satisfactorio, lo cual se refiere a un reforzador primario positivo; 2) que al presentarse la conducta se retire del entorno un evento o sensación negativa, resultando entonces en bienestar. A este se le llama **reforzador primario negativo**.

Estos reforzadores primarios son intrínsecos en cada especie, de tal manera que para los mamíferos la primera experiencia puede estar ligada a la succión de leche durante el amamantamiento, y al lamido de la hembra para limpiar la cría, mientras que en un ave puede estar ligado al alimento que regurgita la hembra proveniente de su buche y al calor de las plumas maternas en el nido. A lo largo

Cuadro 3-1. Ejemplos de reforzadores primarios asociados a la satisfacción de motivaciones primarias.

Motivación	Reforzador primario
Hambre	Ingestión de alimento
Frío	Calentamiento del cuerpo
Sed	Ingestión de líquidos
Olor	Analgesia
Cansancio	Descanso
Sueño	Dormir
Miedo	Protección, seguridad

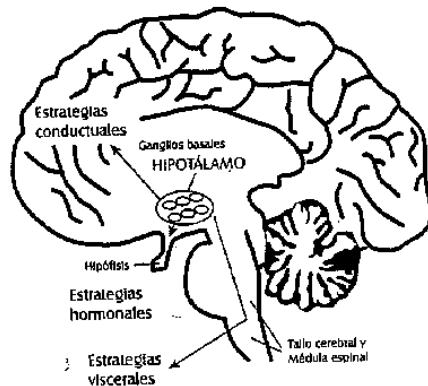


Figura 3-3.

Representación anatómica del hipotálamo y sus tres proyecciones más importantes para mantener la homeostasis. Una proyección hacia la médula espinal y tallo cerebral para regular el funcionamiento de las vísceras, una proyección a la glándula hipófisis para dar señales endocrinas y una tercera proyección a ganglios basales para planear y realizar conductas.

de la vida se asocian los reforzadores primarios con otros eventos que suceden simultáneamente, que por un proceso gradual llegan a sustituir al reforzador primario. En un momento dado, estos otros eventos que fueron asociados al reforzador primario, son capaces por sí mismos de producir el efecto del reforzador primario por lo que se les llama **reforzadores condicionados**.

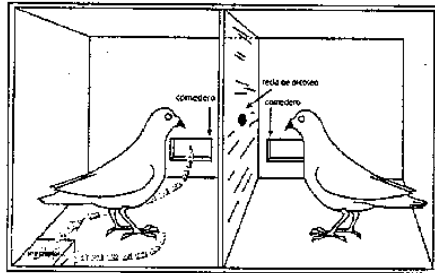
EL HIPOTÁLAMO COMO GENERADOR DE MOTIVACIONES PRIMARIAS

El hipotálamo mide aproximadamente 1 cm³ y a pesar de su pequeño volumen, contiene grupos neuronales especializados, conocidos como **núcleos**, los cuales realizan la función de monitorear y controlar las variables fisiológicas indispensables para mantener la homeostasis y, por lo tanto, la vida.

Los núcleos del hipotálamo reciben su nombre de acuerdo a su ubicación (anterior, medial posterior, dorsal, ventral) o bien por su forma. La forma en que estos núcleos se organizan e interactúan con el cuerpo es todavía un enigma, aunque se han logrado amplios progresos hacia su entendimiento.

Se sabe que en el hipotálamo anterior se localizan células sensibles a cambios osmóticos y por lo tanto, participan en la generación de la sed. En los núcleos preóptico medial, supraóptico y paraventricular se localizan neuronas especializadas en detectar niveles hormonales y producen factores liberadores para estimular a la glándula hipófisis. En otros núcleos como el ventromedial y el preóptico medial se han identificado receptores a hormonas sexuales y se ha determinado que participan en la generación del impulso sexual.

En el hipotálamo medial se localizan núcleos especializados en la detección de metabolitos energéticos y hormonas involucradas en el balance energético, y por lo tanto, participan esencialmente en la generación del hambre y la saciedad (figura 3-4). Este sistema ha mostrado ser muy complejo e involucra al núcleo arqueado, el núcleo paraventricular, el núcleo dorsomedial, el núcleo ventromedial y al hipotálamo lateral. En estas estructuras se han identificado células especializadas en la detección de glucosa, así como grupos celulares que al activarse producen un efecto orexigénico, esto es, estimulante del hambre o anorexigénico, esto es, inhibidores del hambre y estimulantes de la saciedad. La relevancia de estos núcleos, especializados para generar estados de motivación, se hizo evidente cuando se observó que lesiones del núcleo ventromedial producían animales voraces y hambrientos e incapaces de saciarse. En contraste las lesiones bilaterales del hipotálamo lateral producían animales indiferentes al alimento y llegaban a morir por inanición al faltar la fuerza motivacional para comer.



Basado en HERRNSTEIN 1964

Figura 3-4.

Se pueden observar dos pichones expuestos a condiciones de condicionamiento en donde aprenden a picotear sobre un sitio específico, aquí denominado "tecla de picoteo". El pichón de la izquierda debe desplazarse en la jaula para activar un interruptor. Ambas conductas llevan a la obtención de alimento. Esta consecuencia satisface una motivación básica que es el hambre, y por lo tanto, tiene un efecto de reforzador primario.

También en el hipotálamo se encuentra un pequeño núcleo llamado supraquiasmático, que contiene células generadoras de oscilaciones con periodos cercanos a las 24 horas. Este núcleo se conoce como el reloj maestro del cerebro, ya que las oscilaciones que genera se transmiten al resto del organismo y producen la expresión de los ritmos circadianos. Se llaman así estas oscilaciones internas porque coinciden con los ciclos diarios de la alternancia día-noche: *circa*= cercano, *igual*, *diem*= día. A partir de estas oscilaciones endógenas somos capaces de estimar el tiempo y, por lo tanto, de anticipar aquellos eventos del ambiente que son predecibles. Este reloj interno propicia que algunas funciones se expresen con mayor intensidad o concentración a ciertas horas en que el entorno resulta más demandante y que se expresen menos a otras horas en que el entorno no requiere de ellas. De tal suerte, se observan oscilaciones diarias en casi cualquier variable fisiológica que se mida a lo largo de un día y la coincidencia entre el pico máximo de expresión de cada variable con momentos específicos del día permiten la mejor adaptación del individuo (figura 3-5).

Por la capacidad de imponer ritmos diarios a las funciones del cuerpo, el núcleo supraquiasmático juega un papel primordial para la generación de motivaciones primarias, ya que al producir fluctuaciones en la fisiología general produce

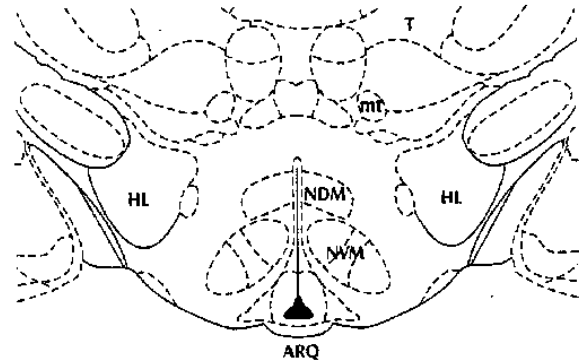


Figura 3-5.

Núcleos del hipotálamo medial involucrados en la ingestión de alimento y el balance energético: HL: Hipotálamo lateral; NVM: Núcleo ventromedial; ARQ: Núcleo arqueado; NDM: Núcleo dorsomedial. Otras estructuras de referencia son mt: Haz mamilotálamico y T: Tálamo.

cambios en el estado interno del organismo. El ciclo más evidente que promueve el núcleo supraquiasmático, es la alternancia del ciclo sueño vigilia, el cual promueve que los individuos estén despiertos y activos durante el día y dormidos e inactivos durante la noche. Igualmente, hay momentos a lo largo del día en que la temperatura corporal es más alta (inicio de la tarde) y momentos en que la temperatura alcanza su nivel más bajo (la madrugada), las hormonas alcanzan valores altos en ciertas horas y valores bajos en otras. También se sabe que en el ser humano el momento de máxima actividad cardíaca y pulmonar es por la tarde, y la actividad digestiva es mejor por la mañana. De esto, resultan momentos óptimos para las actividades físicas, para el aprendizaje, la reproducción, la alimentación, etc., que se acompañan de un estado de alertamiento específico dirigido a satisfacer motivaciones primarias que surgen en consecuencia. Por el contrario, cuando el individuo está dormido, estas motivaciones son mínimas y el organismo utiliza este intervalo para la recuperación y descanso.

