



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO  
NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

“MODULACIÓN DE LA D-GLUCOSA DE LOS DISTINTOS TIPOS  
NEURONALES DEL NÚCLEO ACCUMBENS”

TESIS

Que presenta

ING. CLAUDIA IBETH PÉREZ DÍAZ

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE FARMACOLOGÍA

Director de Tesis:

Dr. Ranier Gutiérrez

México, D.F.

Diciembre 2012

Este trabajo se llevo a cabo en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Departamento de Farmacología, en el Laboratorio de Neurobiología del Apetito bajo la dirección del Dr. Ranier Gutiérrez; mediante el apoyo de CONACYT a través de la beca con No. de Registro: 253345 para CIPD y con el apoyo del CONACYT donativo 179484, Salud2010-02-151001, ICYTDF-PICSA12-126, y Productos Medix 000652.

*A mi madre...*

Por tu amor y apoyo incondicional, por creer en mí y siempre impulsarme en ser una mejor persona... simplemente eres la mejor madre de este mundo

*A mi hermano...*

Su esposa y mis sobrinos, por apoyarme en dar este paso y aceptarme en su dulce hogar, sin ustedes hubiera sido más difícil

*A mi esposo...*

Por formar parte de mi vida, por todo lo que he aprendido de tí y apoyarme siempre...

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Ranier Gutiérrez...

Por aceptarme en su laboratorio, por dirigirme y regalarme un pedacito de su inmenso conocimiento.

A los asesores de tesis...

Dr. Benjamin Floran y Dr. Alberto Olivares, por el apoyo y las sugerencias brindadas a lo largo de este proyecto.

A los hermanos del laboratorio...

Mario, Jessy, Miguel, Dayis, Kalyan, Luis, Andrei, Alvaro, especialmente a Isaac!!!

# ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL .....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
RESUMEN.....	8
ABSTRACT .....	10
1. INTRODUCCIÓN.....	11
2. ANTECEDENTES.....	13
2.1. Glucosa como señal control para su homeostasis .....	13
2.2. Relación entre niveles de glucosa periférica y glucosa central .....	16
2.3. Neuronas que monitorean glucosa .....	18
2.3.1. Neuronas que se activan a glucosa (GE).....	18
2.3.2. Neuronas que se inhiben a glucosa (GI).....	19
2.3.3. Mecanismos moleculares de las neuronas que monitorean glucosa. 20	
2.3.4. Función de las neuronas que monitorean glucosa.....	23
3. HIPÓTESIS .....	36
4. OBJETIVOS .....	36
4.1. Objetivo general .....	36
4.2. Objetivos específicos.....	36
5. MÉTODOS .....	37
5.1. Animales.....	37
5.2. Técnicas microquirúrgicas. ....	37
5.2.1. Implantación de catéter intragástrica. ....	37
5.2.2. Implantación de catéter en arteria carótida. ....	38
5.2.3. Implantación de microarreglo de 16 electrodos.....	40
5.3. Protocolo experimental .....	41
5.4. Registro neuronal .....	42
5.5. Análisis de datos .....	43

5.5.1.	Hipnograma .....	43
5.5.2.	Neuronas relacionadas con la alimentación. ....	43
5.5.3.	Neuronas relacionadas con el sueño. ....	44
5.5.4.	Clasificación neuronal .....	44
5.6.	Histología .....	46
6.	RESULTADOS .....	48
6.1.	Mediciones de glucosa durante la ingesta de Ensure .....	48
6.2.	Mediciones glicémicas durante la ingesta de ensure e inyecciones de glucosa al 20% y 50% .....	49
6.3.	Implantación de catéteres y electrodo .....	50
6.4.	Actividad neuronal durante los estados de sueño e ingesta.....	51
6.5.	Correlación entre los niveles periféricos de glucosa con la actividad neuronal.....	51
6.6.	Identificación del tipo celular de la neurona mostrada en la Figura 24a 53	
6.7.	Ejemplo de una pFSI cuya actividad correlaciona con el ciclo vigilia-sueño pero no con los niveles periféricos de glucosa.....	55
6.8.	Ejemplo de una pChAT cuya actividad correlaciona con el periodo de ingesta pero no con los niveles periféricos de glucosa. ....	57
6.9.	Correlación de niveles de glucosa con la actividad de toda la población neuronal registrada .....	59
7.	DISCUSIÓN.....	63
8.	CONCLUSIÓN.....	67
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	68

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Múltiples eventos generados por una absorción de glucosa.....	14
Figura 2 Metabolismo y regulación de glucosa .....	15
Figura 3 Niveles de glucosa extracelular en cerebro y a nivel plasmático.....	16
Figura 4 Neurona que se activa a glucosa.....	19
Figura 5 Neurona que se inhibe a glucosa. ....	20
Figura 6 Mecanismos moleculares que detectan glucosa en el cerebro (astrocitos y neuronas).....	22
Figura 7 Anatomía del estriado .....	24
Figura 8 Clasificación anatómica de neuronas identificadas en estriado. ....	26
Figura 9 Diagrama de clasificación neuronal según Yarom and Cohen. ....	27
Figura 10 Clasificación electrofisiológica neuronal en estriado ventral.....	29
Figura 11 Interconexiones del NAc shell hacia otras zonas del cerebro.....	30
Figura 12 Actividad neuronal del NAc durante estimulación eléctrica.....	31
Figura 13 Neuronas registradas en NAc que se inactivan (A) y se activan (B) durante la ingesta de Ensure. ....	32
Figura 14 Ejemplo de una neurona en NAcS modulada por ambos estados: SWS y lengüeteo.....	34
Figura 15 Implantación del catéter intragástrico .....	38
Figura 16 Implantación del catéter en arteria carótida.....	40
Figura 17 Implantación del microarreglo de 16 electrodos.....	41
Figura 18 Protocolo experimental.....	42
Figura 19 Parámetros para la identificación neuronal en NAc.....	45
Figura 20 patrones de disparos neuronales. ....	46
Figura 21 Corte coronal del cerebro de rata que indica la localización del microarreglo de 16 electrodos.....	47
Figura 22 Niveles de glucosa periféricos inducidos por una ingesta de ensure. .....	48
Figura 23 Medición de glucosa durante una sesión experimental. ....	49
Figura 24 Actividad neuronal de una MSN putativa. ....	54
Figura 25 Actividad neuronal de una FSI putativa, .....	56
Figura 26 Actividad neuronal de una ChAT putativa. ....	58
Figura 27. Ejemplo representativo de una neurona de NAc shell que es inactivada durante la ingesta de ensure.....	61
Figura 28 Neurona inactivada de NAc shell que se modula durante el sueño. .....	62

## RESUMEN

En el cerebro se encuentran neuronas que son activadas por un gran número de estímulos externos, dentro de esas neuronas existe una red neuronal llamada neuronas que monitorean glucosa (“Glucose-monitoring neurons”). La detección de los distintos niveles de glucosa periférica es quizá una de las funciones más importantes para el cerebro, ya que la glucosa es la única y casi exclusiva fuente de energía. Por lo que su detección esta mediada por una red neuronal bastante amplia la cual está especializada en detectar los niveles de glucosa extracelular de manera que ante la presencia de ésta, modulan su frecuencia de disparo; haciendo que se incremente su frecuencia de disparo “Glucose-excited neurons (GE)” o disminuya “Glucose-inhibited neurons(GI).” De igual forma se ha reportado que algunas neuronas del núcleo accumbens (en su parte Shell y Core) son neuronas GE o GI. Por otra parte, se han identificado neuronas que son moduladas durante la ingesta de alimento líquido (Ensure®). Sin embargo, se desconoce si las neuronas moduladas durante la ingesta de comida son las mismas que se modulan con los distintos niveles de glucosa. Para contestar esa pregunta, en esta tesis decidí realizar registros mutielectrodo del NAcS e infundir a través de una sonda intragástrica diferentes concentraciones de D-glucosa o durante el consumo de 10 mL de Ensure, al mismo tiempo se realizaron diversas mediciones de glucosa en sangre de la carótida durante puntos clave del experimento. Todo esto con la finalidad de correlacionar los niveles periféricos de glucosa (en ausencia de alimento y con alimento) con la actividad eléctrica de los distintos tipos neuronales del NAcS. Nuestros resultados demostraron, contrario a nuestras expectativas, que las neuronas del NAcS no son capaces de censar los niveles periféricos de glucosa y por lo tanto, no modularon su frecuencia de disparo en función de los distintos niveles de glucosa periférica inducidos por comer ensure o por las distintas inyecciones de D-glucosa, pero como era de esperarse si se observó que se activaban e inactivaban durante la ingesta de ensure y/o durante las transiciones de vigilia-sueño. También encontré que las neuronas putativas espinosas de tamaño medio (pMSN), las interneuronas putativas de disparo rápido (pFSI) y las interneuronas putativas de acetiltransferasa (pChATs) mostraron

modulación ante las transiciones de sueño como de ingesta de ensure. Sin embargo, su frecuencia de disparo no fue modulada por los distintos niveles de glucosa periférica causados por comer Ensure. Por lo tanto concluimos que la inhibición neuronal observada en el NAc durante la conducta de ingesta no se puede atribuir a los cambios en glucosa periférica inducidos por comer.

## ABSTRACT

The brain contains neurons that are modulated by different sensory stimuli, however they also respond to different levels of peripheral sucrose, these neurons are named glucose-monitoring neurons. Detection of glucose is perhaps the most vital function of the brain since it is the only source of energy of the brain. Thus the glucose detection is mediated by a large neural circuit that is specialized in detecting extracellular glucose levels so they respond to the presence of glucose by modulating their firing rate, either by increasing it, called "Glucose-excited neurons (GE)" whereas others are inhibited by glucose so they are named "glucose-inhibited neurons (GI)." It has been reported that neurons in the nucleus accumbens (in both Shell and Core subregions) contains both GE and GI neurons. On the other hand we have recently identified neurons that are modulated during liquid intake of Ensure® chocolate flavor. However, it is unknown whether the neurons that are modulated during food intake are the same that are tracking changes in glucose levels. To address this question we perform multichannel recordings of ensembles of neurons in the NAc shell while freely moving animals received intragastric infusions of different concentrations of D-glucose and when they feed themselves with 10 mL of Ensure. Throughout the session we also measured the glucose levels from blood samples from the carotid artery. We found that neurons in the nucleus accumbens shell were unable to sense peripheral glucose levels induced by drinking Ensure. Nevertheless, we observed that a large proportion of NAc neurons were indeed activated and inactivated during Ensure intake and / or sleep transitions. We found that putative medium spiny neurons (pMSN), putative fast spiking interneurons (pFSI) and choline putative acetyltransferase interneurons (pChATs) showed modulation by transitions to sleep and ensure intake but again none of the interneurons or putative MSNs seems to be modulated by physiological variations on glucose levels produced by drinking Ensure. Thus we conclude that neuronal inhibition in the NAc Shell observed during feeding behavior is not evoked by increasing peripheral glucose levels.

## 1. INTRODUCCIÓN

Una de las funciones fisiológicas más importantes para el cerebro es la regulación de la homeostasis energética (Routh, 2002) De tal forma que la detección de los cambios en los niveles de glucosa periféricos constituye el primer paso para mantener esta homeostasis. Para mantener esta homeostasis existen neuronas que se activan y otras que se inhiben ante la presencia de distintos niveles de glucosa extracelular. Se piensa que la regulación energética involucra un circuito neuronal distribuido que incluye una amplia gama de regiones del cerebro, entre ellas se encuentra principalmente al hipotálamo, amígdala, tallo cerebral y núcleo accumbens (Burdakov, Luckman, & Verkhatsky, 2005). Adicionalmente todas estas regiones son importantes en la regulación de la ingesta de alimento y del peso corporal.

El principal interés para este proyecto es el núcleo accumbens (NAc), ya que es una estructura del sistema límbico y del sistema de recompensa involucrada en la regulación de conductas relacionadas con la motivación para obtener una meta, así como en la regulación de la alimentación (Zoltan Karadi & Robert Egyed<sup>1</sup>, 2004). La participación del NAc en la alimentación se debe en gran medida a que en su parte Shell, posee proyecciones recíprocas al hipotálamo lateral (HL), esta última está involucrada en la regulación del sueño, el metabolismo y la alimentación (Kelley & Swanson, 1997). Estudios farmacológicos indican que la inhibición farmacológica del NAc shell (la cual manda proyecciones GABAérgicas al HL y por lo tanto podría desinhibir y activar al HL) promueve que un animal saciado coma de más (Kelley, Baldo, & Pratt, 2005; Stratford & Kelley, 1997). Otra función muy importante de las neuronas de NAc es que también modulan su

actividad durante el sueño, un porcentaje de estas es activada, pero la mayoría de ellas se inactivan durante el sueño, así como también durante la ingesta de alimento (Ensure®, sabor chocolate), el cual es un producto que posee una gama amplia de nutrientes, principalmente carbohidratos, los cuales se descomponen mayoritariamente en glucosa. Ya que el Ensure es un alimento muy complejo cabe la posibilidad de que las neuronas que se modulan durante la alimentación estén respondiendo a un incremento de glucosa periférico inducido por el consumo de Ensure y no a la conducta de ingesta *per se* (Tellez, Perez, Simon, & Gutierrez, 2012). Para retar esta hipótesis, en esta tesis lleve a cabo un experimento con el fin de evaluar si la modulación de la actividad neuronal del núcleo accumbens shell observada durante el consumo de Ensure®, se debe al incremento de glucosa periférica. Para este fin realizamos registros multielectrodo para medir los potenciales de acción extracelular de ensambles neuronales (conformados por los 3 principales tipos neuronales del NAc: pMSN, pFSI, pChAT, ver más adelante por definiciones) en animales en libre movimiento que recibieron distintas inyecciones intragástricas de glucosa y que posteriormente se alimentaron con 10 mL de Ensure. Nosotros encontramos que las neuronas del NAc Shell efectivamente son moduladas durante la alimentación y sueño de ondas lentas (SWS) (Tellez et al., 2012), sin embargo y para las dosis que administramos, nuestros resultados indican que las neuronas del NAc no detectan cambios de glucosa periférica a niveles fisiológicos. Por lo tanto concluimos que las neuronas del núcleo accumbens shell no están encargadas, o no parece que jueguen un papel determinante en la homeostasis glicémica a nivel sistémico inducidas por la alimentación, pero si forma parte del circuito de alimentación, vía hipotálamo lateral y por circuitos de sueño-vigilia.