■ UN CIRCUITO NEURONAL PARA LOS REFORZADORES PRIMARIOS

Aunque es bien aceptada la participación del hipotálamo, como generador de motivaciones, a partir de su capacidad para detectar diversas señales del cuerpo y de producir ritmos circadianos, es también evidente que sin la participación de otros sistemas, el hipotálamo no podría resolver un desequilibrio. Como ya se mencionó, es necesario que a través de sus proyecciones se apoye de los circuitos reguladores de las vísceras, las hormonas, y la conducta. Para ello, el hipotálamo le comunica las necesidades específicas a otras partes del sistema nervioso y estas señales sean transformadas en patrones de movimientos. Esto requiere de la participación de diversos circuitos neuronales que tienen la capacidad de elaborar patrones de movimiento, adecuados a las condiciones del momento. Para ello los individuos cuentan con un acervo de conductas innatas que les permiten emitir respuestas ante ciertos estados motivacionales. Además estos patrones se moldean de acuerdo con las experiencias basadas en las consecuencias previamente aprendidas, las cuales juegan un papel relevante en modificar o priorizar patrones conductuales que pudieran ser exitosos. Para la generación de motivaciones y conductas dirigidas a resolverlas se ha propuesto un circuito que involucra la interacción del hipotálamo con la corteza cerebral y los ganglios basales. Por otro lado, también se requiere un sistema que evalúe las consecuencias y genere los estados de satisfacción o desagrado, este sistema se conoce como sistema límbico. En años recientes se ha obtenido evidencia de que este circuito también llamado corticolímbico, por su interacción con la corteza cerebral, juega un papel muy importante para elaborar y mantener la ejecución de una conducta durante todo el tiempo necesario para satisfacer una pulsión. Este circuito participa en la producción de las sensaciones hedónicas, de satisfacción o de bienestar que

acompañan el reforzamiento cuando la ejecución ha sido exitosa. Razón por la cual este circuito se considera el sustrato anatómico y funcional del reforzamiento primario.

En 1954, Olds y Milner descubrieron que la estimulación eléctrica de zonas del tallo cerebral y del diencéfalo tenía el efecto de reforzador en procesos de aprendizaje. La estimulación eléctrica de estas zonas, producía una alta motivación para repetir la conducta que precedía a la estimulación. En particular, ratas entrenadas para oprimir una palanca para obtener alimento, aumentaban su frecuencia de presionarla cuando la consecuencia era estimulación eléctrica en esta zona. Estudios posteriores demostraron, que estos efectos positivos se obtenían siempre que el electrodo estuviera localizado en el trayecto del haz mesolímbico. Este haz se origina en grupos neuronales, localizados en el tallo cerebral y proyectan sus axones a través del hipotálamo lateral hacia el sistema límbico, la corteza cerebral y los ganglios basales. Experiencias posteriores con animales de experimentación, así como con pacientes quienes recibían estimulación intracraneal, confirmaron que la estimulación de este haz mesolímbico, producía sensaciones reforzantes y recompensantes en animales y pacientes.

El neurotransmisor que se libera por las fibras axónicas de este haz es la dopamina. Estudios con técnicas de inyección demostraron que la administración intracraneal de dopamina en zonas de la corteza cerebral, en el sistema límbico y en el núcleo accumbens tenía el mismo efecto reforzante y placentero que la estimulación de las fibras. Se obtuvo una evidencia más con técnicas de microdialísis, con la cual se determinó que en condiciones de reforzamiento aumenta la secreción de dopamina en el núcleo accumbens (área ventral de los ganglios basales), mientras que su depleción disminuye la efectividad de un reforzador y baja la intensidad de conductas motivadas. Con todas estas evidencias se considera que el sistema mesolímbico y la dopamina son sustratos para el reforzamiento primario.

Debido a que las fibras de proyección dopaminérgicas del haz mesolímbico pasan por el hipotálamo lateral, las lesiones en esta región interrumpen las fibras y tienen como consecuencia una pérdida de la actividad generalizada que se caracteriza por una falta de motivación para realizar tareas de ingestión, sexuales, de exploración, etc.

Se sabe que algunas sustancias químicas simulan el efecto de la dopamina. Esto es, algunas drogas simulan químicamente la estructura de la dopamina y ejercen efectos estimulantes sobre las zonas del cerebro que normalmente reciben fibras dopaminérgicas. Otras drogas evitan la remoción o recaptura de la dopamina a nivel del espacio sináptico y tienen como consecuencia un efecto prolongado de los efectos de este neurotransmisor. Prácticamente todas las drogas de abuso promueven alguno de estos mecanismos, los cuales impulsan un aumento en la eficiencia del sistema dopaminérgico. Es por ello que la ingestión o administración de estas sustancias producen en forma artificial sensaciones similares a las que produce la dopamina. Algunas de las sustancias, que se sabe simulan los

efectos de la dopamina son las anfetaminas, la cocaína y la marihuana. También se ha demostrado que el chocolate y alimentos azucarados producen la liberación de dopamina. Por este efecto es que se cree que en particular estos alimentos causan adicción o son ingeridos preferentemente por muchas personas cuando buscan un estado de placer.

La potencia de la dopamina como neurotransmisor reforzador se considera un fuerte factor para la producción de adicciones; ya que las sensaciones de reforzamiento y placer que normalmente se logran con reforzadores primarios pueden producirse con la ingestión de drogas. Obviamente ante una experiencia de bienestar de este tipo, los individuos tienden a repetir esta experiencia y recurren nuevamente a la droga.

El haz mesolímbico proyecta a un subnúcleo ventral de los ganglios basales conocido como núcleo accumbens. De este núcleo se distribuye la señal a la corteza cerebral y al sistema límbico. Simultáneamente estas fibras proyectan al núcleo paraventricular del tálamo y los distribuye al sistema límbico y de regreso al accumbens (figura 3-6). De tal manera se forma un circuito en donde el núcleo accumbens es una interfase que une al hipotálamo con estructuras corticolímbicas y los ganglios basales para motivar la expresión de conductas, así como para la producción de sensaciones hedónicas.

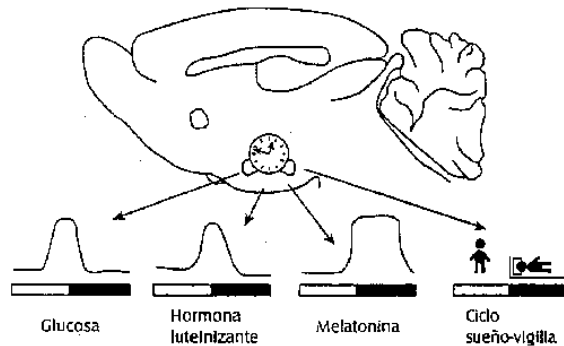


Figura 3-6.

Esquema que muestra al núcleo supraquiasmático como un reloj interno, que marca tiempos para las oscilaciones hormonales y de conducta. En este esquema se muestra el momento de máxima y mínima expresión de algunas variables endocrinas, así como los momentos de actividad y sueño. Las barras blancas y negras representan el día y la noche, respectivamente.

El núcleo accumbens se subdivide en dos regiones que tienen funciones distintas asociadas al placer. La región del centro conocida también como *core* participa de conductas apetitivas, mientras la región de la corteza conocida también como *shell* participa del reforzamiento.

Con relación al accumbens *core*, evidencias experimentales muestran que, cuando un individuo ha tenido la experiencia regular de obtener un reforzador primario en una misma circunstancia, se aprende la relación entre la sensación placentera y el lugar o situación, a tal punto, que la pura exposición a la circunstancia produce la liberación de dopamina en la región *core* del accumbens, antes de que el reforzador primario se presente proporcionando sensaciones placenteras. Esta activación anticipatoria por dopamina del accumbens *core*, produce placer ante la perspectiva de un reforzador primario y estimula la producción de sensaciones hedónicas, lo que promueve aún más la presencia de una conducta motivada. Se ha propuesto que este estado anticipatorio de satisfacción pudiera tener como finalidad mantener la expresión de la conducta cuando el reforzador tarda en aparecer.

Al igual que las drogas que simulan la presencia de reforzadores primarios al estimular al sistema dopaminérgico, la activación anticipatoria del accumbens *core* parece tener un mismo efecto adictivo. Los individuos sienten placer ante una situación aprendida, antes de que se presente el reforzador y se establece una relación de placer ante la expectativa de un evento. Un ejemplo de este tipo de adicciones se observa en los jugadores compulsivos. La situación del juego, representada por el casino, las maquinatas, los compañeros de juego, etc., provocan la activación del núcleo accumbens por la dopamina y el individuo se siente eufórico y bajo un estado de excitación placentera. Este estado lo lleva a seguir jugando por intervalos prolongados, aun sin ganar, ante la expectativa del reforzador. De forma similar a este circuito se le ha asociado con otras conductas compulsivas como comer. Evidencias recientes sugieren que a través de la activación de la región accumbens *core* se puede promover el deseo de comer aún en situaciones en que el hipotálamo señala un estado energético homeostático balanceado. Tal es el caso de la ingestión de alimentos apetitosos o atractivos en ausencia de una sensación de hambre, o la ingestión de líquidos en ausencia de sed. Esto lo observamos cotidianamente en el ser humano, quien ingiere alimentos en situaciones sociales en que se ofrecen bebidas y alimentos como parte del protocolo de interacción.

En la otra región del núcleo accumbens conocida como corteza o *shell* en inglés, a diferencia de la región del cuerpo, se lleva a cabo la secreción de dopamina después de que los individuos realizan una acción. De tal manera que posterior a una conducta exitosa, hay otra liberación de dopamina hacia esta región *shell*, lo que produce la sensación placentera directamente consecuencia del reforzamiento. Es en realidad esta última función de dopamina la que verdaderamente se relaciona con el efecto del reforzador primario. Cuando esta segunda

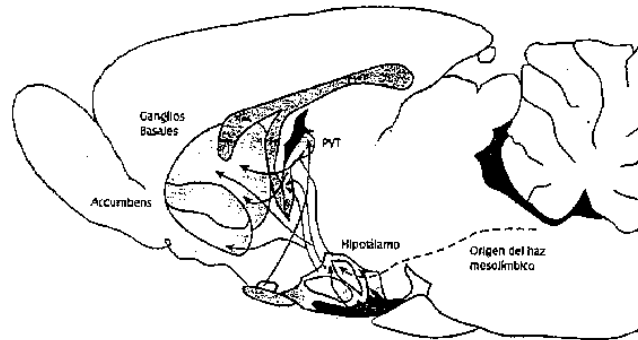


Figura 3-7.

Modelo de circuito neuronal involucrado en el reforzamiento primario. En este circuito se incluye al sistema mesolímbico, al hipotálamo lateral, el núcleo paraventricular talámico (PVT) y el núcleo accumbens. Estas estructuras a su vez distribuyen información de reforzamiento o sensaciones placenteras al sistema límbico y la corteza cerebral.

secreción dopaminérgica se bloquea, la presentación del reforzador primario no tiene efecto alguno y no se lleva a cabo el aprendizaje. Se ha postulado que a lo largo de la vida diversos estímulos que se presentan simultáneamente con la liberación de dopamina que resulta del reforzador primario, se van asociando a este estado de placer y se convierten en reforzadores condicionados o secundarios. De esta asociación resulta entonces que una gran variedad de eventos, estímulos y circunstancias producen la activación de este sistema funcional dopaminérgico y producen estados placenteros llegando a sustituir al reforzador primario. Un ejemplo claro de estas asociaciones es el dinero, que representa la posibilidad de acceder a los reforzadores primarios. Algunas terapias conductuales ofrecen puntos a los participantes, los cuales se acumulan y permiten a largo plazo una recompensa. Estos puntos por sí mismos no producen reforzamiento, a menos que se asocien con la obtención de otros objetos satisfactorios o privilegios. Los métodos comerciales se basan mucho en este tipo de estrategias para hacer atractivos sus productos. En muchos comerciales televisivos se observa la asociación de un producto con condiciones de bienestar y alegría, que generalmente aparecen ante la satisfacción de motivaciones por un reforzador primario.

■ CONCLUSIONES

El mantenimiento de la homeostasis interna es un proceso primordial para la supervivencia. Para ello los organismos cuentan con mecanismos muy precisos para monitorear y mantener estables los valores de regulación de un sinnúmero de variables fisiológicas. En los mamíferos, el hipotálamo es la estructura cerebral involucrada en este proceso. Ante un desequilibrio, el hipotálamo cuenta con tres estrategias básicas para restablecer los valores de regulación: el sistema nervioso autónomo, el sistema endocrino y la emisión conductual. Cuando se emite una conducta, las consecuencias se evalúan. Aquellos estímulos o eventos que logran restablecer el estado homeostático, producen un estado de bienestar y se conocen como reforzadores primarios. Ante un reforzador primario se activan mecanismos para señalar al organismo reforzamiento o placer. Estos mecanismos involucran al haz mesolímbico que secreta dopamina al hipotálamo lateral, las zonas de la corteza cerebral, del sistema límbico y principalmente al núcleo accumbens. El núcleo accumbens actúa como interfase entre el hipotálamo y el resto del cerebro y señala reforzamiento aún en anticipación a la presencia del reforzador primario, lo cual estimula aún más a realizar conductas aprendidas.

REFERENCIAS

- Bernard, C. *Introducción al estudio de la medicina experimental* (1942). México: UNAM.
- Escobar, C., y Aguilar-Roblero, R. (2002). *Motivación y conducta: sus bases biológicas*, pp. 420, México: El Manual Moderno.
- Kelley, A.E., Baido, B.A., y Pratt, W.E. (2005). A proposed hypothalamic-thalamic-striatal axis for the integration of energy balance, arousal and food reward, *The Journal of Comparative Neurology*, 493: 72-85.
- Olds, J. (1972). Pleasure centers in the brain. En: *Physiological Psychology*. (pp. 294-299) Readings from Scientific American Inc., USA.
- Reynolds, G.S. (1973). *Compendio de condicionamiento operante*, p. 190, México: Ciencia de la Conducta.
- Robbins, T.W., y Everitt, B.J. (1999). Motivation and reward. En: Zigmund, M.J., Bloom, F.E., Landis, S.C., Roberts, J.L., Squire, L.R. (eds.). *Fundamental Neuroscience*, (pp. 1245-1260). USA: Academic Press.



7

Food entrainment: A multioscillatory system

Carolina Escobar¹, Manuel Angeles-Castellanos¹
Roberto Saigado Dalgado¹, Katia Rodriguez González¹
and Ruud M. Buijs²

¹Departamento de Anatomía, Facultad de Medicina, ²Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México
México DF 04510, México

Abstract

The estimation of meal time provides animals with capacities to organize their activities, and to be efficient in digestive and in the limited foraging opportunities to obtain food.

Food ingestion exerts a strong influence on cell metabolism and thus meal time has shown to give powerful time signals to diverse organs and areas in the brain, setting the phase and period on daily temporal patterns in cellular activity and clock gene products expression.

The possible existence of a food entrained oscillator has driven many groups to search a coordinating structure that may play the role as a pacemaker for other food entrained structures. However using diverse strategies to uncover this structure, it has become evident that food entrainment relies on multiple brain and visceral structures and that this process may rely on the interaction of a multiple systems.

The fact that food entrainment has been observed in insects, mollusks, fish and many mammalian species confirms that meal time is a strong timing signal and that the underlying anatomical and physiological substrate will not be identified in a single structure, but rather should be understood as a preserved oscillating property of mainly all functional systems promoting food intake.