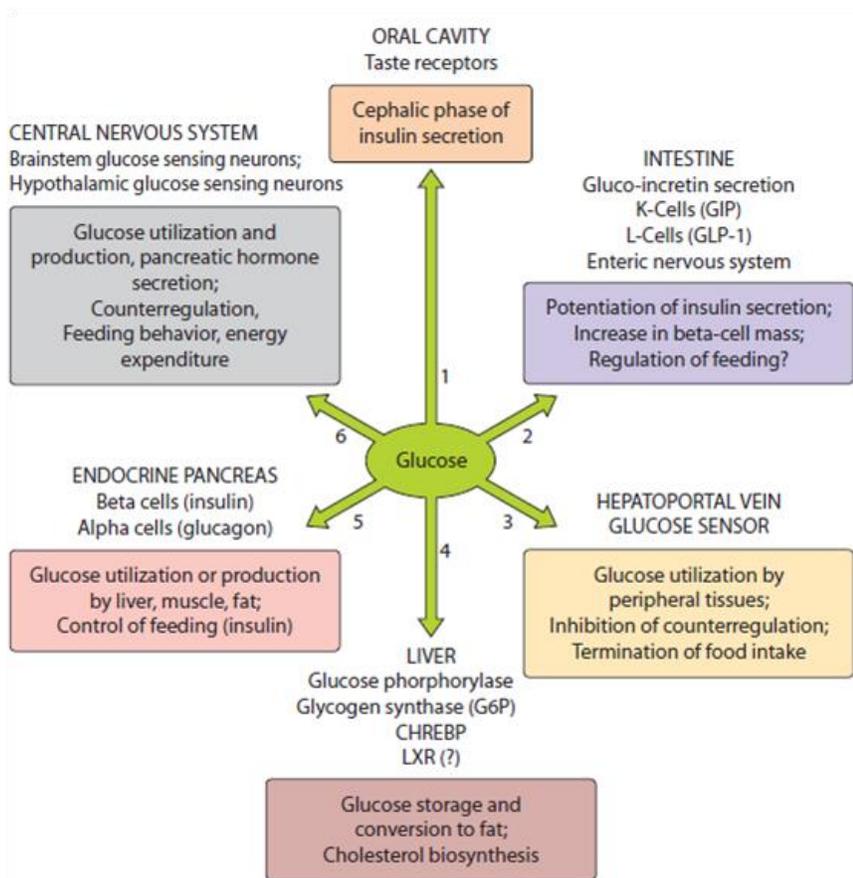
## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. Glucosa como señal control para su homeostasis**

La glucosa es una señal regulatoria muy importante para el organismo, ya que controla la secreción de hormonas de varias células endocrinas y activa neuronas en el sistema nervioso central y periférico(Levin, 2002). Como se puede observar en la Figura 1, la primera fase de absorción de la glucosa ocurre en la boca, activando receptores al sabor,T1R2-T1R3,(Chandrashekar, Hoon, Ryba, & Zuker, 2006) los cuales estimulan la secreción de insulina, pasa a intestino y desencadena la liberación de incretinas como GIP (Polipéptido insulínico dependiente de glucosa) y GLP-1 (Péptido-1 parecido al glucagón) a partir de células K y L, respectivamente (Figura 1; ver paso 2)(Deacon, 2005). La entrada de glucosa en la vena hepato-portal activa sensores que están unidos a nervios aferentes que proyectan al tallo cerebral y al hipotálamo. En hígado permite el almacenamiento de glucógeno; esto desencadena un incremento de glucosa en sangre que a su vez facilita la secreción de insulina y la supresión de glucagón. A nivel de sistema nervioso central, la glucosa regula a neuronas sensibles a ella, ubicadas en mayor proporción en tallo cerebral y en el núcleo arcuato del hipotálamo, ya que ambas regiones contienen una barrera hematoencefálica fenestrada y por tanto son los principales centros de interacción directa entre la periferia y el SNC (Marty, Dallaporta, & Thorens, 2007).

La detección de una hipo e hiperglicemia constituye el primer paso para la homeostasis glicémica, seguido de una secuencia de reacciones que regresan a los niveles plasmáticos glicémicos normales (5-8 mM) (Guillod-Maximin, Lorsignol, Alquier, & Penicaud, 2004). De hecho, una

hipoglicemia plasmática puede causar una disminución de los niveles glicémicos en cerebro de 0.2-0.5 mM (Karnani & Burdakov, 2011). Esto genera una respuesta contrarregulatoria, donde la secreción de glucagón (por parte de las células  $\alpha$  del páncreas), catecolaminas y la producción de glucosa en hígado son estimuladas a través de nervios simpáticos, aunque también la hipoglicemia induce que el sujeto se alimente de forma voraz (Marty et al., 2007).

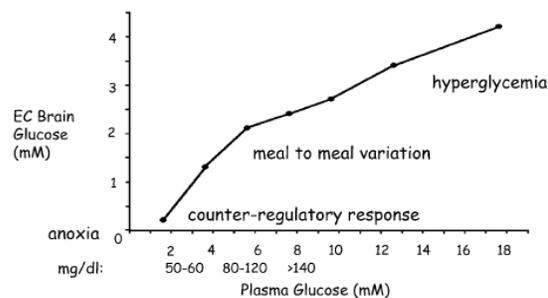


**Figura 1 Múltiples eventos generados por una absorción de glucosa.** Desde la activación de receptores al sabor hasta llegar al sistema nervioso central (1-6). GIP: Polipéptido insulínico dependiente de glucosa; GLP-1: Péptido-1 parecido al glucagón; CHREBP: Carbohidrato responsable de la unión proteica el cual se transloca al núcleo y activa la expresión de genes involucrado en la glucólisis y síntesis de ácidos grasos; LXR: Receptor nuclear activado por la glucosa para la síntesis de colesterol (Marty et al., 2007)



## 2.2. Relación entre niveles de glucosa periférica y glucosa central

A pesar de las limitaciones que implican los métodos para medir glucosa extracelular en el cerebro, se ha demostrado que los niveles de glucosa en varias regiones del cerebro son más bajas en comparación que los niveles plasmáticos (Karnani & Burdakov, 2011) (Routh, 2002). Los niveles glicémicos a nivel periférico oscilan entre 5-8 mM, lo cual es correspondiente a 1-2.5 mM en cerebro (Figura 3). Esto es comparable con estudios en donde se midió la glucosa por medio de microdiálisis, dando valores entre 0.7-1.2 mM en el cerebro, mientras que a nivel plasmático fue de 5 mM (McNay & Gold, 1999). Cuando los niveles plasmáticos caen de 2-3 mM durante una hipoglicemia, e.g., inducida por un inyección de una unidad de insulina, se ha demostrado que los niveles en el cerebro caen alrededor de 0.5 mM. Ya que la glucosa plasmática posterior a la ingesta de alimentos, oscila entre 15-17 mM, es de esperarse que el cerebro alcance valores cercanos al 4 mM (ver Figura 3) (Routh, 2002).



**Figura 3 Niveles de glucosa extracelular en cerebro y a nivel plasmático.** Se muestran los niveles glicémicos alrededor de 2-3 mM corresponden a la iniciación de una respuesta contrarregulatoria. Entre 5-8 mM de glucosa en plasma se observa durante lapsos de comida-comida. Valores mayores a 8 mM de glucosa plasmática, es indicativo de hiperglicemia (Routh 2002)

Sin embargo, estudios de microdiálisis han demostrado que los niveles de glucosa no son homogéneos en diferentes partes del cerebro (McNay, McCarty, & Gold, 2001; Routh, 2010). Por ejemplo, McNay (2001) demostró que en la zona de hipocampo de ratas adultas Sprague-Dawley y bajo condiciones basales en estado despierto los niveles de glucosa era de ~1 mM, mientras que en zona del estriado, se observaron valores de 0.7 mM, cuando los niveles plasmáticos fueron ~5 mM. Por otra parte, durante la realización de pruebas de memoria espacial en ratas adultas Spague-Dawley, los niveles glicémicos en hipocampo disminuyeron al 32% con respecto a los estados basales, mientras que en zonas del estriado, los niveles no se vieron afectados. Interesantemente cuando se inyectó glucosa (250 mg/Kg i.p.) a nivel sistémico, no se vio afectado los niveles glicémicos tanto en el hipocampo como en estriado, durante el rendimiento de la prueba. Esto indica una disociación entre el cerebro y los niveles plasmáticos de glucosa en regiones específicas del cerebro, así mismo sugiere que en distintas regiones del cerebro existe la capacidad de mantener niveles estables de glucosa independientemente de los niveles periféricos de glucosa (McNay, Fries, & Gold, 2000; McNay & Gold, 1999; McNay et al., 2001).

Por otro lado, muchos estudios han demostrado que la inyección de glucosa intracarótida a concentraciones (9 mg/kg) que no modifican la glicemia periférica, inducen activación de *c-fos* en hipotálamo, en el núcleo arcuato y genera una rápida secreción de insulina, indicando que esta área del cerebro censa y regula la homeostasis de glucosa, independientemente de sensores periféricos (Guillod-Maximin et al., 2004). También indican que con una vagotomía se previene esta regulación, confirmándose que el páncreas controla ambos sistemas: central y autónomo (Atef, Ktorza, & Penicaud, 1995).

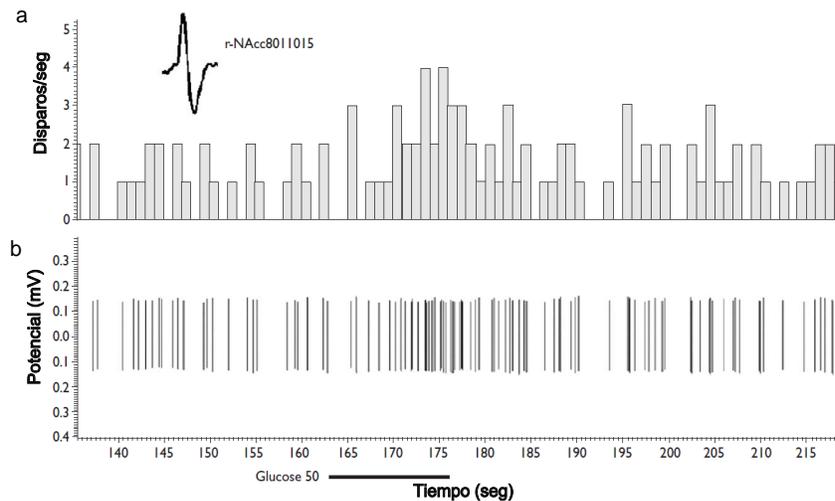
En otros estudios publicados se ha encontrado que inyecciones intravenosas de glucosa modifica la actividad eléctrica de algunas neuronas localizadas en el Hipotálamo Ventromedial (VMH) y en HL. Mediante registros de patch-clamp se han identificado neuronas que son sensibles a glucosa, las cuales modifican su actividad neuronal ante la presencia de glucosa extracelular, incluyendo Núcleo Arcuato (ARC) e VMH. Todos estos resultados indican que existen ensamblajes neuronales que se encargan de censar los niveles periféricos y que son modulados ante estas variaciones (Deacon, 2005; Karnani & Burdakov, 2011; Marty et al., 2007; Routh, 2002).

### **2.3. Neuronas que monitorean glucosa**

Las neuronas que monitorean glucosa se han definido como aquellas que alteran su frecuencia de disparo en respuesta a cambios de glucosa extracelular a niveles hipo o hiperglicémicos y por tanto no fisiológicos (Karadi et al., 1995; Marty et al., 2007; Routh, 2002; Shimizu, Oomura, Novin, Grijalva, & Cooper, 1983; Zoltan Karadi & Robert Egyed1, 2004), y existen dos categorías: neuronas que se activan a glucosa y neuronas que se inactivan a glucosa.

#### **2.3.1. Neuronas que se activan a glucosa (GE)**

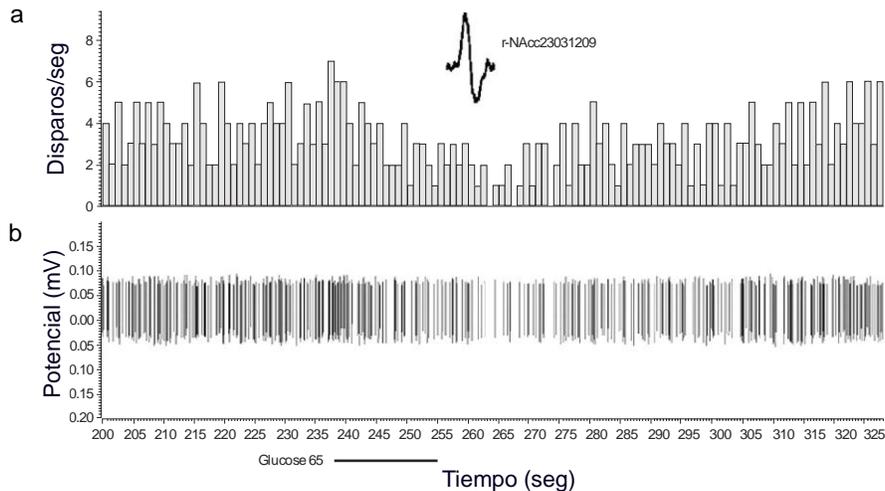
Este tipo neuronal incrementa su frecuencia de disparo ante la presencia de glucosa extracelular (Figura 4 ). Se han identificado en ARC, núcleo ventromedial (VMN), núcleo paraventricular (PVN), y NAc (Dunn-Meynell, Rawson, & Levin, 1998; Hall, Hoffmaster, Stern, Harrington, & Bickar, 1997; Papp, Lukats, Takacs, Szalay, & Karadi, 2007; Routh, 2010; Wang et al., 2004).



**Figura 4 Neurona que se activa a glucosa.** En el eje de las ordenadas se grafica los disparos/s (panel *a*) y el potencial en mV (panel *b*) contra el tiempo (seg) de la actividad neuronal. Se observa la frecuencia de disparo en estado basal y al momento de inyectar 0.5 M de glucosa directamente en NAc (mostrado en el eje de las abscisas en línea horizontal). En el cuadro superior, la forma del potencial de acción de esa misma neurona (Papp, Lukats et al. 2007).

### 2.3.2. Neuronas que se inhiben a glucosa (GI)

Las neuronas GI se caracterizan porque disminuyen su frecuencia de disparo ante un incremento de glucosa extracelular [5-20 mM] (Figura 5; *Error! No se encuentra el origen de la referencia.*). Han sido identificadas en LH, PVN, núcleo del tracto solitario (NTS) y NAc (Marty et al., 2007; Papp et al., 2007; Silver & Erecinska, 1998a).



**Figura 5 Neurona que se inhibe a glucosa.** En el panel *a* se observa los disparos/seg y el panel *b* el potencial de acción (mV) contra el tiempo (seg) de la actividad neuronal. Se observa la frecuencia de disparo en estado basal y al momento de inyectar 0.5 M de glucosa en NAc (mostrado en línea horizontal paralelo al eje *y*). En el cuadro superior, la forma del potencial de acción de esa misma neurona (Papp et al., 2007)

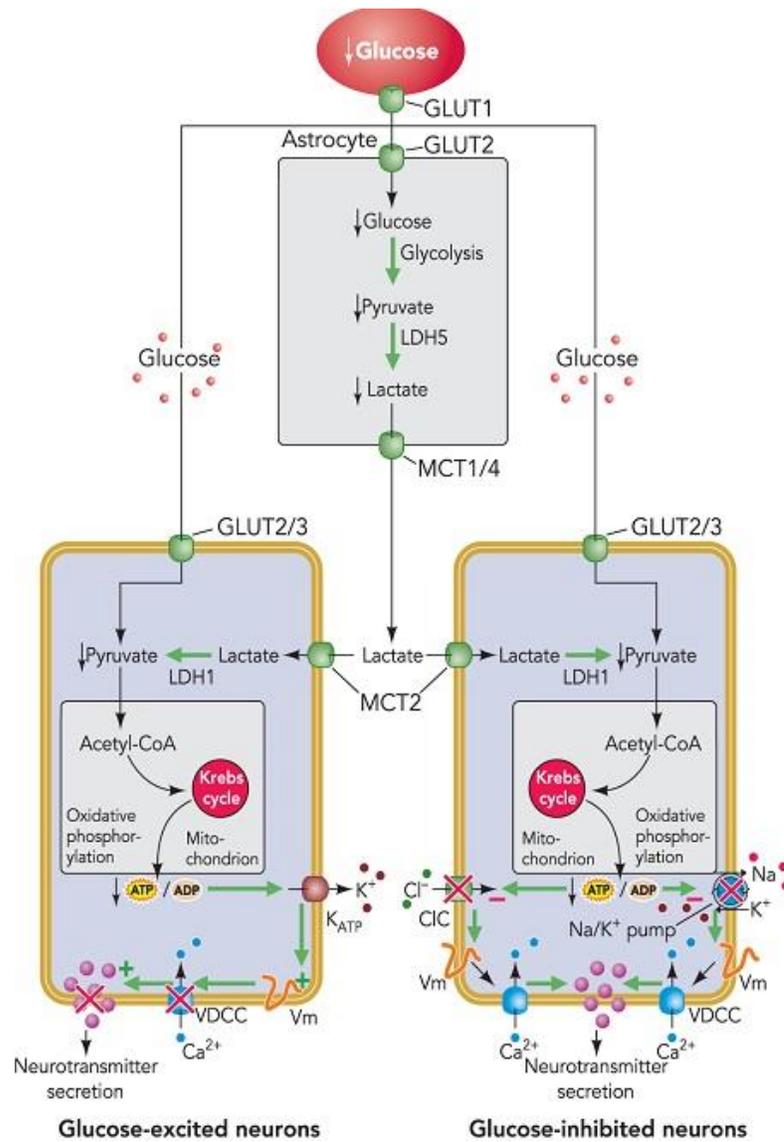
### 2.3.3. Mecanismos moleculares de las neuronas que monitorean glucosa.