Introduction

In the present chapter we will discuss the relevance of feeding time as a synchronizing signal for the circadian system. We will briefly describe the main experimental approaches that lead to the proposal of a food – entrained oscillator independent of the suprachiasmatic nucleus (SCN), a light driven clock. We will also present the experimental evidence that has lead to the concept of a multioscillatory food – entrained system and the possible neuronal circuits involved, as well as peripheral organs that may contribute to this time keeping mechanism.

The relevance of estimating time for feeding

In nature all animals spend daily several hours to find food. Depending on the individual's metabolism, and the conditions in the environment, foraging can require a high proportion of daily activity. Access to food sources varies along the day because some preys exhibit daily activity cycles or because the consumer needs to avoid to be preyed. Organisms have developed the capacity for estimation of time, in order to be efficient in finding food.

Individuals who are able to predict the optimal time for foraging or for finding a food source, will certainly be more successful in arriving at the right spot at the right moment to ingest the maximum from the food source. The efficiency to estimate time also provides the animals with the advantage of adjusting their activities in order to avoid predators, for build a nest or for having social interactions, etc. In many cases the estimation of the meal time not only allows anticipating the coming feeding opportunity, with foraging and approaching the right location but also starts physiological functions for a better food digestion.

There are many examples that illustrate the capacity of animals for timing of food. One of the first formal descriptions of this capacity was published by

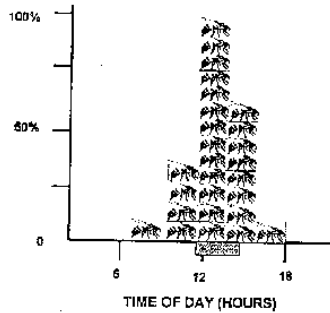


Figure 1. Graphical representation of the proportion of bees present at a sugar source that was available for 2 hours per daily (grey). The majority of bees was present around the time of sugar access (Modified from Moore-Ede 1982).

Belling in 1929 (referred in Moore Ede (1)). This story refers to her former professor August Forel (1848-1931) who during his vacations in the mountains observed the timing capacities of bees in order to obtain food. Forel used to sit every morning on his terrace for breakfast; at the same time bees approached daily his table looking for a jar of marmalade. He suspected that bees were estimating time because he observed that bees started to arrive to the table briefly before he went out for breakfast. Thus, on one occasion he decided not to go out and observed that bees remained flying over the table for a long time apparently expecting him and the jar of marmalade. During the following days bees continued arriving at the same time. These informal observations led him to suggest that bees possess a time keeping system for estimating food access, that he called "Zeitgedächtnis" which means "time awareness" in English.

In 1929 Belling performed formal experiments to confirm the capacity of bees to estimate meal time. He allowed a group of bees to access a sugar source for 2 hours daily and monitored the amount of bees present around the bean during the day. The number of bees was significantly increased during the 2 hours that sugar was available, while during the rest of the daily bees passed only randomly close to that site (Figure 1).

Food entrainment

The first formal description about the relevance of food for timing the activity of animals was published by Richter in 1922 (2). For the first time in a formal experimental environment he described that restricting food access to a

few hours per day induced rats to exhibit anticipatory activity for the feeding event. Rats increased their running in a wheel 2-3 h prior to food access. This anticipatory activity was further observed and described by other groups for general cage activity and instrumental behaviors like pressing a lever in a Skinner box to obtain food or approaching a food source.

In 1962, Robert Bolles and De Lorge (3) suggested that locomotor activity exhibited by rats preceding food access could rely on a biological clock, because it was only observed when feeding schedules had a period close to 24 h. In 1965 Bolles and Stokes (4) gave the name of food anticipatory activity (FAA) to the locomotor activity preceding 2-3 h food access.

Already long before Forel it was reported first for plants and later for animals that organisms have the capacity to organize their activity around the light dark cycle and that even without the presence of the light dark change still the organisms maintained their cyclic behavior. I.e. the animals maintained a sleep wake cycle with a rhythm of approximately 24 hours (*circadian*). Consequently many investigators tried to find in the brain the location of the structure that could be responsible for this rhythmicity. Finally in 1972, Moore and Eichler (5) and Stephan and Zucker (6) described in the rat that lesions of the SCN, area of the brain where information of the retina entered the brain, produced a complete loss of diurnal rhythms, indicating that the SCN is the master biological clock driving rhythms in sleep and activity and thus providing animals with a time keeping system that enables them to estimate time. In view of that finding it was very surprising that already in 1977 Dorothy Krieger (7) not only described that associated with the food anticipatory activity the diurnal peak of corticosterone was shifted and anticipated meal time but that this peak did not disappear after bilateral lesions of the SCN (7,8), indicating that without SCN the animals still were able to keep track of time. In 1979 Fred Stephan et al. (9) reported that rats bearing bilateral lesion in the SCN were still able to exhibit food anticipatory activity (FAA) under a food restricted schedule. These findings led to propose that food entrained rhythms do not depend on the SCN and that food entrainment should rely on a circadian oscillator independent of the SCN.

During the last 30 years several groups have tried to understand the mechanisms underlying the capacity of animals to entrain to food without the "master biological clock". During this time it became clear that expression of FAA exhibited circadian properties just as the SCN, because FAA is only displayed when food is delivered in a circadian range and exhibits transitory cycles to adjust to shifts of meal time (10, 11, 12; 13, 14.). In addition, when left in fasting conditions, food entrained animals exhibit activation for several cycles at the same phase as the food was provided (11,15). These features confirmed that FAA depends on circadian clock mechanisms, responsive to feeding schedules (16). The search for the location of this food entrained clock started.

The mechanisms underlying food entrainment

Several groups tried to uncover the location of the food entrained oscillator (FEO) using rodents as experimental models. A major strategy that was followed was to perform lesions in specific structures of the brain, that may contain important regulatory mechanisms for feeding behavior (17). This strategy followed the reasoning that the removal of a region that constituted the FEO should result in a loss of food entrained patterns including FAA (see table 1). Interestingly also Dorothy Krieger was the first to follow this strategy and observed that the food anticipatory peak in corticosterone disappeared after lesioning the ventromedial hypothalamus (18). Later studies showed that this conclusion might be erroneous because longer survival times after the lesion showed recovery of the anticipatory behavior (19; 20). Consequently, the lesioning strategy remained largely unsuccessful, because until now the FAA reappears despite numerous lesions in structures involved in metabolic, locomotor or motivational regulatory process. Despite these problems, lesioning studies have pointed out several structures that can be elements of a system entrained by food (see table 1 and table 2).

An alternative strategy that has been explored recently is the use of activity markers in the brain, specifically the use of the protein c-FOS has allowed identifying numerous structures that respond and are active when animals anticipate a meal or when animals have received food. This strategy has pointed out that diverse functional systems exhibit simultaneously food entrained patterns of c-FOS expression leading to the proposal that the FEO is not a single structure, but rather is built up of a distributed system.

In recent years the identification of clock gene products (mRNA or proteins) in different brain nuclei has allowed determining that several areas in the brain exhibit daily oscillations in phase with the light - dark cycle and that in those structures food entrainment overrides the influence of the SCN and modifies the daily oscillations such that their phase is shifted towards meal time (21; 22; 23). The observation that also here many structures are simultaneously activated has only strengthened the concept of a distributed system. In spite of the fact that the oscillations of some clock genes persist (just like c-Fos) under fasting conditions no evidence for the presence for sustainable rhythmicity as in the peripheral organs has been provided.

The only fact that has been demonstrated with all the different strategies is that the SCN is mainly entrained by the light - dark cycle and is not entrained by feeding schedules (24; 25). Only very specific conditions like a starvation diet are able to influence the SCN (26). Consequently all evidence indicates that two systems exist capable of driving daily activity rhythms: a light entrained oscillator the SCN and a food entrained oscillator for which the location has been proposed to be the DMH (27; 28) but for several reasons (to be discussed later) this conclusion seems to be a bit premature.

Table 1. Brain areas involved in transmission or integration of metabolic signals that have been tested as possible elements for food entrained behavioral patterns by performing lesions in rodents.

	LESIONED AREA	BEHAVIOR MONITORED	EFFECT ON FAA	REFERENCES
INPUT PATHWAYS	PARABRACHIAL NUCLEUS	LOCOMOTION	DECREASED	Davidson et al. 2006 (41)
	AREA POSTERIORA	FOOD BIN	NO-EFFECT	Davidson et al. 2006 (42)
	DENERVATION OF THE VAGUS NERVE	WHEEL RUNNING	NO-EFFECT	Comperatore and Stephan, 1996 (38)
	SYMPATHETIC DENERVATION WITH/ CAPSAICIN	WHEEL RUNNING	NO EFFECT	Davidson and Stephan, 1996 (39)
	OLFACTORY BULB	FOOD-BIN WHEEL RUNNING	NO-EFFECT	Davidson et al. 2000 (45) Grubne et al. 1989 (46)
METABOLIC INTEGRATION	SUPRACHIASMATIC NUCLEUS	LOCOMOTION	NO-EFFECT	Stephan et al. 1977 (9);
			INCREASED	Mistlberger et al 1992 (37);
	VENTROMEDIAL NUCLEUS	LOCOMOTION	ABOLISHED DURING EARLY STATE	Inoue et al. 1985 (43)
			NO EFFECT IN A LONG TERM	Honma et al 1987 (19); Mistlberger and Rechtschaffen 1984 (33)
	PARAVENTRICULAR HYPOTHALAMUS	FOOD-BIN	NO-EFFECT	Mistlberger y Busk 1988 (48)
	SUB-PARAVENTRICULAR ZONE	LOCOMOTION	NO EFFECT	Gooley and Saper, 2003 (68)
	LATERAL AREA	FOOD-BIN	NO-EFFECT	Mistlberger y Busk 1988 (48)
	DORSOMEDIAL NUCLEUS	LOCOMOTION AND FOOD-BIN	NO-EFFECT	Lantry et al. 2006 (51)
			ABOLISHED OR DECREASED	Gooley et al 2006 (27)
ARCUATE NUCLEUS	FOOD-BIN	NO-EFFECT	Mistlberger and Antle, 1999 (52)	
HYPOPHYSIS	LOCOMOTION	NO-EFFECT	Davidson and Stephan, 1999 (39)	

Metabolic systems involved in food entrainment

Rodents entrained by restricted feeding schedules develop metabolic adjustments that allow them to adapt to the alternation of long intervals of fasting vs. 2-4 hours of food access. In addition to the development of FAA, they learn to ingest enormous amounts of food during the short period of food access, allowing them to ingest the same amount of food that is regularly ingested during a 24 h cycle when they have food *ad libitum* (29). Metabolic oscillations of free fatty acids, triglycerides and glucose oscillate in phase with the feeding schedule, as well as daily oscillations of hormones as insulin, glucagon, leptin and corticosterone (30; 31; 32; 33). Especially in the liver a strong food entraining effect has been described for enzymatic processes, mitochondrial functions and daily cycles of the redox state (31; 34 and see chapter by Diaz-Muñoz).

The discovery of clock genes in peripheral tissues and the strong entraining effect produced by feeding schedules on the liver and digestive organs has indicated that peripheral organs may also participate in the food entrained system. Although the liver and the stomach may play an important role producing time signals of a metabolic state (hunger or satiety; anabolism and catabolism), until now it has not been demonstrated that they function as food entrained pacemakers, capable of generating and controlling rhythmicity in other tissues or organs (35; 36). Their daily oscillations seem to be related with providing a temporal order to the organ or tissue for which the relation with meal time needs to be tightly maintained (37).

Neuronal pathways that provide digestive and metabolic signals to the brain have been interrupted, either by sections of the vagus nerve or by sympathetic deafferentation with the toxic capsaicin. Even after such peripheral deafferentation rats have continued to exhibit FAA (38; 39).

Diverse relay nuclei in the brain stem, which constitute neuronal pathways of taste and ingestive signals to the brain exhibit food entrained c-FOS patterns with highest values after feeding. This is the case for the nucleus of the solitary tract (NTS), the parabrachial nucleus (PBN), the area postrema and the dorsomotor nucleus of the vagus (40). Lesions of the PBN (41) and not of the area postrema (42) decrease the expression of the FAA, indicating the relevance of peripheral signals entering to the brain in order to develop FAA.

Areas in the brain involved in energy balance and metabolism were among the first areas to be explored in order to identify the FEO (Figure 2). Due to their integrative role for metabolic signals and regulation of feeding behavior, the ventromedial nucleus of the hypothalamus (VMH), the lateral hypothalamus (LH) and the dorsomedial nucleus of the hypothalamus (DMH) have been regarded as possible sites for the FEO. However to the present time no strategy has allowed to confirm whether any of them can function as an independent food entrained clock.

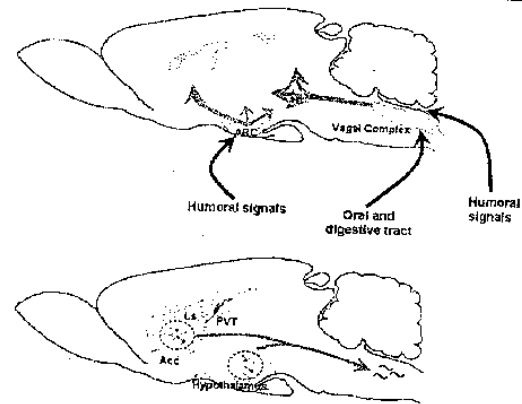


Figure 2. Sagittal sections of the rat brain depicting A) the main input pathways involved in food entrainment and B) integrative areas in the brain involved in metabolic and motivational oscillations. In A) arrow indicate the main visceral and humoral relay areas, from which digestive and taste signals associated with the feeding event, will be transmitted to other integrative areas. In B) the hypothalamic and limbic structures are represented by clocks and their input may signal to the rest of the body daily food entrained rhythms. Acc - nucleus accumbens; ARC - arcuate nucleus; the brain stem; Ls - lateral septum; PVT - paraventricular nucleus of the thalamus.

As indicated above early studies examined the effect on food entrainment of lesions of the ventromedial nucleus (VMH), considered the "satiety center" for many years. Lesions in the VMH lead to a loss of food entrained rhythms shortly after the lesion, known as the dynamic phase (43), but FAA was restored after a longer interval of recovery from the lesion known as the static phase (19; 20). In the VMH daily rhythms of multiunit activity were described, which were entrained by RFS, but disappeared after SCN lesions, thus indicating their dependence on the main circadian clock (44). No loss of FAA was observed after lesions in the LH (45), although multiunit activity of the LH was entrained by feeding schedules and persisted after lesions of the SCN (44). The LH was considered for many years as the "hunger center" and contains cells groups involved in behavioral arousal for foraging and to promote feeding (46). The use of the immediate early gene protein c-Fos has pointed out a relevant activation of the LH when rats are anticipating food and

this food entrained rhythm persists for 9 cycles after interruption of the food entrained protocol (40). This activation occurs mainly in the Perifornical area (PeF) where orexin producing cells can be found. Orexin cells project to diverse areas in the brain and have been related to arousal and motivational systems to promote feeding (47). However destroying this specific cell group with the toxic saporin did not prevent rats to anticipate, however produced significantly decrease in the intensity of FAA (48; 49).

Finally, attention has been focussed on the dorsomedial nucleus (DMH) of the hypothalamus as a putative FEO. The use of the protein c-Fos has pointed out a relevant activation of the DMH during FAA (27; 40) and recent studies have reported that daily oscillations of the clock gene products *Per1* and *Per2* are induced in the DMH by restricted feeding schedules (28; 50). These studies were followed by two different studies in which the DMH was lesioned and in which opposite results were reported (27; 51). Up till now it is not clear to what the discrepancy of these studies can be attributed but recovery time after the lesion (as was seen after the VMH lesion) and the behavioral analysis and size of the lesion may certainly play a role.