Existe evidencia que los mecanismos que detectan la glucosa en el sistema nervioso central son similares a las células beta del páncreas (Schuit, Huypens, Heimberg, & Pipeleers, 2001; Yang, Kow, Funabashi, & Mobbs, 1999). Como ya se ha mencionado, las neuronas GE incrementan su frecuencia de disparo ante un incremento de glucosa extracelular. La presencia de GLUT2 en el núcleo hipotalámico (Kang, Routh, Kuzhikandathil, Gaspers, & Levin, 2004), donde se han identificado neuronas que monitorean glucosa, así como también la presencia de glucocinasa, la cual indica el inicio de la degradación de glucosa (glucólisis)(Yang, Kow, Pfaff, & Mobbs, 2004)

En las neuronas GE, el aumento de glucosa extracelular permite el incremento de la razón ATP/ADP dentro de la neurona y por

consiguiente el cierre de los canales  $K_{ATP}$ , lo cual permite la despolarización de la membrana y la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los canales dependientes de voltaje, desencadenando un incremento en la actividad neuronal y la liberación de un neurotransmisor (Amoroso, Schmidantomarchi, Fosset, & Lazdunski, 1990; Marty et al., 2007) .

En el caso de las neuronas GI, el mecanismo por el cual disminuyen su frecuencia de disparo, es un poco confuso. Una idea hipotética es que existe un incremento en la razón ATP/ADP, lo cual permitiría un incremento en la actividad de la bomba  $Na^+-K^+-ATPasa$  y la apertura de canales de  $Cl^-$ , los cuales hiperpolarizan la membrana plasmática, bloqueando la salida de un neurotransmisor (Marty et al., 2007; Oomura, Ooyama, Sugimori, Nakamura, & Yamada, 1974; Silver & Erecinska, 1998b) (Figura 6)



**Figura 6 Mecanismos moleculares que detectan glucosa en el cerebro (astrocitos y neuronas).** En el panel izquierdo se ilustra el mecanismo de una neurona GE. En el panel derecho el posible mecanismo de una neurona GI. MCT1/4 y MCT2: transportadores monocarboxilados.  $V_m$ : potencial de membrana (Marty et al., 2007)

#### **2.3.4. Función de las neuronas que monitorean glucosa**

La determinación exacta del nivel de glucosa extracelular en el cerebro y de cualquier variación a través del cerebro, es esencial para su propia regulación, así como también en la investigación de los mecanismos por el cual la glucosa actúa para modular las funciones cerebrales, incluyendo la modulación de la excitabilidad neuronal y la liberación de neurotransmisores (During, Leone, Davis, Kerr, & Sherwin, 1995; Hall et al., 1997). Se ha demostrado que la glucosa también mejora el aprendizaje y la memoria en varias tareas en humanos y roedores (Gold, 1995; McDonald & White, 1993). De tal forma que la inyección de glucosa directamente en el cerebro, así como la administración sistémica, facilita los procesos de aprendizaje y memoria (Gold, 1995; McNay & Gold, 1999; Ragozzino & Gold, 1991). Aunque hay muchas demostraciones de la modulación de procesos de aprendizaje y de memoria mediados por la glucosa, los mecanismos por los que esta modulación se efectúa siguen siendo desconocidos.

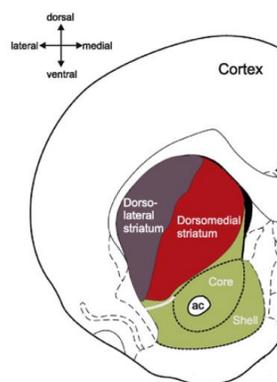
Por otra parte, se ha comprobado que también poseen un efecto neuroprotector, en la iniciación de una respuesta contrarregulatoria y en la iniciación y terminación de una comida (Routh, 2002; Routh, Song, & Liu, 2004; Wang et al., 2004).

#### **2.4. El Núcleo Accumbens**

El estriado es la principal vía de entrada de información hacia los ganglios basales, recibe información de la corteza cerebral y del tálamo (Yelnik, 2002). El estriado se divide en tres regiones funcionales: el estriado dorso-lateral (Fig.7; gris), el cual integra información sensorio-motora; el estriado dorso-medial (Fig.7; rojo), integrando información asociativa y el estriado ventral (Fig.7; verde), integra información

límbica o motivacional ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.)  
ADDIN EN.CITE (Humphries & Prescott, 2010; Yelnik, 2002).

El estriado ventral, también conocido como núcleo accumbens, se ha vinculo a varios procesos cognitivos, de recompensa y de alimentación, lo cual se hablará más adelante en el apartado 2.5. Anatómicamente, el núcleo accumbens se divide en dos zonas: una parte *core* y la otra parte *shell*. La parte *core* envuelve a la región de comisura anterior (ac), mientras que el *shell* rodea la parte *core* (Figure 7) (Humphries & Prescott, 2010) .



**Figura 7 Anatomía del estriado.** Corte coronal de un cerebro de rata indicando las partes que conforman el estriado: dorso-lateral, dorso-medial y ventral, este último también llamado núcleo accumbens, el cual es dividido en core y shell. Ac: comisura anterior (Humphries & Prescott, 2010)

#### **2.4.1. Neuronas que conforman al Núcleo Accumbens y a todo el estriado.**

Las neuronas del estriado han sido clasificadas por sus características anatómicas, histoquímicas y fisiológicas. Anatómicamente, se han identificado como: neuronas espinosas de tamaño medio e interneuronas no espinosas (Kreitzer, 2009) (*Gutierrez,*

Lobo, Zhang, & de Lecea, 2011; Kawaguchi, Wilson, Augood, & Emson, 1995).

➤ **Neuronas espinosas de tamaño medio (MSNs)**

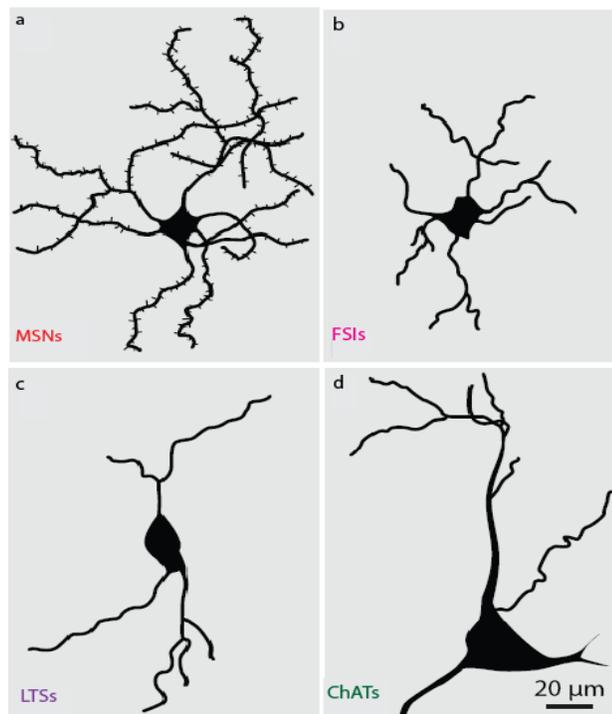
Las neuronas espinosas de tamaño medio (MSNs) representan alrededor del ~95% de la población neuronal, se caracterizan por poseer un soma de 10-11  $\mu\text{m}$  (Figura 8a), bajas frecuencias de disparo, poseen proyecciones GABAérgicas, y en el estriado dorsal y de acuerdo a la dirección de sus proyecciones pueden ser identificadas como: Vía directa, poseen, las proyecciones axonales hacia la sustancia nigra *pars reticulada* (estriado-nigral) y expresan receptores a dopamina D1+; mientras que la vía indirecta, proyectan preferencialmente a la parte dorsolateral del pálido (estriado-pallidal), expresando receptores a dopamina D2+ (Kravitz et al., 2010). Es importante resaltar que anatómicamente es prácticamente imposible distinguir MSN D1+ de las MSN D2+(Kreitzer, 2009)-

➤ **Interneuronas no espinosas**

Este grupo comprende el resto de la poblacional neuronal del estriado ~5%, se clasifican como interneuronas GABAérgicas e interneuronas colinérgicas (Kawaguchi et al., 1995). Las *interneuronas GABAérgicas* se distinguen fisiológicamente como interneuronas *de disparo rápido (FSIs)* e *interneuronas de bajo umbral (LTSs.)* (Kawaguchi et al., 1995). Las FSIs se caracterizan por poseer un tamaño del soma de 9-11  $\mu\text{m}$  (Figura 8b), son neuronas que expresan parvalbúmina, por lo que presentan altas frecuencias de disparo (Tepper & Bolam, 2004); mientras que las LTSs poseen bajas frecuencias de disparo, expresan somatostatina, neuropéptido y sintasa de óxido nítrico (Figura 8c) (Kubota, Mikawa, & Kawaguchi, 1993). Por último las *interneuronas colinérgicas (ChATs)*, son interneuronas no-

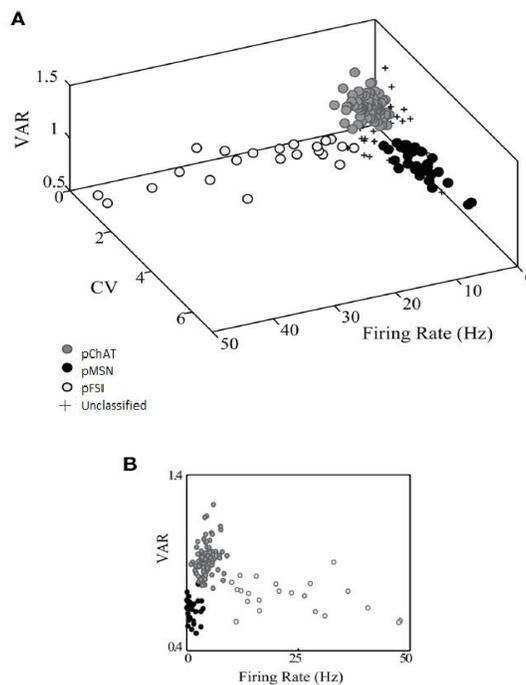
espinosas gigantes, porque poseen un diámetro del soma muy grande, casi  $\sim 40 \mu\text{m}$  (Figura 8d), también presentan bajas frecuencias de disparo (entre 3-10 Hz) (Bolam, Wainer, & Smith, 1984; Tepper & Bolam, 2004). También se les conoce como TAN (neuronas que se activan tónicamente).

Electrofisiológicamente, Yarom and Cohen (2011), mediante registros neuronales extracelulares de ratas en libre movimiento, clasificó tres tipos neuronales del estriado dorso-lateral y ventral utilizando tres parámetros: la frecuencia de disparo, coeficiente de variación (CV) y el radio amplitud-valle (VAR).



**Figura 8 Clasificación anatómica de neuronas identificadas en estriado.** Representación esquemática de a) neuronas espinosas de tamaño medio (MSNs), b) interneuronas de disparo rápido (FSIs), c) interneuronas de bajo umbral (LTSs) y d) interneuronas colinérgicas (ChATs) (Kreitzer, 2009).

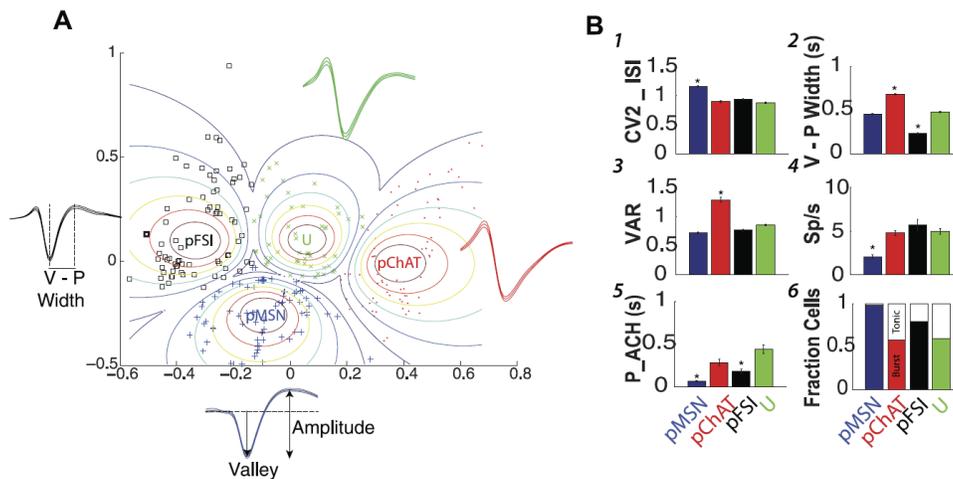
Las pFSIs (putativas FSI) se identificaron por poseer altas frecuencias de disparo, las pMSNs típicamente exhiben altos valores de Coeficiente Variación (CV) debido a que disparan de manera irregular y las pChATs se caracterizan porque sus potenciales de acción son largos (presentan largos periodos de repolarización), generando valores pequeños con respecto al radio amplitud-valle (VAR), lo cual puede verse en la Figura 9.



**Figura 9 Diagrama de clasificación neuronal según Yarom and Cohen.** A) Diagrama de dispersión 3D graficando la frecuencia de disparo, CV y VAR, separando tres grupos neuronales: pMSNs, pChATs, pFSIs. B) Diagrama de dispersión 2-d graficando la frecuencia de disparo vs VAR. Se observa que las pFSIs, presentan altas frecuencias de disparo, cortos VAR, mientras que las pMSNs y ChATs bajas frecuencias de disparo, aunque se distinguen por los valores en VAR y CV. VAR: Radio amplitud-valle, CV: coeficiente de variación, pChAT: interneuronas colinérgicas, pMNS: neuronas espinosas de tamaño medio, pFSI: interneuronas de disparo rápido (Yarom & Cohen, 2011).

Por otra parte, Tellez et. al. 2012 mediante registros extracelulares de ratas en libre movimiento, clasificó neuronas del estriado ventral utilizando el algoritmo “*fuzzy clustering*”, basándose en cuatro características:

Frecuencia de disparo, coeficiente de variación 2 (CV2), radio valle-amplitud (VAR) y ancho valle-pico (V-P width) (ver métodos). Mediante esta clasificación definió como pMSNs a aquellas que presentaron bajas frecuencias de disparo (<4 Hz), variabilidad entre los disparos y patrones de disparo en ráfagas y de manera irregular (Autocorrelogramas, ver métodos). Otro tipo neuronal identificado fueron las pFSIs, las cuales presentan una forma del potencial de acción asimétrica, y con rápidos periodos de repolarización (cortos V-P width) y por tanto permite altas frecuencias de disparo (80 Hz), con patrones de disparo en ráfagas y de manera irregular. Por último las pChATs, las cuales se identificaron por poseer largos periodos de hiperpolarización (largos V-P width), amplios valores de VAR y bajas frecuencias de disparo (3-10 Hz) (Figura 10).

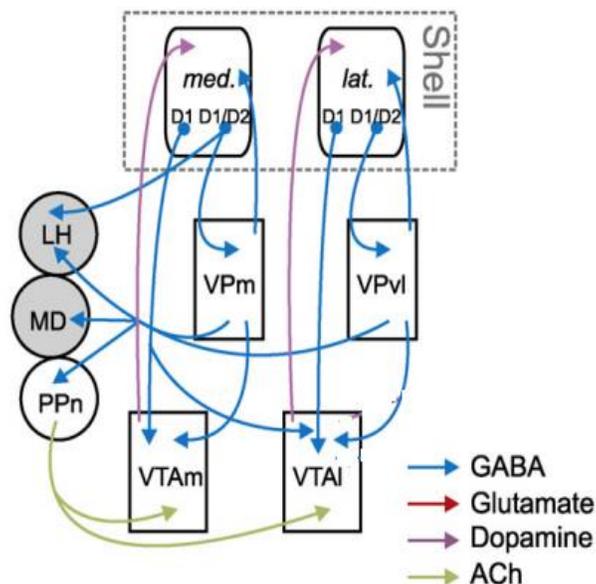


**Figura 10 Clasificación electrofisiológica neuronal en estriado ventral.** A) utilizando el algoritmo fuzzy clustering, graficando en y radio amplitud-valle, en x ancho valle-pico (V-P Width). B) B1-B6, cada panel presenta los histogramas de una característica CV2\_ISI, V-P Width, frecuencia de disparo, valor del pico máximo en los histogramas de autocorrelación (P\_ACH) y la fracción de neuronas que presentaron patrones de disparo en ráfagas o tónicas, respectivamente. pMSNs (+), pFSIs (□), pChATs (●) y neuronas no clasificadas (U) (Tellez et al., 2012).

#### 2.4.2. Proyecciones GABAérgicas del Núcleo Accumbens

El núcleo accumbens es un circuito del sistema límbico y componente principal que se ha distinguido en los sistemas de recompensa y motivación (Berke, Okatan, Skurski, & Eichenbaum, 2004; Koob & Bloom, 1988; Pittenger, Quinn, Lee, Taylor, & Duman, 2006). Posee interconexiones con estructuras extrapiramidales, como el hipotálamo, amígdala, globo pálido y corteza orbito-frontal, todas ellas están relacionadas con el consumo de alimentos (Papp et al., 2007) (Kelley et al., 2005). Como ya mencionamos, el NAc anatómicamente se divide en core y shell. y cada subregión presenta diferentes proyecciones (Maldonado-Irizarry, Swanson, & Kelley, 1995). Por ejemplo el shell, es la única región del estriado la cual tiene conexiones

directas con el HL (Maldonado-Irizarry et al., 1995; Mogenson, Jones, & Yim, 1980) (Figura 11).



**Figura 11 Interconexiones del NAc shell hacia otras zonas del cerebro.** LH: hipotálamo lateral, MD: núcleo medio-dorsal del tálamo, PPn: núcleo pedunculo-pontino, VTAm: área ventral tegmental división medial, VTAI: área ventral tegmental división lateral, VPm: pálido ventral división medial, VPvl: pálido ventral división ventro-lateral, med: medial, lat:lateral (Humphries & Prescott, 2010).

## 2.5. Neuronas modulan su frecuencia de disparo durante la conducta de ingesta

Como se ha mencionado anteriormente, la inactivación farmacológica del NAc incrementa la ingesta de alimentos, indicando que es un sitio clave del circuito de la ingesta (Kelley et al., 2005). De hecho, experimentos en donde se inyecta muscimol, un agonista a los receptores GABA<sub>A</sub>, localmente en NAc (Basso & Kelley, 1999;

Stratford & Kelley, 1997) se observó que se induce un incremento en la ingesta de alimento (pero no de agua) en ratas saciadas y de manera dosis dependiente. Datos similares se han encontrado inyectando otros fármacos como baclofen, un agonista a receptores GABA<sub>B</sub> (Stratford & Kelley, 1997), o bloqueando receptores AMPA-kainato y de glutamato (Maldonado-Irizarry et al., 1995). Lo que indica que la inactivación farmacológica del NAcS parece incrementar el apetito. Por otra parte estudios realizados por Krause (2010) identificaron que una mayor población de neuronas del NAc se inhibían durante el consumo de sacarosa y cuando estimulaban eléctricamente (activando de forma artificial al NAc), se interrumpía el lengüeteo, indicando que se requiere una pausa en la frecuencia de disparo de las neuronas de NAc para iniciar y mantener el consumo, en este caso de sacarosa (Figura 12).

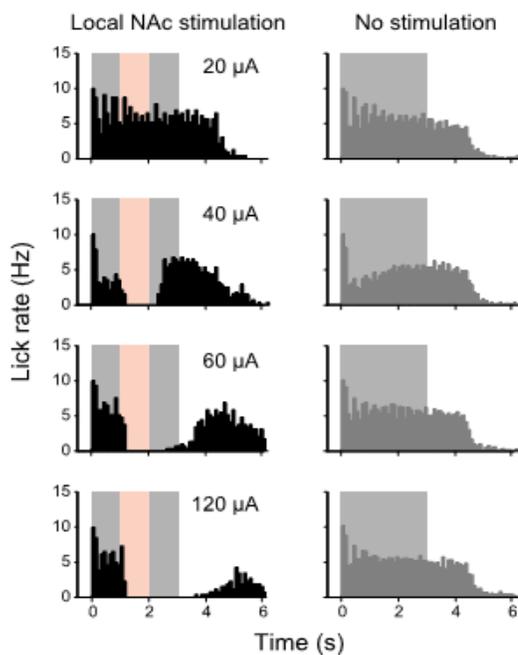
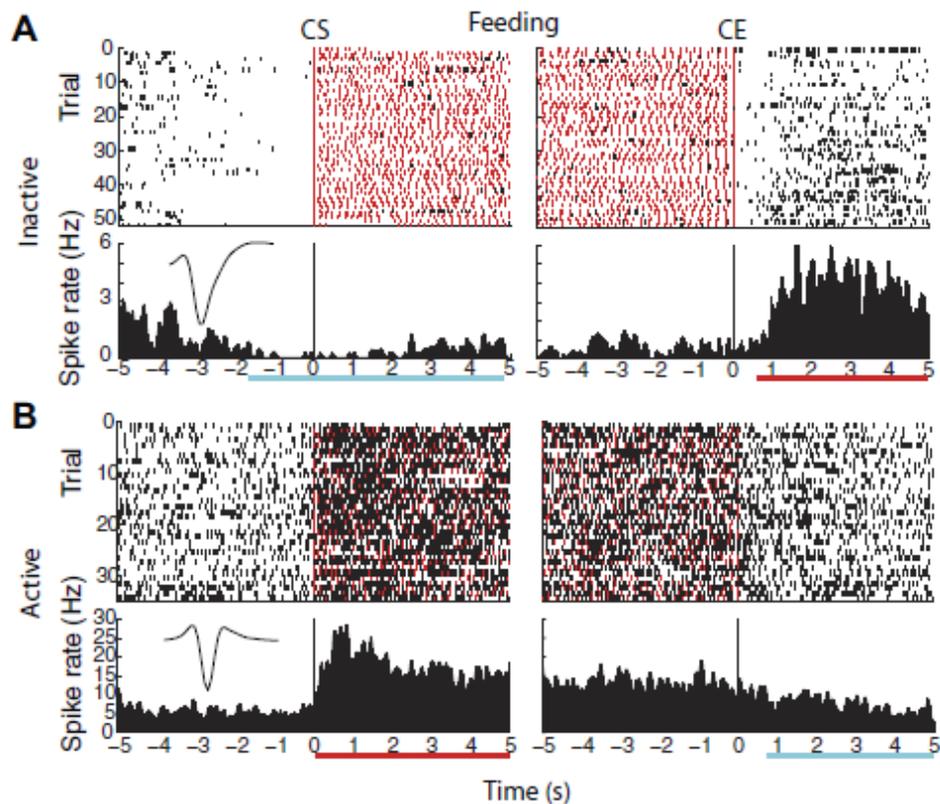


Figura 12 Actividad neuronal del NAc durante estimulación eléctrica. El recuadro gris indica el libre acceso a sacarosa, el recuadro naranja indica el momento de la estimulación eléctrica, a diferentes intensidades. Panel izquierdo se muestra la actividad neuronal durante la estimulación y a la derecha, sin estimulación (Krause, German, Taha, & Fields, 2010).

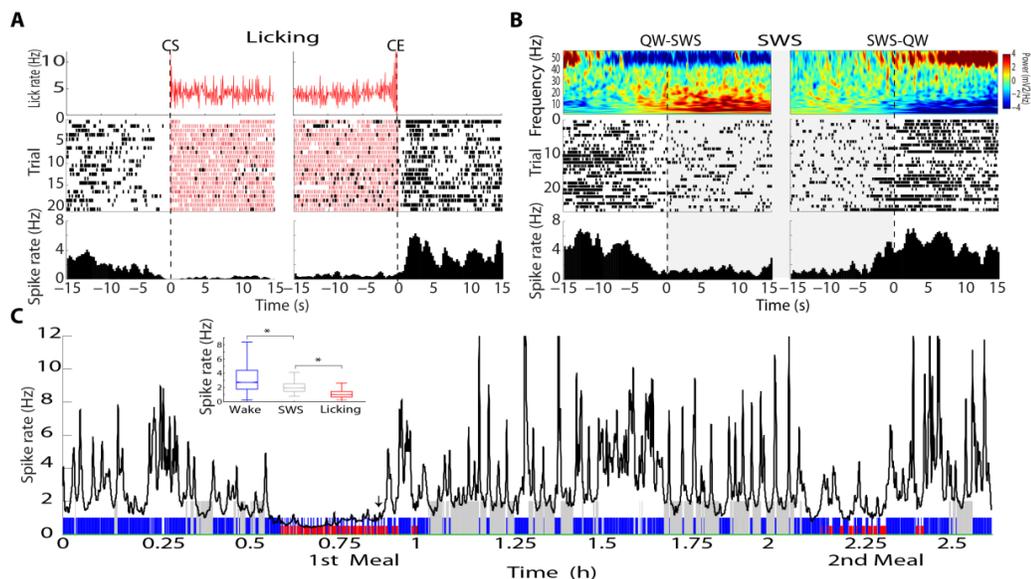
En este sentido Tellez (2012) en nuestro laboratorio, realizó registros extracelulares en el NAc de ratas en libre movimiento y encontró que una minoría de las neuronas de este sitio se activaba (11%), mientras que la mayoría se inactivaban (36%) durante el consumo de Ensure (Figura 13) de acuerdo con los datos encontrados por Krause (2010). Lo que da soporte a la idea de que la inactivación del NAcS es capaz de promover el apetito y el consumo de alimento palatable.



**Figura 13 Neuronas registradas en NAc que se inactivan (A) y se activan (B) durante la ingesta de Ensure.** Líneas rojas indican el lengüeteo y líneas negras los potenciales de acción. En panel superior de A y B, indica el raster plot (ensayos) y en el panel inferior el histograma de tiempo postestímulo (PSTH) en Hz. Líneas verticales indican el inicio (CS) y el termino del consumo de Ensure (CE). La línea de color azul marcan inhibición y la línea horizontal color rojo, indica la recuperación en la frecuencia de disparo (Tellez et al., 2012).

## **2.6. Neuronas que se modulan durante el sueño**

En otros estudios realizados, se ha encontrado que las neuronas del NAc también son moduladas no sólo por la alimentación si no también durante el sueño (SWS) (Berke et al., 2004; Tellez et al., 2012). Datos publicados recientemente, en humanos, indicaron que una restricción del sueño permite una sobre-activación en áreas asociadas a efectos de recompensa, como el putamen, tálamo, corteza prefrontal, y núcleo accumbens (St-Onge et al., 2012). En efecto Tellez (2012) también demostró por primera vez que existen neuronas en NAcS que son moduladas durante estos dos estados cerebrales: sueño y alimentación. Este grupo neuronal podía incrementar su frecuencia de disparo (activadas) o disminuir su frecuencia de disparo (inhibidas) durante el sueño y/o la alimentación (Figura 14). Indicando que la gran mayoría de las neuronas del NAcS son capaces de integrar información relacionada con la alimentación y con el ciclo vigilia-sueño.



**Figura 14 Ejemplo de una neurona en NAcS modulada por ambos estados: SWS y lengüeteo.** El panel superior de A y B, indica el raster plot (ensayos) y en el panel inferior el histograma de tiempo postestímulo (PSTH) en Hz. Líneas verticales indican el momento de inicio del lengüeteo e inicio de SWS, líneas rojas el lengüeteo, líneas negras los potenciales de acción. A) muestra a una neurona que es inactivada durante el consumo de ensure. B) la misma neurona también se inactiva durante el periodo de sueño, en el panel superior se muestra el espectrograma de poder, el color azul indica menor potencia y el color rojo una mayor potencia del LFP (banda de colores del lado derecho) a diferentes bandas de frecuencia (Hz), se observa que durante el inicio del sueño de ondas lentas (tiempo 0 s) el poder a bajas frecuencias incrementa. C) Hipnograma y la frecuencia de disparo de esa misma neurona, el color azul indica el estado despierto, el color rojo el consumo de ensure y en gris, el periodo de sueño.

En resumen, registros electrofisiológicos en animales en libre movimiento indican que gran parte de sus neuronas se modulan durante la ingesta de alimento (Ensure, sacarosa, etc.) y durante la transición de despierto a sueño de ondas lentas. Sin embargo, aún queda la interrogante si la inhibición (o activación) de la actividad eléctrica de neuronas registradas en el núcleo accumbens durante el consumo de Ensure, se deba a la conducta de ingesta *per se* o a los niveles de glucosa periféricos que su consumo libera. Para contestar esa pregunta, en esta tesis decidí realizar registros mutielectrodo del

NAcS (como los realizados en nuestro laboratorio por Tellez et. al. 2012) e infundir a través de una sonda intragástrica diferentes concentraciones de D-glucosa o durante el consumo de 10 mL de Ensure, al mismo tiempo se realizaron diversas mediciones de glucosa en sangre durante puntos clave del experimento. Todo esto con la finalidad de correlacionar los niveles periféricos de glucosa (en ausencia de alimento y con alimento) con la actividad eléctrica de los distintos tipos neuronales del núcleo accumbens shell.