Other structures in the hypothalamus and the brain stem have been explored as possible mediators of the input signals provided by digestive pathways to the brain or as relay structures for the output and for the transmission of food entrained signals to metabolic and digestive systems. Recent data obtained by our group indicate that the arcuate nucleus (ARC), the main structure providing hormonal information about the metabolic state in the hypothalamus, exhibits high c-Fos expression during FAA in rats and a food entrained pattern of *Per1* protein with peak values at the moment of food access (data not published). However, lesions of the ARC, do not prevent FAA (52).

The paraventricular nucleus, which plays a relevant role, as input and output structure to the circulation and the autonomic nervous system (53) exhibits food entrained c-FOS patterns with highest values after feeding (40) and the cells positive to c-FOS have shown to be oxytocin cells, which are activated due to stomach distention after the food intake (54; 55). However with microdialysis techniques an anticipating peak of noreadrenaline and NPY release were described in this area (56; 57). The lesion of the PVN does not interfere with food entrainment, nor with the display of FAA (45).

Clearly the data obtained to date indicate that signals elicited by feeding schedules can arrive to the brain by at least humoral and neuronal pathways with as consequence that focalized lesions can hardly interfere with or abolish food entrainment. Similarly, c-fos and functional studies indicate that there are several integrative nuclei in the hypothalamus involved in this process, which complicates to indicate a single structure as the main coordinator or generator of food entrained rhythms. Evidently this idea is inspired by the role of the SCN as master clock for circadian rhythmicity but is not necessarily true for the FEO.

Table 2. Brain areas involved with hedonic or motivational responses that have been tested as possible elements for food entrained behavioral patterns by performing lesions in rodents.

	LESIONED AREA	BEHAVIOR MONITORED	EFFECT ON FAA	REFERENCES
MOTIVATION	LIMBIC SYSTEM HIPPOCAMPUS AND AMIGDALA	WHEEL RUNNING AND FOOD-BIN	NO-EFFECT	Mestiberg y Munby 1992 (58)
	NUCLEUS ACCUMBENS	LOCOMOTION	INCREASED (Acc SHELL), DECREASED (Acc-Core)	Mendoza <i>et al.</i> , 2005 (59)
	INFRALIMBIC CORTEX	LOCOMOTION	NO EFFECT	Roca-Barcen <i>et al.</i> , 2005 (61)
	THALAMIC PARAVENTRICULAR NUCLEUS	LOCOMOTION FOOD-BIN	ATTENUATE	Natafajara <i>et al.</i> , 2004 (92)
			NO EFFECT	Landry <i>et al.</i> , 2007 (61)

The data up till now and the studies of systems involved in metabolic balance and ingestive behavior confirm our hypothesis that food entrainment depends on a distributed system probably constituted by a circuit of interacting structures.

Motivational systems involved in food entrainment

When animals are expecting food it can be observed that they are aroused, intensely attentive and active. Rodents exhibit foraging behavior and increased locomotion. Evidently when rodents are anticipating food they undergo a state of arousal and high motivation for food. Some scientists have suggested that during FAA animals may undergo stress, because during the last hours before meal time the stomach is empty and the excitement of the animals may specifically reflect a state of hunger. The increase in corticosterone during FAA may support this idea, we however feel much more for the explanation that the increase in corticosterone is similar to the daily peak in corticosterone seen at the end of the rest period just before onset of activity.

In addition strong positive hedonic reactions can be elicited after meal time, because after a long fasting interval feeding can have a strong rewarding effect.

In order to understand the mechanisms underlying food entrainment, attention has also been given to brain areas involved in motivation, emotion and reward. With the same strategies as described to explore the metabolic drive behind FAA, the role of structures classified as limbic system, as well as the role of the nucleus accumbens in FAA has been explored.

Lesions of diverse areas of the limbic system were performed by Mistlberger et al (58) but FAA was not abolished. Dopamine release in the nucleus accumbens are associated with expectancy and anticipation, as well as with reward states (59), however depletion of dopamine had no effect on the expression of FAA. Also deletion of opioid receptors has been tried, since brain opioids are involved in activating dopamine release (60), however only a slight decrease in the intensity of FAA was observed.

The involvement of limbic structures has been established with the detection of the protein c-FOS. In rats anticipating to a daily meal increased levels have been described in the amygdala, septum, prefrontal cortex, paraventricular nucleus of the thalamus (PVT) and the accumbens (21). However lesions of the PVT do not modify the intensity nor duration of FAA (61).

Especially in order to examine the motivational state of animals in FAA animals were entrained to a palatable treat (chocolate, sweet milk or sucrose). This condition is different from food entrainment since the rats do not need to endure a negative metabolic state (62) and anticipate to a daily treat under fasting conditions or even when having free access to regular food (63; 64; 65). Evidence has pointed out that a high motivational state due to palatable food is sufficient to produce FAA. Interestingly neuronal activity indicated by c-FOS expression is selectively increased in limbic brain structures but not in hypothalamic nuclei involved in energy balance (65). Recent data from our group also have shown that a palatable treat can selectively impose oscillatory cycles of the protein PER1 in limbic areas and in the nucleus accumbens is in phase with time of the treat access (data not published). Those data strongly support that both metabolic and motivational aspects play a role in FAA and that consequently different neuronal systems participate in the expression of food entrained responses and that only by certain manipulations it is possible to observe their expression independently (Figure 2).

The role of clock genes in food entrainment

Circadian oscillations rely on cycles of transcriptional/ translational feedback loops of the so called "clock genes" (66). These cycles have been observed in all investigated organisms and in diverse tissues. In mammals the clock machinery is determined by period (*per1*, *per2* and *per3*), *cryptochrome*, *clock*, *small* and *npas 2*. Oscillations of clock gene products, have been described in diverse brain areas and peripheral organs (67; 25). Their oscillations are normally coupled to the light - dark cycle and are driven by signals transmitted by the SCN. Interestingly, when feeding opportunities are restricted, daily rhythms of clock genes outside the SCN are entrained by

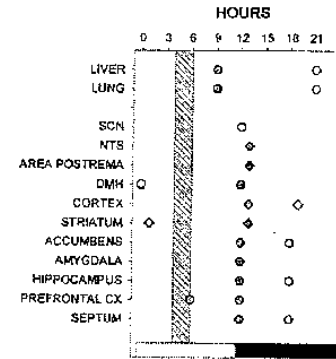


Figure 3. Representation of the moment of the acrophase in the daily expression of the protein PER1 for different tissues and brain areas. The peak expression in *ad libitum* conditions is indicated in white and the acrophase when animals were entrained to feeding schedules is indicated in grey. Circles represent data obtained by measuring protein expression and squares represent the projected phase of the protein obtained from studies that determined the RNA of *per1*. Vertical striped bar represents time of food access and the horizontal white and black bars represent day and night respectively.

feeding schedules and uncouple from the timing signals transmitted by the SCN (Figure 3). Data collected by different groups suggest that feeding restarts daily peripheral oscillations and in the SCN of *per1* and *per2* (21; 24; 68).

Because peripheral organs have the capacity of exhibiting daily oscillations of clock gene products, the possibility that food entrainment relies on the same intracellular machinery as observed in the SCN. In order to do so, mice or rats bearing a mutation or knock out of one element of the clock gene machinery have been food-entrained and evaluated for FAA (Table 3). Some of the mutants have shown delayed or decreased FAA, however in some cases this reduction is linked to modified feeding patterns or to other alterations of circadian rhythm's expression (69; 70).

Food entrained rhythms in diverse species

Food anticipation is not a special capacity of rodents or bees. The need and the capacity to estimate time for feeding is a general feature for most species. As we have indicated above this capacity might be derived evolutionary either

Table 3. Effects of clock gene knock out or mutation on free-running rhythms and on food entrained behavior. Only the lack of the clock gene *per2* has resulted in the abolishment of FAA.