### **3. HIPÓTESIS**

Basado en nuestros resultados previos, nuestra hipótesis es que las neuronas de núcleo accumbens shell que son moduladas durante la ingesta de ensure, son las mismas que se modulan ante la presencia de glucosa periférica.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1. Objetivo general**

Determinar si las neuronas que detectan glucosa NAc Shell (GE o GI) son las mismas que se modula ante la ingesta de alimento líquido (Ensure®), además de identificar qué tipo neuronal (MSN, FSI, TAN) es más sensible a D-glucosa.

#### **4.2. Objetivos específicos**

- Determinar si las neuronas que son moduladas a D-glucosa, son las mismas que se modulan durante la ingesta de Ensure®.
- Clasificar de forma putativa a las neuronas registradas mediante la extracción de las siguientes características del potencial extracelular: En ancho valle-pico, la razón valle-amplitud, la frecuencia de disparo y su coeficiente de variación 2.

## **5. MÉTODOS**

### **5.1. Animales**

Se usaron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley, con pesos de 350-400 g. Los animales se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura y humedad, con libre acceso a comida y agua.

Se realizaron 3 cirugías en una rata, utilizando como anestésico Pentobarbital Sódico (60 mg/Kg peso) y Atropina (0.4 mL/Kg peso) mediante una administración intraperitoneal (i.p.). Para la dosis de mantenimiento, se requirió del 20-25% con respecto a la dosis inicial de Pentobarbital Sódico.

Posterior a la cirugía, se mantuvieron en recuperación 7 días, inyectando durante tres días 0.2 mL Baytril® al 5%. También se mantuvo diariamente la permeabilidad del catéter en arteria carótida utilizando una solución de heparina/salina estéril (200 U/mL).

### **5.2. Técnicas microquirúrgicas.**

#### **5.2.1. Implantación de catéter intragástrica.**

Se utilizaron catéter de Silastic® (0.030 in I.D. x 0.065 in O.D.) con una longitud de 14 cm (Vazquez, Petrone, & Levitin, 1981; Young & Deutsch, 1981). El día anterior a la cirugía, los catéteres fueron sumergidos en etanol al 70% y antes de la cirugía lavados varias veces con solución salina (0.9 % NaCl).

Parte de la metodología fue seguida según Lukas (Lukas & Moreton, 1979) y Vazquez (Vazquez et al., 1981). Para la implantación del catéter en el estómago, se procedió a rasurar la parte posterior e izquierda del abdomen del animal y desinfectar. Se realizó una incisión de 2-3 cm, mediante pinzas romas se separó a los músculos

abdominales para exponer el estómago. Se realizó un pequeño orificio en el estómago, en la parte del *fundus* (Figura 15) y se colocó el catéter. Posteriormente el catéter se externo en la zona interescapular (parte posterior del cuello), pasándolo subcutáneamente y fijándolo a la piel en su punto de salida con hilo de sutura (Nylon 3-0).

La cánula intragástrica fue utilizada para inyectar soluciones de D-glucosa a diferentes concentraciones (30% y 50%), mediante la programación de una bomba de infusión controlada automáticamente por computadora(MED ASSOCIATES INC.).



**Figura 15 Implantación del catéter intragástrico**

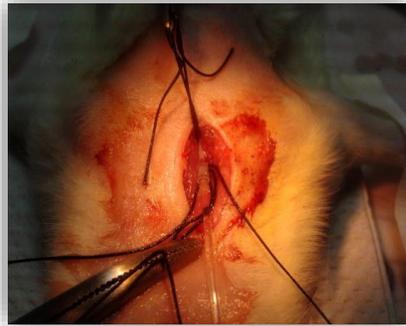
### **5.2.2. Implantación de catéter en arteria carótida.**

Se utilizaron catéter de Poliuretano-Silastic®, utilizando como proveedor *Research Catheters Company* (ReCathCo, Part No. 0116EO). En el día de la cirugía el catéter fue llenado con solución de heparina-salina (200 U/mL), evitando cualquier burbuja de aire.

Para el cateterismo de la arteria carótida (Ayala et al., 2011; Heiser, 2007; Kraegen, James, Bennett, & Chisholm, 1983; Thriwikraman, Huot, & Plotsky, 2002), se coloca el animal en posición decúbito supino, se rasuró y se desinfecto el cuello. Se realizó un corte

en la piel paralela a la tráquea en la zona media del cuello, de 1-2 cm aprox. El acceso a la arteria se logró mediante disección con pinzas de punta roma, separando los músculos esternohioideo de los músculos omohioideo y esternocleidomastoideo con pinzas de punta roma y en dirección longitudinal a los músculos, evitando desgarrarlos. La arteria carótida fue localizada y cuidadosamente separada del nervio vago. Para evitar el espasmo vascular y consecuentemente la disminución del flujo sanguíneo del segmento contraído, se utilizó Clorhidrato de Pargoverina (Plidán®), la cual fue aplicada directamente sobre la arteria (20 µL). Una vez disecada la arteria, se colocaron 3 hilos de sutura (Seda 3-0): el hilo de sutura situado en el extremo distal (más alejado al corazón) se apretó cerrando el flujo sanguíneo y, el hilo situado en el extremo proximal (más cercano al corazón) fue atado, sin apretar. Una vez realizado esto, se procedió a tensar los hilos proximal y distal para evitar el sangrado. Con ayuda de una aguja (27G) en un ángulo de 90° fue insertada en la arteria, esto nos sirvió para colocar inmediatamente el catéter, apretar el nudo del extremo proximal y el tercer hilo de sutura reforzó la sujeción del catéter dentro de la arteria (Figura 16). Posteriormente, el catéter se externó en la zona interescapular (parte posterior del cuello), pasándolo subcutáneamente y fijándolo a la piel en su punto de salida.

La cánula en la arteria carótida fue utilizada para la obtención de muestras de sangre y para realizar mediciones de glucosa (mediante tiras reactivas (ACCU-CHEK® Performa)).



**Figura 16** Implantación del catéter en arteria carótida

### **5.2.3. Implantación de microarreglo de 16 electrodos.**

Aunado a las cirugías anteriores, también se realizó una cirugía estereotáxica para la implantación del microarreglo de 16 electrodos unilateral en la zona del NAc Shell, de acuerdo a Tellez et. al. (2012); las coordenadas con respecto a bregma fueron las siguientes: AP, +1.4 mm; medio-lateral,  $\pm 1$  mm; DV -7.5 mm, de acuerdo a atlas de cerebro de rata Paxinos et al., 1979. Se procedió a una craneotomía (Maldonadoirizarry & Kelley, 1994), colocación de 3 tornillos de acero inoxidable y posteriormente a la inserción del electrodo, asegurándolo con cemento dental (Figura 17).

La implantación del microarreglo de 16 electrodos, nos permitió evaluar la actividad neuronal en la zona de NAcS, durante el protocolo que fue planeado y posteriormente modificado.



**Figura 17 Implantación del microarreglo de 16 electrodos** el cual está recubierto por un epóxido el cual se disuelve con solución salina tibia para permitir su implantación.

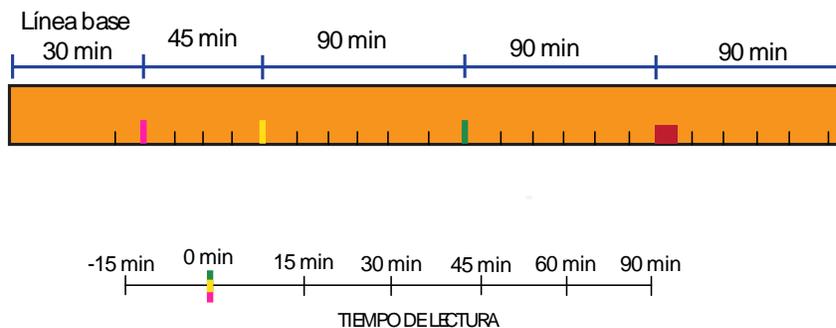
### **5.3. Protocolo experimental**

Para evaluar el papel que desempeña la glucosa sobre la red neuronal del Núcleo Accumbens Shell, así como también la relación de estas con la ingesta de Ensure®, se diseñó el siguiente experimento (Figura 18). Antes de proceder al experimento, cabe mencionar que la rata fue entrenada por un mínimo de 3 días antes dentro de una caja conductual hasta que aprendieron a tomar 10 mL en un intervalo de 10 minutos. Un día previo al experimento, la rata fue privada de alimento 12-15 hrs.

El día del experimento, se tomó una muestra de sangre, para medir los niveles basales de glucosa (antes de registrar la actividad neuronal); se estableció 30 minutos de línea base, registrando solamente la actividad neuronal y una muestra de sangre 15 minutos después de ser conectada al equipo Plexon; después, la primera inyección intragástrica

fue de 0.5 mL de solución salina como control y registrar la actividad neuronal durante 45 minutos. Pasado este tiempo se procedió a inyectar intragástricamente 0.5 mL de glucosa al 30% y 90 minutos después, se inyectó intragástricamente 0.5 mL glucosa al 50%, ambas a una velocidad de 0.25 mL/min. Finalmente, 90 minutos posteriores a la última inyección, se colocó un bebedero con 10 mL Ensure, la cual fue ingerida por la rata en un lapso de 10 min aprox. La finalidad de fue dejar al final el consumo de Ensure.

- █ = Inyección IG de 0.5 mL de Solución salina
- █ = Inyección IG de 0.5 mL de Glucosa 30%
- █ = Inyección IG de 0.5 mL de Glucosa 50%
- █ = 10 mL Ensure® oral
- | = Lecturas de [glucosa] en sangre



**Figura 18 Protocolo experimental**

#### 5.4. Registro neuronal

Se llevó a cabo registros neuronales extracelulares con un procesador multielectrodo (Plexon, Dallas, TX). Este equipo nos permite registrar simultáneamente la actividad de varias neuronas distribuidas a través de múltiples electrodos, utilizando ratas en libre movimiento. Todos los resultados se analizaron, posteriormente, por medio de

scripts de Matlab hechos en el laboratorio de neurobiología del apetito del CINVESTAV.

## **5.5. Análisis de datos**

### **5.5.1. Hipnograma**

Para analizar los estados de transición se establecieron tres estados conductuales (Tellez et al., 2012): a) Awake (Despierto), caracterizado por presentar baja amplitud a bandas de frecuencia theta (5-9 Hz) y gamma (30-55 Hz); en este estado los animales presentaron poca actividad exploratoria. b) SWS (Sueño de ondas lentas) presentando alta amplitud en bandas de frecuencia delta (1-4 Hz) y c) Feeding (Alimentación) obtenida a partir de registros de lengüeteo.

Los estados Awake y SWS fueron obtenidos usando los Potenciales Locales de Campo (LFP), siguiendo la metodología descrita por (Gervasoni et al., 2004).

### **5.5.2. Neuronas relacionadas con la alimentación.**

Se identificaron dos tipos neuronales mientras el animal comía, las cuales se llamaron “activas” e “inactivas”, según Tellez et al (Tellez et al., 2012). El análisis consistió en comparar la frecuencia de disparo 5 segundos antes del inicio del lengüeteo comparado con la frecuencia de disparo durante el lengüeteo (5 segundos). Se clasificaron como “*neuronas que se inactivan*” a aquellas que mostraron una disminución su frecuencia de disparo y “*neuronas que se activan*” a aquellas que presentaron un incremento en la frecuencia de disparo, durante el

periodo de lengüeteo, de acuerdo al análisis de prueba estadística Wilcoxon o Kruskal Wallis según sea el caso.

### **5.5.3. Neuronas relacionadas con el sueño.**

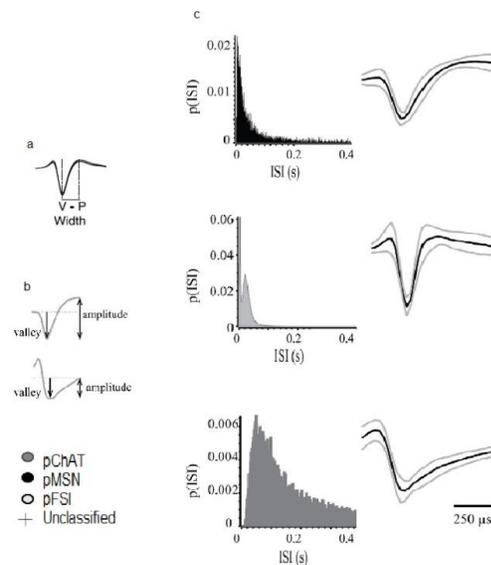
Para el análisis de las neuronas que fueron moduladas con el sueño, se utilizó el análisis de Wilcoxon, comparando la frecuencia de disparo en 15-s antes del periodo de SWS. La clasificación se realizó siguiendo la metodología de Tellez et al. (Tellez et al., 2012), en la cual se denominó “*neuronas SWS-on*”, aquellas que mostraron un incremento en la frecuencia de disparo y “*neuronas SWS-off*” aquellas que mostraron una disminución en la frecuencia de disparo, durante el periodo de SWS.

### **5.5.4. Clasificación neuronal**

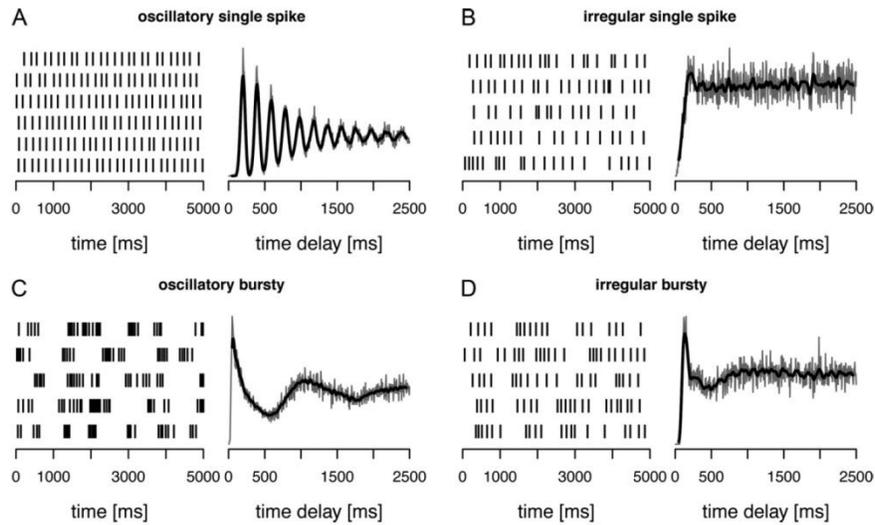
Las neuronas registradas fueron analizadas y clasificadas de acuerdo a 4 parámetros (Tellez et al., 2012; Yarom & Cohen, 2011):

- *Frecuencia de disparo (FR)*: calculado como el número de disparos registrados dividido por la duración total de la sesión.
- *Ancho valle-pico (V-P width)*: Distancia entre pico-valle, tal como se ilustra en la Figura 19a.
- *Radio valle-amplitud (VAR)*: Calculado como el valor absoluto del primer valle del disparo dividido entre la diferencia del valor mínimo y el valor máximo (Figura 19 b).
- *Distribución de los intervalos entre disparos (ISI)*: Mediante los histogramas de ISI, se pueden identificar los tres tipos neuronales (pFSI, pMSN, pChAT) (Figura 19c)

- *Coeficiente de variación 2 (CV2)*: calculado para cada par de intervalos entre espigas (ISI) y el promedio CV2\_ISI para el total de la sesión.
- *Autocorrelograma*: Mediante histogramas, describe los patrones de disparos neuronales: disparos oscilatorio simple, disparos en ráfagas-oscilatorias, disparos simples de manera irregular y en ráfagas irregulares (Figura 20)(Bingmer, Schiemann, Roeper, & Schneider, 2011).



**Figura 19 Parámetros para la identificación neuronal en NAc.** a) V-P Width, las líneas punteadas indican la distancia entre valle-pico; b) Medición de radio amplitud-valle (VAR); c) Distribución de los intervalos entre espigas y correspondiente potencial de acción, característicos de cada neurona (Tellez et al., 2012; Yarom & Cohen, 2011).



**Figura 20 patrones de disparos neuronales.** Raster plot e histogramas de autocorrelación (ACH) de trenes de disparo en neuronas dopaminérgicas de sustancia nigra (Bingmer et al., 2011)

## 5.6. Histología

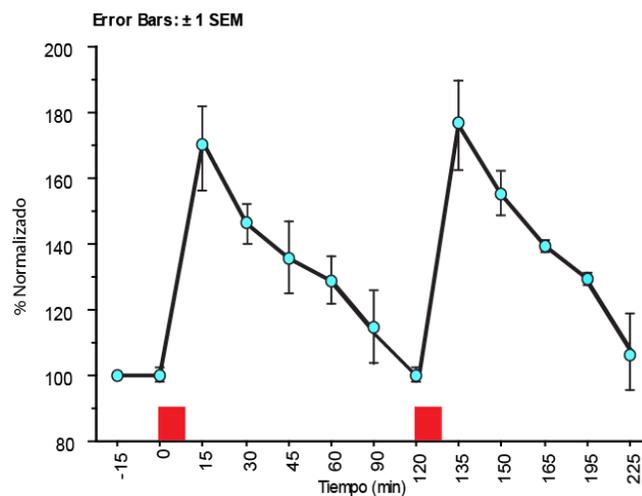
Para verificar la correcta localización del microarreglo de 16 electrodos, al final de los experimentos, se perfundió con paraformaldehído al 4% por vía intracardiaca. Posteriormente se decapitó a la rata, se extrajo el cerebro y fue sumergido en soluciones de sacarosa-paraformaldehído al 10, 20 y 30% consecutivamente. Finalmente se realizaron cortes de 50  $\mu\text{m}$  y teñido con violeta de cresilo. En la Figura 21, se percibe la localización del electrodo.



## 6. RESULTADOS

### 6.1. Mediciones de glucosa durante la ingesta de Ensure

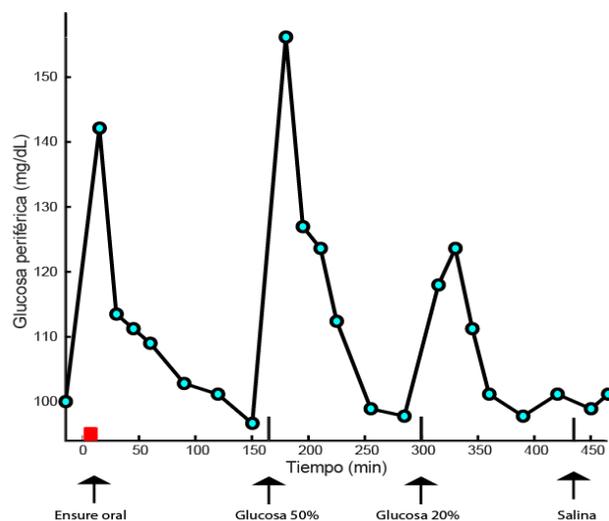
Antes de evaluar el papel que desempeña el ensure en la actividad neuronal de NAcS, se determinaron los niveles de glucosa periférica inducida por 10 mL de ensure oral ( $n=4$  ratas). Recordemos que previo a los experimentos, la rata fue entrenada en la caja conductual 2 veces al día, durante 3 días previos y 24 horas antes de la realización del experimento eran privadas solamente de comida. En la Figura 22, se indican los niveles de glucosa periférica, mediante extracciones de sangre en la cola. Se observa una curva normalizada a los valores glicémicos inducidos por una ingesta de 10 mL de ensure. Se alcanzó el pico máximo a los 15 min ( $149.5 \pm 10.8$  mg/dL y  $156.6 \pm 5.88$ , respectivamente) y regresaron a niveles basales ( $88.7 \pm 2.5$  mg/dL) después de dos horas (Figura 22).



**Figura 22 Niveles de glucosa periféricos inducidos por una ingesta de ensure.** El recuadro rojo indica 10 mL de ensure oral; se observa que el ensure incrementa los niveles glicémicos a los 15 minutos posterior a la ingesta.

## 6.2. Mediciones glicémicas durante la ingesta de ensure e inyecciones de glucosa al 20% y 50%

Para probar que la glucosa periférica modulaba la actividad neuronal de NAcS, se procedió a evaluar los niveles glicémicos generados a partir de inyecciones de glucosa en el estómago a concentraciones de 20 y 50%, mediante extracciones de sangre en vena yugular. En la Figura 23, se observa que los picos máximos se alcanzan a los 15 minutos después de beber ensure e inyecciones de glucosa, no así al momento de inyectar 0.5 mL de solución salina que no generó ningún incremento sobre los niveles de glucosa periférica, lo cual nos sirvió como un control negativo durante el periodo de registro neuronal.



**Figura 23** Medición de glucosa durante una sesión experimental. El recuadro rojo indica el momento en que la rata bebió 10 mL de ensure; líneas verticales negras en momento de las inyecciones (0.5 mL de glucosa 50%, 0.5 mL de glucosa 20% y 0.5 mL de solución salina). Nuevamente, el pico máximo después del ensure oral, es alcanzado a los 15 minutos; así mismo, con la inyección de glucosa al 50%, sin modificación en los niveles glicémicos después de la inyección salina.

### **6.3. Implantación de catéteres y electrodo**

Los primeros resultados se obtuvieron mediante extracciones de sangre en la cola de la rata, sin embargo este protocolo fue modificado ya que se encontró que al pinchar la cola de la rata incrementa significativamente los niveles de glucosa en NAc (Kiyatkin & Lenoir, 2012). Para ello se implementó en el laboratorio la cirugía para la colocación del catéter en la vena yugular, utilizada ampliamente para realizar extracciones de sangre (Thrivikraman et al., 2002) (Ayala et al., 2010). Mediante extracciones de sangre en la vena yugular, se logró establecer el primer protocolo (Figura anterior). Sin embargo, aunque resultó ineficiente para los tiempos que se planteaban los experimentos (10 días) y prolongar la viabilidad del catéter por más de 5 días, era sumamente difícil; probablemente por la propia anatomía de la vena, por problemas de colapsos de la vena al ejercer presiones negativas, trombosis, etc. Finalmente, se implementó la cirugía en arteria carótida (Heiser, 2007) con la cual se logró establecer los experimentos y mantener la viabilidad hasta los días de los experimentos.

Se logró estandarizar las técnicas quirúrgicas en el laboratorio para la colocación del catéter intragástrica y el catéter en arteria carótida. Ya que se había establecido el protocolo, se operaron exitosamente dos ratas con las tres cirugías (dos catéteres y el electrodo).

Con el protocolo establecido, se realizaron cinco experimentos, de los cuales tres fueron mediante la extracción de sangre en arteria carótida, una mediante extracción en la cola y, otra sin tomar muestras de sangre ya que el catéter se bloqueó.

#### **6.4. Actividad neuronal durante los estados de sueño e ingesta**

Después de resolver una gran cantidad de problemas técnicos, finalmente logramos obtener una base de datos de 34 neuronas, siguiendo el protocolo previamente definido. Mediante el análisis de los potenciales de campo local se obtuvo información acerca de las transiciones de despierto-dormido (W-S), generándose los hipnogramas (Gervasoni et al., 2004) y mediante el análisis de lengüeteo, la información acerca de la ingesta de ensure.

En la Figura 24 se muestra el análisis representativo de la actividad de una neurona. Enfocándose en el panel *a*, se visualiza el hipnograma (cuadros rojos, azules y negro indican los estados de sueño, despierto e ingesta, respectivamente; ver Fig. 24 panel *a* parte inferior) y la frecuencia de disparo de la neurona (en negro), se observa que la actividad de esta neurona se incrementa durante el estado despierto, mientras que para los estados de sueño e ingesta, disminuye. Estos datos fueron comprobados con el análisis estadístico de Kruskalwallis mostrado en el panel *b* (gráfico tipo boxplot), en donde se puede apreciar que la frecuencia de disparo más alta (en promedio ~6 Hz) se observó durante el estado despierto con respecto a los estados de sueño e ingesta de ensure (~3, ~ 4 Hz, respectivamente).

#### **6.5. Correlación entre los niveles periféricos de glucosa con la actividad neuronal**

Como ya se ha mencionado, existen reportes que indican que las neuronas de NAcS se modulan ante glucosa hipo-o hipertónica aplicada directamente a esta región (Papp et al., 2007) y por otra parte, que existen neuronas en la misma zona, que se modulan ante la

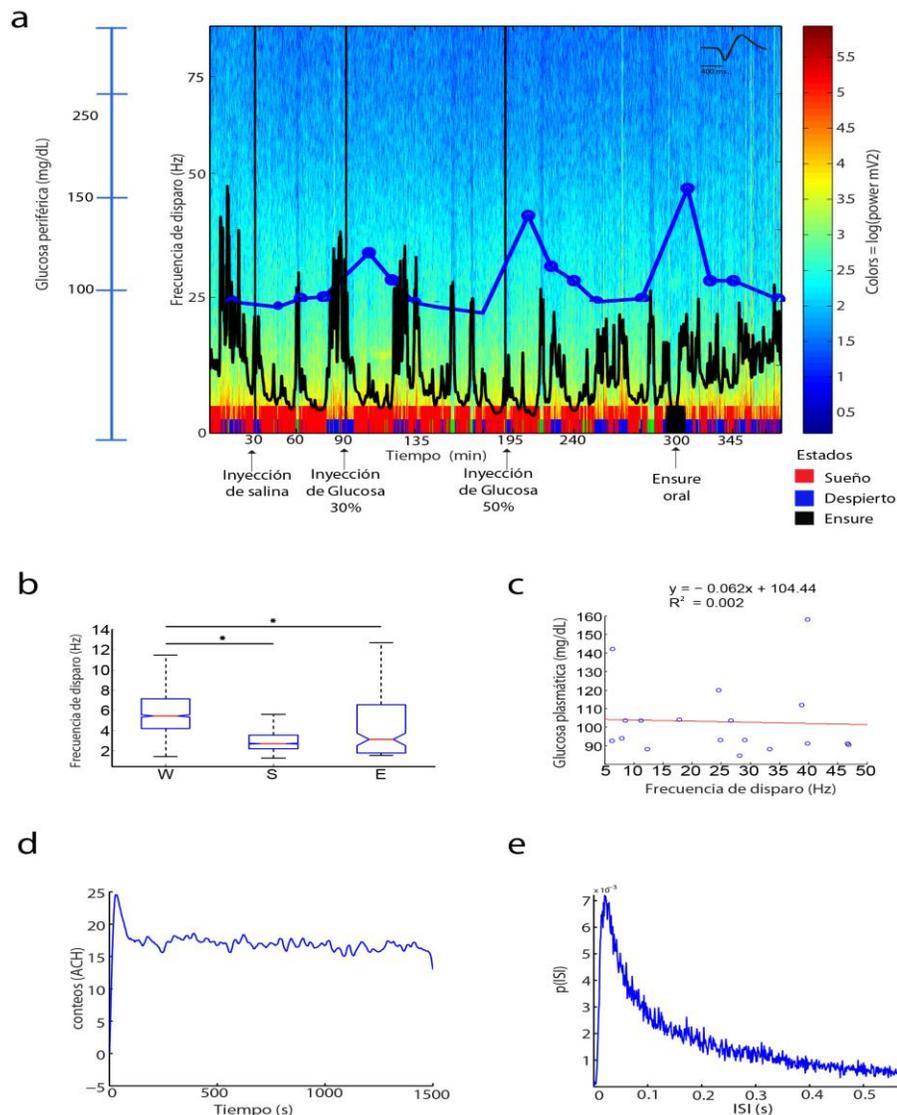
ingesta de ensure y durante el periodo de sueño (Tellez et al., 2012). Sin embargo, no se ha comprobado si el circuito neuronal que es modulado durante la alimentación es el mismo que detecta los niveles de glucosa generados a partir de la ingesta de un alimento o que se deba a un comportamiento ajeno. Para contestar esta pregunta, se procedió a evaluar los niveles de glucosa en sangre y relacionarla con la frecuencia de disparo de las neuronas registradas.

Siguiendo el análisis mostrado en la Figura 24a, se observa en líneas azules los niveles periféricos de glucosa durante el tiempo del registro, aunando a los tiempos cuando se inyectó 0.5 mL de salina, D-glucosa 30% y D-glucosa 50% (líneas negras verticales) como se ve en la gráfica. La inyección de salina intragástrica no produjo cambios en las concentraciones de glucosa, ni tampoco modificó la frecuencia de disparo de la neurona. Los picos máximos de glucosa periférica alcanzados fue de 120 mg/dL (glucosa 30%); 142 mg/dL (glucosa 50%) y 158 mg/dL al beber 10 mL Ensure. Se observa que el pico máximo fue alcanzado a los 15 minutos después de las inyecciones intragástricas, de igual manera para el consumo oral de Ensure. La actividad neuronal tuvo fluctuaciones de actividad en distintos periodos del experimento los cuales generalmente correspondieron como ya mencionamos a momentos en que el animal estaba despierto (Ver Fig 24). Ya que durante los periodos de sueño la frecuencia de disparo de esta neurona decreció independientemente de los niveles plasmáticos de glucosa. Es decir, la frecuencia de disparo de esta neurona no correlacionó de forma lineal con la glucosa plasmática ( $R^2=0.002$ ;  $p<0.001$ ) (Figura 24c) pero si son el ciclo vigilia-sueño.

## **6.6. Identificación del tipo celular de la neurona mostrada en la Figura 24a**

Finalmente, se procedió a indagar qué tipo putativo de neurona era; para ello se utilizó el histograma de autocorrelación, forma del potencial de acción, distribución del ISI, CV2, y frecuencia de disparo.

En el inserto superior derecho de la Figura 24a, se observa la forma del potencia de acción extracelular y basándose en los análisis de histograma de autocorrelación (ACH; Figura 24d) y ya que el ACH presenta un pico a tiempos muy cortos nos indica que esta neurona dispara de manera irregular y en forma de ráfagas (burst), presentando largos y cortos ISI (Figura 24e), aunado a bajas frecuencias de disparo, lo cual es indicativo que se trata de una pMSN. Características similares que han sido descritos anteriormente por Yarom and Cohen, 2011, Tellez and Perez 2012. Estos resultados sugieren que al menos esta neurona putativamente MSN no es sensible a los distintos niveles periféricos de glucosa inducidos por nuestras inyecciones intragástricas de D-Glucosa o por el incremento de glucosa periférica generada por comer 10 mL de Ensure.