CLOCK GENE MUTANTS	FAA Hypocretinic Food	FAA Regular Food	RHYTHM MS. INFLD.	RHYTHMS INDVD.	REFERENCES
<i>PER1^{fl/fl}</i>	✓	✓	✓	✓	Zheng, 2001 (83), Feilist 2006 (79)
<i>PER1^{h/h}</i> <i>C57BL/6 mice</i>	✓	✓	✓	*	Bae, et al, 2001 (84)
<i>PER1^{sc}</i>	"	"	✓	short period	Spoelstra 2004 (95), Feilist 2006 (79)
<i>PER1^{sc/sc}</i> <i>C57BL/6 mice</i>	✓	"	✓	*	Bae, et al 2001 (84), Zheng, et al 1999 (66), Skeratan, et al 1997 (87)
<i>CRY1</i>	*	Unstable	✓	*	Hijima et al 2005 (98), van der Horst 1999 (86), Vetterli 1999 (100)
<i>CRY2</i>	"	Variable	✓	*	Hijima et al, 2006 (98)
<i>CLOCK</i>	"	✓	✓	*	Delguyre et al 2006 (101)
<i>NPAS2</i>	"	Delay	✓	✓	Dudley, et al 2004 (69)
<i>CRY4</i>	"	✓	✓	short period	Hoban et al, 2007 (102)
<i>Per2</i>	"	✓	✓	✓	Prosser et al, 2006 (103)

because the presence of the feeding source during the day is limited to a certain time or because the individual needs to avoid to be predated. But as is evident from observations, under many different circumstances, in Zoo's, at receptions of human beings, FAA is a wide spread behavior.

Certain species that share the same spatial niche sometimes need to organize their temporal niches in such a way that they are active and forage at different moments of the day in order to avoid competing for the same food source.

In rodents FAA has been mainly observed in rats and mice. Hamsters were studied mainly in the early years, however they imposed certain methodological problems, because they tend to hoard and accumulate food in their pouch (71). In the squirrel monkeys diurnal mammals, strong FAA is observed when food is restricted to a few hours either during the light or during the dark phase (72; 73).

In the lactating rabbit, the female does exhibit a rhythm of 24 h during which she once visits the nest and nurses the pups. Thus, from the day of birth young pups are limited to a single nursing event per day. Consequently pups anticipate these visits with increased behavioral arousal. The anticipatory behavior has as a consequence that the pups free themselves from the nest material which has the advantage allowing them immediate access to the doe's nipples (74). Associated with FAA, rabbit pups show a food entrained rhythm in core temperature and serum corticosterone (75; 76). Similar c-FOS patterns as described for rats and mice have also been observed in rabbit pups (54; 77). Interestingly in contrast with rodents the young rabbit SCN is entrained by the daily feeding schedule induced by the mother (78). This observation may indicate that indeed metabolic information is signaled to the SCN and that in the absence of other important cues (and probably in absence of other complete developed systems) the young rabbit SCN can be entrained to food. Once the rabbits are able to eat material available in the nest, their daily rhythms undergo a transitory stage and entrain to the light - dark cycle. Finally at weaning, they show robust daily rhythms entrained by light and their feeding pattern accommodates to dawn and dusk. This developmental pattern is an interesting model of food entrainment and illustrates that food entrainment may be the initial stage of adaptation for young individuals.

Other species that exhibit FAA are birds (79), fish (80; 81) and crayfish (82). In such species persistence of food entrained rhythms have been observed after releasing them from the restricted feeding schedule.

Also marsupials (83;84) can be entrained by feeding schedules, mainly when the total amount of daily food is decreased to 85% of their daily intake, however for some marsupials the strategies to measure FAA were not adequate for the species and did not allow to conclude the power of feeding schedules.

Contribution of comparative biology for understanding food entrainment

The evidence that bees, fish, mollusks and other species can estimate meal time to develop behavioral and physiological strategies to organize their daily activity indicates that this adaptive process has been well preserved along evolution.

The observation of clock gene oscillations in different peripheral organs and their persistence in culture, isolated from the SCN, demonstrate that many tissues have cellular mechanisms that may respond to 24hour cycles. Furthermore the fact that peripheral clock gene oscillation can be driven by metabolic cues, illustrate how important metabolic parameters can be for the daily resetting of clock mechanisms. Because insects and fish have a very simple nervous system, food entrainment does not seem to need a complicated

neuronal substrate. The fact that FAA implies many different neuronal structures in higher vertebrates only indicates that FAA in those animals is a complex behavior for which a number of different brain structures are necessary to execute these functions. The data on FAA also point to the power of food to drive behavioral and physiological systems, for which the only resistant structure seems to be the SCN in mammals, which remains coupled to the light - dark cycle. The relevance of this resistance can be explained by the fact that in addition to estimating meal time organisms need also to keep track of the external conditions determined by the day - night alternation, which also may determine other opportunities to eat.

The present knowledge on both time keeping systems and their interaction may help to understand human conditions of internal desynchronization in which feeding schedules are shifted towards the night and consequently uncouple daily physiological oscillations from the SCN driven signals. Such is the case of nocturnal workers and of young people who develop a preference for nocturnal activity. A better understanding of both time keeping systems may possibly help to find treatment for diseases of modern life style.

References

- Moore-Ede MC, Sulzman FM, and Fuller CA. 1982: The clocks that time us. Harvard University Press Cambridge Massachusetts, and London, England.
- Richter CP. 1922: A Behavioristic study of the activity of the rat. *Comp Psych monographs*. 1:1-55.
- Bolles RC, and De Lorge J. 1962: The rat's adjustment to a-diurnal feeding cycles. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 55:760-762.
- Bolles RC, and Stokes LW. 1965: Rat's anticipation of diurnal and a-diurnal feeding. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 60(2):290-294.
- Moore RY, and Eichler ME. 1972: Loss of circadian corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Research*. 42:201-206.
- Stephan FK, and Zucker I. 1972: Circadian rhythms in drinking and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 69:1583-1586.
- Krieger DT, Hauser H, and Krey LC. 1977: Suprachiasmatic nuclear lesions do not abolish food-shifted circadian adrenal and temperature rhythmicity. *Science*. 197:398-399.
- Krieger DT, and Herbert H. 1978: Comparison of synchronization of circadian corticosterone rhythms by photoperiod and food. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75:1577-1581.
- Stephan FK, Swann JM, and Sisk CL. 1979: Anticipation of 24-hr feeding schedules in rats with lesions of the suprachiasmatic nucleus. *Behav Neural Biol.* 25(3):346-63.
- Ashoff J, von Gostz C, and Honma KI. 1983: Restricted feeding in rats: effects of varying feeding cycles. *Z. Tierpsychology*. 63: 91-111.

- Boulos Z, Rossenwasser AM, and Terman M. 1980: Feeding schedules and the circadian organization of behavior in the rat. *Behav Brain Res.* 1:39-65.
- Madrid JA, Sanchez Vazquez FJ, Lax P, Matas P, Cuenca EM, and Zamora S. 1998: Feeding behavior and entrainment limits in the circadian system of the rat. *Am J Physiol Reg Integr Comp Physiol.* 275:372-383.
- Mistlberger RE, and Marchant EG. 1995: Computational and entrainment models of circadian food-anticipatory activity: evidence from non-24-hr feeding schedules. *Behav Neurosci.* 109(4):790-798.
- Stephan FK. 1981: Limits of entrainment to periodic feeding in rats with Suprachiasmatic lesions. *J. of Comp. Physiol.* 143: 401-410.
- Coleman GJ, Harper S, Clarke JD, and Armstrong S. 1982: Evidence for a separate meal-associated oscillator in the rat. *Physiol Behav.* 29(1):107-115.
- Stephan FK. 2002: The "other" circadian system: food as a Zeitgeber. *J Biol Rhythms* 17: 284-292.
- Mistlberger RE. 1994: Circadian food-anticipatory activity: formal models and physiological mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev.* 18:171-95.
- Krieger DT. 1980: Ventromedial hypothalamic lesions abolish food-shifted circadian adrenal and temperature rhythmicity. *Endocrinology* 106:649-654.
- Honma S, Honma KI, Nagasaka T, and Hiroshige T. 1987: The ventromedial hypothalamic nucleus is not essential for the prefeeding corticosterone peak in rats under restricted daily feeding. *Physiol and Behav.* 39: 211-215.
- Mistlberger RE and Rechtschaffen A. 1984: Recovery of anticipatory activity to restricted feeding in rats with ventromedial hypothalamic lesions. *Physiol and Behav.* 33: 227-235.
- Angeles-Castellanos M, Mendoza J, and Escobar C. 2007: Restricted feeding schedules phase shift daily rhythms of α -Fos and protein Per1 immunoreactivity in corticolimbic regions in rats. *Neuroscience.* 144:344-355.
- Hara R, Wan K, Wakamatsu H, Aida R, Morita T, Akiyama M, and Shibata S. 2001: Restricted feeding entrains liver clock without participation of the suprachiasmatic nucleus. *Genes to cells.* 6: 269-278.
- Lamont EW, Robinson B, Stewart J, and Amir S. 2005: The central and basolateral nuclei of the amygdala exhibit opposite diurnal rhythms of expression of the clock protein Period2. *Proc Natl Acad Sci.* 102:4180-4184.
- Damiola F, Le Minh N, Preitner N, Kottmann B, Fleury-Olefa F, and Schibler U. 2000: Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev* 14:2950-2961.
- Stokkan KA, Yamazaki S, Tei H, Sakaki Y, and Menaker M. 2001: Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science.* 291: 490- 493.
- Mendoza JY. 2007: Circadian clocks: setting time by food. *J Neuroendocrinol.* 19(2):127-137.
- Gooley JJ, Schomer A, and Saper CB. 2006: The dorsomedial hypothalamic nucleus is critical for the expression of food-entrainable circadian rhythms. *Nat Neurosci.* 9(3):398-407.
- Mieda M, Williams SC, Richardson JA, Tanaka K, and Yanagisawa M. (2006): The dorsomedial hypothalamic nucleus as a putative food-entrainable circadian pacemaker. *PNAS.* 103(32):12150-12155.

29. Martínez-Merlos MT, Ángeles-Castellanos M, Díaz-Muñoz M, Aguilar-Roblero R, Mendoza J, and Escobar C. 2004: Dissociation between adipose tissue signals, behavior and the food-entrained oscillator. *J Endocrinol.* 181(1):53-63.
30. Escobar C, Díaz-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.
31. Díaz-Muñoz M, Vázquez O, Aguilar-Roblero R, and Escobar C. 2000: Anticipatory changes in liver metabolism, entrainment of insulin, glucagon and corticosterone in food restricted rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 279: R2048-R2056.
32. Honma K, Honma S, and Hiroshige T. 1984: Feeding-associated corticosterone peak in rats under various feeding cycles. *Am J Physiol.* 246: R721-R726.
33. Krieger DT. 1979: Regulation of circadian periodicity of plasma corticosteroid concentrations and of body temperature by time of food presentation. In *Biological Rhythms and Their Central Mechanisms*, M Suda, O Hayashi and H Nakagawa, eds, pp 247-259, Elsevier/North-Holland Biomedical Press Amsterdam, New York, Oxford.
34. Bález-Ruiz A, Escobar C, Aguilar-Roblero R, Vázquez-Martínez O, and Díaz-Muñoz M. 2005: Metabolic adaptations of liver mitochondria during restricted feeding schedules. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 289(6):1015-1023.
35. Davidson AJ, Poole AS, Yamazaki S, and Menaker M. 2003: Is the food-entrainable circadian oscillator in the digestive system?. *Genes Brain Behav.* 2: 32-39.
36. Davidson AJ. 2006: Search for the feeding-entrainable circadian oscillator: a complex proposition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 290(6):R1524-R1526.
37. Carlotta C, La Fleur SE, Van Heijningen C, Worrel J, Kalsbeek A, Feenstra M, Pevet P, and Buijs RM. 2005: The suprachiasmatic nucleus controls the daily variation of plasma glucose via the autonomic output to the liver: are the clock genes involved? *Eur J Neurosci.* 22:2531-2540.
38. Comperatore CA, and Stephan FK. 1990: Effects of vagotomy on entrainment of activity rhythms to food access. *Physiol Behav.* 47:671-678.
39. Davidson AJ, and Stephan FK. 1998: Circadian food anticipation persist in capsaicin deafferented rats. *J Biol Rhythms* 13: 422-429.
40. Ángeles-Castellanos M, Aguilar-Roblero R, and Escobar C. 2004: c-Fos expression in hypothalamic nuclei of food-entrained rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 286(1):R158-65.
41. Davidson AJ, Cappendijk SL, and 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.
42. Davidson AJ, Aragona BJ, Houpt AT, and Stephan FK. 2001: Persistence on meal-entrained circadian rhythms following area postrema lesions in the rat. *Physiol & Behav.* 74:349-354.
43. Inouye ST. 1982: Ventromedial hypothalamic lesions eliminate anticipatory activities of restricted daily feeding schedules in the rat. *Brain Res.* 250: 183-187.
44. Kurumiya S, and Kawamura H. 1991: Damped oscillation of the lateral hypothalamic multineuronal activity synchronized to daily feeding schedule in rats with suprachiasmatic nucleus lesions. *J Biol Rhythms* 6: 115-127.
45. Mistlberger RE, and Rusak B. 1988: Food anticipatory circadian rhythms in rats with paraventricular and lateral hypothalamic lesions. *J Biol Rhythms.* 3:277-291.
46. Bernhoud HR. 2002: Multiple neural system controlling food intake and body weight. *Neurosci Biobehav Rev.* 26:393-428.
47. Saper CB, Scammell TE, and Lu J. 2005: Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature Rev.* 437:1257-1263.
48. Akiyama M, Yuasa T, Hayasaka N, Horikawa K, Sakurai T, and Shibata S. 2004: Reduced food anticipatory activity in genetically orexin (hypocretin) neuroablated mice. *Eur J Neurosci.* 20: 3054-3062.
49. Mistlberger RE, Antle MC, Kilduff TS, and Jones M. 2003: Food- and light-entrained circadian rhythms in rats with hypocretin-2- saporin ablation in the lateral hypothalamus. *Brain Research.* 980: 161-168.
50. Verwey M, Khoja Z, Stewart J, and Amir S. 2007: Differential regulation of the expression of period2 protein in the limbic forebrain and dorsomedial hypothalamus by daily limited access to highly palatable food in food-deprived and free-fed rats. *Neuroscience.* May 31; [Epub ahead of print].
51. Landry GJ, Simon MM, Webb IC, and Mistlberger RE. 2006: Persistence of a behavioral food-anticipatory circadian rhythm following dorsomedial hypothalamic ablation in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 290(6): R1527-34.
52. Mistlberger RE, and Antle MC. 1999: Neonatal monosodium glutamate alters circadian organization of feeding food anticipatory activity and photic masking in the rat. *Brain Res.* 842:73-83.
53. Buijs RM, and Kalsbeek A. 2001: Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nat Rev Neurosci.* 2:521-526.
54. Caba M, Rovirosa MJ, and Silver R. 2003: Suckling and genital stroking induces Fos expression in hypothalamic oxitocigenic neurons of rabbit pups. *Dev Biol Res.* 143: 119-128.
55. Nelson EE, Alberts JR, Tian Y, and Verbalis JG. 1998: Oxytocin is elevated in plasma of 10-day-old rats following gastric distension. *Brain Res Dev Res.* 111(2):301-3.
56. Mitome M, Honma S, Yoshihara T, and Honma KI. 1994: Prefeeding increase in paraventricular NE release is regulated by a feeding-associated rhythm in rats. *Am J Physiol. Endocrinol Metabol.* 266: E606-E611.
57. Yoshihara T, Honma H, and Honma KI. 1996: Effects of restricted daily feeding on neuropeptide Y release in the rat paraventricular nucleus. *Am J Physiol.* 270:E589-E595.
58. Mistlberger RE, and Mumbly DG. 1992: The limbic system and food-anticipatory circadian rhythms in the rat: ablation and dopamine blocking studies. *Behav. Brain Research.* 47:159-168.
59. Fields HL, Hjelmstad GO, Margolis EB, and Nicola SM. 2007: Ventral Tegmental Area Neurons in Learned Appetitive Behavior and Positive Reinforcement. *Annu Rev Neurosci.* [Epub ahead of print].