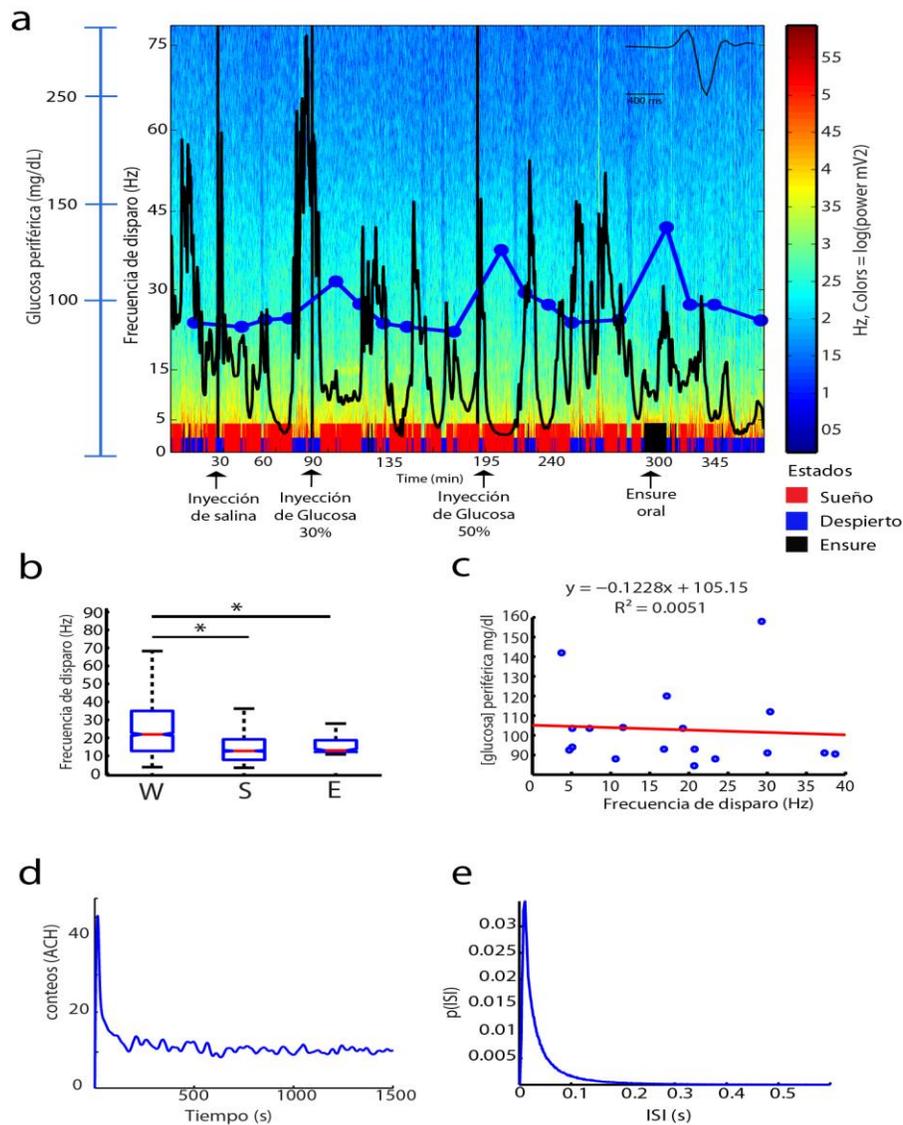
**Figura 24 Actividad neuronal de una MSN putativa.** En a) Espectrograma (fondo de colores) en azul indica menos poder y rojo mayor poder a distintas frecuencias; el hipnograma nos grafica tres estados: despierto (cuadro azul), sueño (cuadro rojo), ingesta de enure (cuadro negro), el rango de frecuencia (Hz), líneas azules indica la concentración de glucosa periférica (mg/dL), líneas negras la actividad neuronal, líneas negras verticales el momento de las inyecciones; b) el análisis estadístico kruskalwallis nos indica que la neurona es modulada por los estados de ingesta (E) y sueño (SWS), c) Gráfica de las concentraciones de glucosa periférica vs la frecuencia de disparo (Hz), sin ninguna correlación entre ambos ( $R^2=0.002$ ), d) el histograma de autocorrelograma y e) la distribución de los intervalos entre disparos (ISI) indican que es una neurona MSN putativa. El recuadro en la parte superior derecha del espectrograma, se muestra la forma de potencial de acción, característico de este tipo neuronal.

### **6.7. Ejemplo de una pFSI cuya actividad correlaciona con el ciclo vigilia-sueño pero no con los niveles periféricos de glucosa.**

Habiendo demostrado que las neuronas MSNs parecen no censar los niveles periféricos de glucosa, nos dimos a la tarea de ver si las neuronas pFSI si eran sensibles a D-glucosa. En la Figura 25 se examinó otra neurona bajo los mismos parámetros mencionados anteriormente. Detallando los resultados de esta neurona, se distingue que es inhibida durante los estados de ingesta y de sueño, tal como se puede observar en el hipnograma (panel *a*) comparando visualmente la frecuencia de disparo con los estados de sueño (cuadros rojos), despierto (cuadros azules) e ingesta (cuadros negros) y reafirmando con los análisis estadísticos (panel *b*). Cuando se procedió a calcular si esta neurona es modulada por la glucosa, se verificó que tampoco detecta los niveles periféricos de esta ( $R^2 = 0.0051$ ), aun cuando hubieron incrementos de esta (120 mg/dL tras una inyección de glucosa al 30%; 142 mg/dL, de glucosa al 50%). Sin embargo si se observó una disminución en la frecuencia de disparo durante el tiempo en que estaba bebiendo ensure, no así cuando se alcanzó el pico máximo de glucosa, el cual fue a los 15 minutos después de la ingesta de ensure.

Analizando el tipo neuronal, se determinó que fue una FSI putativa, ya que posee periodos de repolarización muy cortos (cuadro superior derecho del panel *a*, un potencial de acción simétrico), presenta una anchura corta (V-P Width), dispara en ráfagas y de manera irregular (tal como se observa en el panel *d* y *e*) y lo más importante presenta una tasa de disparo muy alta. Estos resultados indican que esta pFSI

tampoco fue sensible a los cambios en la glucosa periférica ya que su coeficiente de correlacion de Pearson fue de  $r=0.0051$ ,  $p$ -value n.s..

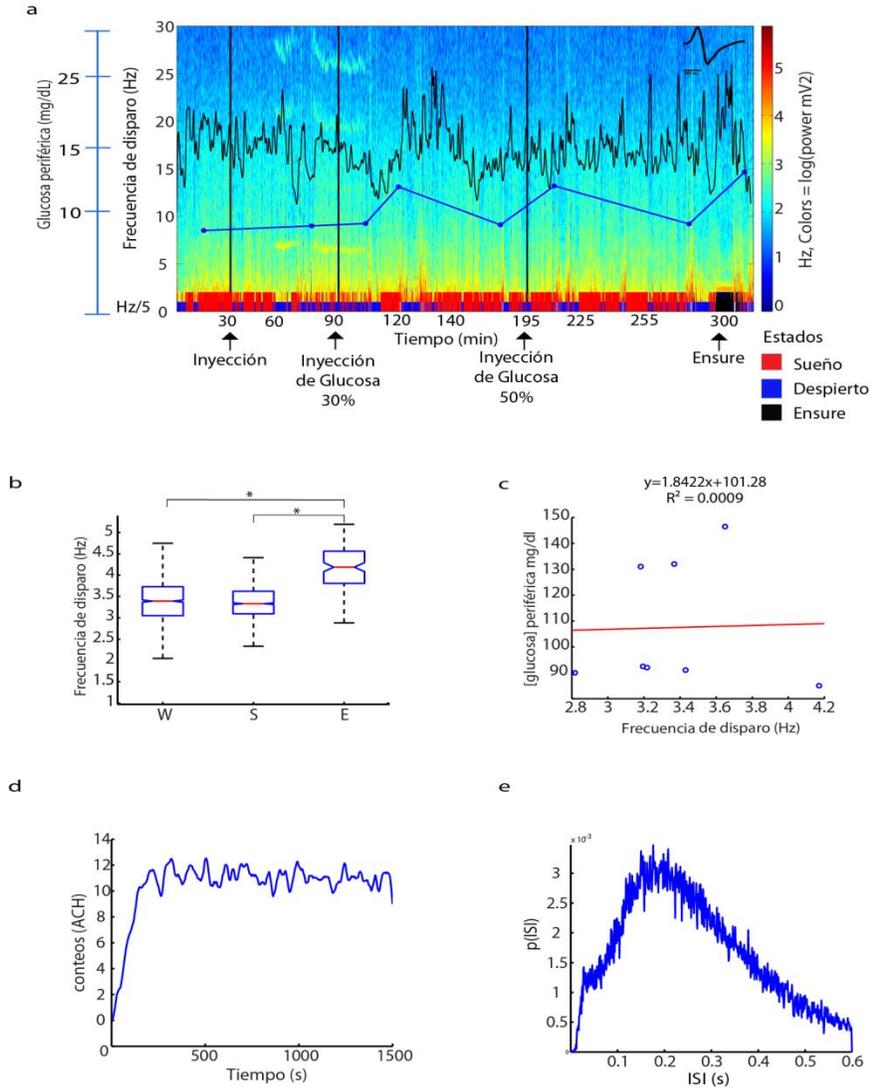


**Figura 25 Actividad neuronal de una FSI putativa, a)** Espectrograma (ver barra de colores), el rango de frecuencia (Hz), graficándose tres estados: despierto (cuadro azul), sueño (cuadro rojo), ingesta de ensue (cuadro negro), líneas azules indica la concentración de glucosa periférica (mg/dL), líneas negras la actividad neuronal, líneas negras verticales el momento de las inyecciones; **b)** el análisis estadístico kruskalwallis nos indica que la neurona es modulada por los patrones de sueño-vigilia e ingesta, **c)** Gráfica de las concentraciones de glucosa periférica vs la frecuencia de disparo (Hz), observándose ninguna correlación entre ambos ( $R^2=0.0051$ ), **d)**

histograma de autocorrelograma y e) distribución de los intervalos entre disparos (ISI) indican que es una neurona FSI putativa. El recuadro en la parte superior derecha del espectrograma, se muestra la forma de potencial de acción.

### **6.8. Ejemplo de una pChAT cuya actividad correlaciona con el periodo de ingesta pero no con los niveles periféricos de glucosa.**

Finalmente determinamos si las interneuronas pChAT son sensibles a los cambios en glucosa periférica. En la Figura 26, mediante el análisis estadístico (panel *b*) se determinó que es activada durante la ingesta, no así durante los estados de sueño-vigilia. Además, tampoco encontramos que correlacionara su frecuencia de disparo con los niveles periféricos de glucosa ( $R^2=0.0009$ ) (panel *c*). Se identificó que se trataba de una ChAT putativa, ya que los análisis nos arrojaron bajas frecuencias de disparo, la forma de disparo tónica e irregular y una amplia variabilidad en los intervalos inter espigas ISI (panel *d* y *e*, respectivamente).



**Figura 26 Actividad neuronal de una ChAT putativa.** a) Espectrograma, el rango de frecuencia (Hz), graficándose tres estados: despierto (cuadro azul), sueño (cuadro rojo), ingesta de ensure (cuadro negro), líneas azules indica la concentración de glucosa periférica (mg/dL), líneas negras la actividad neuronal, líneas negras verticales el momento de las inyecciones; b) el análisis estadístico kruskalwallis nos indica que la neurona es modulada durante el periodo de ingesta, c) Gráfica de las concentraciones de glucosa periférica vs la frecuencia de disparo (Hz), observándose ninguna correlación entre ambos ( $R^2=0.0009$ ), d) histograma de autocorrelograma y e) distribución de los intervalos entre disparos (ISI) indican que es una neurona ChAT putativa. El recuadro en la parte superior derecha del espectrograma, se muestra la forma de potencial de acción. Actividad neuronal durante los estados de sueño e ingesta.

## **6.9. Correlación de niveles de glucosa con la actividad de toda la población neuronal registrada**

En resumen, estos resultados nos indican que en su mayoría las neuronas del NAcS están siendo moduladas principalmente por las transiciones de sueño-vigilia e ingesta o en el mejor de los casos son mínimamente sensibles a los niveles periféricos de glucosa inducidos por consumir ensure.

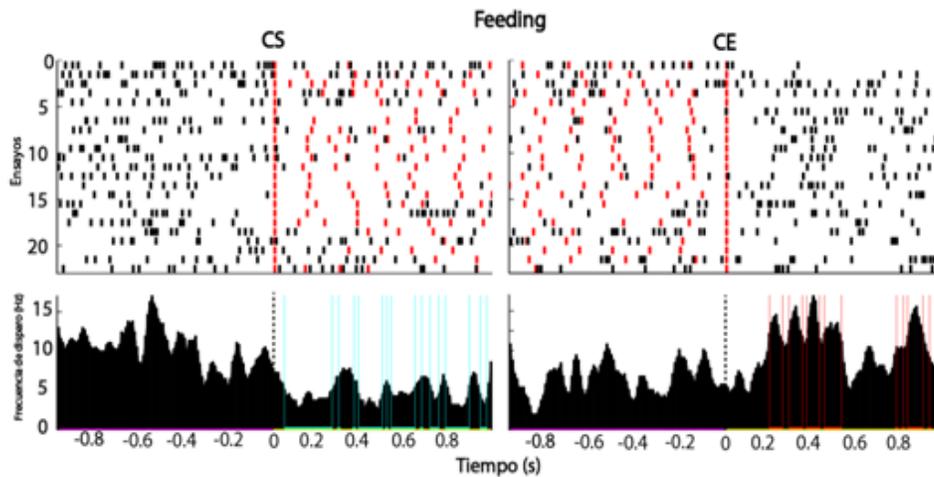
Finalmente, se decidió evaluar la población total de neuronas registradas para precisar si alguna de ellas era sensible a glucosa. Para ello se utilizó la correlación de Pearson (análisis de regresión) que nos indicó si existía una correlación entre cada una de las mediciones de glucosa anotadas con respecto a la frecuencia de disparo de la neurona, como ejemplo ver la Figura 25c. En todas las neuronas estudiadas existió una  $R^2$  de  $0.07 \pm 0.9$ , lo cual indica que ninguna neurona de las que registramos fue sensible a los niveles de glucosa periférica.

Debido a que ninguna de las neuronas registradas fue sensible a los niveles periféricos de glucosa, se evaluó la proporción de neuronas que si eran moduladas bajo las transiciones de sueño e ingesta. En la Tabla 1 se indican la población total de las neuronas registradas (34 neuronas), señalándose el número de neuronas y el porcentaje de las que eran moduladas por ambos estados (sueño e ingesta) o solamente a un solo estado, así como también a que tipo neuronal putativamente se clasifican.

**Tabla 1 neuronas moduladas durante la ingesta de ensure (E) y el sueño (SWS)**

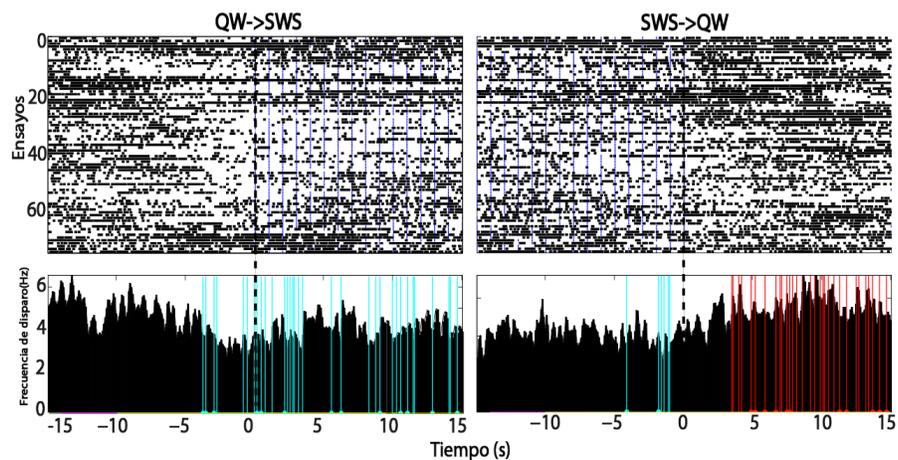
Tipo de respuesta (E/SWS)	No. de neuronas	pFSI	pChAT	pMSN	Sin clasificar
Inactiva/SWSoff	11 (32%)	4	3	5	5
Inactiva/SWSON	2 (6%)	1	2	2	1
Inactiva	2 (6%)	1	0	1	1
<i>subtotal</i>	15 (44%)	6	5	8	7
Activa/SWSoff	9 (26%)	0	1	1	1
Activa/SWSON	2 (6%)	0	1	0	1
Activa	1 (3%)	1	1	0	0
<i>subtotal</i>	12 (35%)	1	3	1	2
SWSoff	2 (6%)	0	0	1	0
SWSON	3 (9%)	0	0	0	0
Sin modulación	2 (6%)	0	0	0	0

Se identificaron dos poblaciones neuronales que modulaban su frecuencia de disparo durante la ingesta: “activas” (35%) e “inactivas” (44%). Estos resultados son similares a los reportados por Tellez et al (2012) y Krause et al (2011). En la Figura 26 se puede observar el raster plot y el PSTH (Histograma de tiempo postestímulo) de una neurona que es inactiva durante la ingesta de ensure. Se observa que durante la ingesta del ensure, enmarcada con CS-CE (inicio-terminio de la ingesta) esta neurona disminuye su frecuencia de disparo.



**Figura 27. Ejemplo representativo de una neurona de NAc shell que es inactivada durante la ingesta de ensure.** Las líneas rojas indican cada lengüeteo, las líneas negras los potenciales de acción, líneas punteadas verticales, el inicio y termino del lengüeteo (CS-CE), líneas verticales en color celeste y rojo, diferencia significativa en la frecuencia de disparo. El panel superior se grafica el raster plot para los ensayos y en panel inferior, se grafica el PSTH (Histograma de tiempo postestímulo).

Además de identificar neuronas que estaban siendo moduladas por la ingesta, también eran moduladas durante el sueño, con lo que logre establecer que el 62% (22/34) se inactivaban durante el periodo de sueño y, el 21% (7/34) se activaron. En la Figura 27 se muestra el raster plot y el PSTH de una neurona representativa que se inactivo durante el sueño.



**Figura 28** Neurona inactivada de NAc shell que se modulada durante el sueño. Las líneas negras los potenciales de acción, líneas punteadas verticales, las transiciones de despierto>sueño (QW>SWS), líneas verticales en color celeste y rojo, diferencia significativa en la frecuencia de disparo. El panel superior se grafica el raster plot para los ensayos y en panel inferior, se grafica el PSTH (Histograma de tiempo post-estímulo).

## 7. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se estudió si las neuronas del NAcS que están relacionadas a la alimentación (es decir que se activan o inhiben durante el consumo de Ensure), modulan su actividad no por el acto de comer *per se*, si no porque estén respondiendo a los distintos niveles periféricos de glucosa que se generan al comer. También identificamos si algún tipo de interneurona o MSN putativas es capaz de censar los niveles periféricos de glucosa. Para contestar estas preguntas se decidió realizar registros extracelulares del NAcS en ratas en libre movimiento, utilizando inyecciones intragástricas de glucosa y mientras mediamos los niveles de glucosa en sangre, sin estresar al animal. Nuestros datos indican que: a) las neuronas del núcleo accumbens Shell en general no son moduladas ante los incrementos glicémicos periféricos, b) esta red neuronal si es modulada durante los periodos de sueño y/o ingesta de ensure, c) aparentemente las tres principales poblaciones neuronales del NAcS (pFSI, pMSN, pChAT), incrementan o disminuyen su frecuencia de disparo durante las transiciones de sueño e ingesta de ensure, sin alguna preferencia por algún tipo, pero ningún tipo neuronal modula su actividad ante cambios glicémicos dentro del rango fisiológico.

*a) Correlación entre las neuronas que censan glucosa en núcleo accumbens shell con los niveles periféricos de glucosa.*

Estudios realizados por Papp et al (2007) demostró que existen neuronas que monitorean glucosa en NAcS, inyectando directamente en este sitio a concentraciones de 500 mM. En este trabajo se inyectó intragástricamente D-glucosa al 30 y 50% las cuales fueron suficientes para generar una ligera hiperglicemia fisiológica, dentro de los rangos

inducidos tras el consumo de ensure, tal como se puede observar en la Figura 22 donde el valor máximo de glucosa fue de ~8.3 mM, la cual ocurre normalmente al efectuarse un consumo de alimento (Dunn-Meynell et al., 2009).

Como se puede observar en la Figura 24c, se alcanzaron picos máximos al inyectar glucosa intragástricamente al 30 y 50% (6.6 mM y 7.8 mM, respectivamente) y 8.7 mM, durante el consumo de ensure, los cuales son suficientes para detectarse en NAcS (Kiyatkin & Lenoir, 2012). De hecho en un estudio previo de Kiyatjin & Lenoir 2012, utilizaron un microelectrodo especial para detectar con gran resolución el nivel de glucosa directamente en el NAcS, y demostraron que la inyección periférica de D-glucosa de concentraciones muy similares a las nuestras, sí incrementan ligeramente los niveles de glucosa en el NAcS. Lo que sugiere que nuestro procedimiento efectivamente incrementó la glucosa en el NAcS. Sin embargo, nosotros encontramos que no existió ninguna fluctuación de la actividad neuronal durante estos picos máximos. Resultados similares fueron arrojados al analizar a las demás neuronas registradas, lo cual nos indicó que las neuronas del NAcS no son sensibles a los incrementos periféricos de glucosa generados por el consumo de ensure, ya que al inyectarse solamente D-glucosa (30 y 50%) no se generó ninguna variación en la actividad neuronal. Como ya se había mencionado Papp et al (2007), en animales anestesiados encontró neuronas que monitorean glucosa, pero utilizando dosis fuera de los rangos fisiológicos de glucosa en el cerebro, en verdad ellos aplicaron directamente al NAcS una concentración de 500 mM de D-glucosa, mientras que la concentración fisiológica principalmente en el núcleo accumbens es de 540  $\mu$ M (Kiyatkin & Lenoir, 2012). De tal forma que concluimos que los datos

obtenidos por Papp et. al. no representan un cambio de la actividad fisiológico, si no más bien un efecto farmacológico.

*b) Modulación de las neuronas del NAcS durante los periodos de ingesta y/o sueño.*

Se encontraron neuronas que se modulaban durante los periodos de ingesta de ensure, siendo en mayor proporción las que se inactivan y en menor proporción las que se activan, como ejemplo es la Figura 27, en la cual se observa una disminución en la frecuencia de disparo durante el periodo de consumo de ensure. Estos resultados son consistentes con trabajos que indican modulaciones neuronales en el estriado ventral durante una comida altamente palatable (ensure)(Tellez et al., 2012), así como durante el periodo de consumo de sacarosa (Krause et al., 2010).

Con el análisis del hipnograma, se claramente observamos que las neuronas del núcleo accumbens shell modulaban su frecuencia de disparo durante las transiciones de sueño, lo cual también se ha reportado en otros trabajos (Braun et al., 1997).(Qiu, Vetrivelan, Fuller, & Lu, 2010). De hecho, datos previos de nuestro laboratorio también indican que la mayoría de las neuronas que se registraron en el NAcS se inhibían durante las transiciones de sueño, aunque también lo hicieron durante la ingesta de ensure (Tellez et al., 2012).

*c) Actividad de los distintos tipos neuronales del NAcS*

Con respecto a la clasificación neuronal, se encontró que los tres tipos neuronales eran modulados durante los periodos de ingesta sin que hubiera un tipo neuronal preferencial para el proceso de alimentación, lo cual puede ser observado en el cuadro 1. Este resultado esta de acuerdo con datos reportados por Tellez et al (2012) en donde

reportaron una proporción similar, tanto de neuronas que se activan e inactivan durante la alimentación.

Nuestros resultados indican que la mayoría de las neuronas que se inactivaban durante el sueño (sin tomar en cuenta su modulación con la ingesta de ensure), eran pMSN. Otros reportes muestran que las pMSN no modifican su frecuencia de disparo cuando la rata se encuentra en periodos de sueño y vigilia (Lansink, Goltstein, Lankelma, & Pennartz, 2010). Sin embargo, en el trabajo de Tellez et al. (2012) demostraron un incremento en la frecuencia de disparo durante transiciones de sueño-vigilia. Se pudo observar en este trabajo que la mayoría de las neuronas registradas fueron interneuronas, siendo que estas conforman sólo ~5% de la población total en el estriado, esto se debe a que las MSN presentan bajas frecuencias de disparo, lo cual es más difícil de detectar durante el registro en línea, generándonos relativamente un sesgo que facilita el registro de más interneuronas que MSN putativas.

## 8. CONCLUSIÓN

Nuestros resultados claramente indican que mediante inyecciones intragástricas de D-glucosa al 30 y 50%, la gran mayoría de las neuronas del núcleo accumbens shell no son capaces de censar los niveles periféricos de glucosa dentro de un rango fisiológico generado al comer Ensure. Es decir, las neuronas del núcleo accumbens shell que son moduladas por el consumo de ensure, no detectan los incrementos de glucosa periférico generados por el consumo de esta.

Las neuronas del núcleo accumbens shell son moduladas durante los periodos de sueño-ingesta y en su mayoría se inactivan ante ambas transiciones y los tipos neuronales del núcleo accumbens shell (pFSI, pMSN, pChAT) son modulados en las transiciones vigilia-sueño y durante la conducta alimentaria, sin ningún tipo neuronal preferencial. Nuestros resultados indican que el NAcS es una región del cerebro que además de participar en procesos de recompensa, también participa en el control neuronal del apetito, sin embargo parece no tener un papel clave para detectar los niveles periféricos de glucosa y por tanto en la homeostasis de la misma.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Amoroso, S., Schmidantomarchi, H., Fosset, M., & Lazdunski, M. (1990). Glucose, Sulfonylureas, and Neurotransmitter Release - Role of Atp-Sensitive K<sup>+</sup> Channels. *Science*, 247(4944), 852-854. doi: DOI 10.1126/science.2305257
- Atef, N., Ktorza, A., & Penicaud, L. (1995). Cns Involvement in the Glucose-Induced Increase of Islet Blood-Flow in Obese Zucker Rats. *International Journal of Obesity*, 19(2), 103-107.
- Ayala, J. E., Bracy, D. P., Malabanan, C., James, F. D., Ansari, T., Fueger, P. T., . . . Wasserman, D. H. (2011). Hyperinsulinemic-euglycemic clamps in conscious, unrestrained mice. [Research Support, N.I.H., Extramural Video-Audio Media]. *J Vis Exp*(57). doi: 10.3791/3188
- Ayala, J. E., Samuel, V. T., Morton, G. J., Obici, S., Croniger, C. M., Shulman, G. I., . . . McGuinness, O. P. (2010). Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice. [Research Support, N.I.H., Extramural]. *Dis Model Mech*, 3(9-10), 525-534. doi: 10.1242/dmm.006239
- Basso, A. M., & Kelley, A. E. (1999). Feeding induced by GABA(A) receptor stimulation within the nucleus accumbens shell: Regional mapping and characterization of macronutrient and taste preference. *Behavioral Neuroscience*, 113(2), 324-336. doi: Doi 10.1037//0735-7044.113.2.324
- Berke, J. D., Okatan, M., Skurski, J., & Eichenbaum, H. B. (2004). Oscillatory entrainment of striatal neurons in freely moving rats. *Neuron*, 43(6), 883-896. doi: 10.1016/j.neuron.2004.08.035  
S0896627304005628 [pii]
- Bingmer, M., Schiemann, J., Roeper, J., & Schneider, G. (2011). Measuring burstiness and regularity in oscillatory spike trains. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Neurosci Methods*, 201(2), 426-437. doi: 10.1016/j.jneumeth.2011.08.013
- Bolam, J. P., Wainer, B. H., & Smith, A. D. (1984). Characterization of Cholinergic Neurons in the Rat Neostriatum - a Combination of Choline-Acetyltransferase Immunocytochemistry, Golgi-Impregnation and Electron-Microscopy. *Neuroscience*, 12(3), 711-718. doi: Doi 10.1016/0306-4522(84)90165-9
- Braun, A. R., Balkin, T. J., Wesensten, N. J., Carson, R. E., Varga, M., Baldwin, P., . . . Herscovitch, P. (1997). Regional cerebral blood flow throughout the sleep-wake cycle - An (H<sub>2</sub>O)-O-15 PET study. *Brain*, 120, 1173-1197. doi: DOI 10.1093/brain/120.7.1173
- Burdakov, D., Luckman, S. M., & Verkhratsky, A. (2005). Glucose-sensing neurons of the hypothalamus. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 360(1464), 2227-2235. doi: 10.1098/rstb.2005.1763

- Chandrashekar, J., Hoon, M. A., Ryba, N. J. P., & Zuker, C. S. (2006). The receptors and cells for mammalian taste. *Nature*, *444*(7117), 288-294. doi: Doi 10.1038/Nature05401
- Deacon, C. F. (2005). What do we know about the secretion and degradation of incretin hormones? *Regul Pept*, *128*(2), 117-124. doi: DOI 10.1016/j.regpep.2004.06.007
- Dunn-Meynell, A. A., Rawson, N. E., & Levin, B. E. (1998). Distribution and phenotype of neurons containing the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel in rat brain. *Brain Research*, *814*(1-2), 41-54. doi: Doi 10.1016/S0006-8993(98)00956-1
- Dunn-Meynell, A. A., Sanders, N. M., Compton, D., Becker, T. C., Eiki, J., Zhang, B. B., & Levin, B. E. (2009). Relationship among Brain and Blood Glucose Levels and Spontaneous and Glucoprivic Feeding. *Journal of Neuroscience*, *29*(21), 7015-7022. doi: Doi 10.1523/Jneurosci.0334-09.2009
- During, M. J., Leone, P., Davis, K. E., Kerr, D., & Sherwin, R. S. (1995). Glucose modulates rat substantia nigra GABA release in vivo via ATP-sensitive potassium channels. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *J Clin Invest*, *95*(5), 2403-2408. doi: 10.1172/JCI117935
- Gervasoni, D., Lin, S. C., Ribeiro, S., Soares, E. S., Pantoja, J., & Nicolelis, M. A. L. (2004). Global forebrain dynamics predict rat behavioral states and their transitions. *Journal of Neuroscience*, *24*(49), 11137-11147. doi: Doi 10.1523/Jneurosci.3524-04.2004
- Gold, P. E. (1995). Role of glucose in regulating the brain and cognition. [Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review]. *Am J Clin Nutr*, *61*(4 Suppl), 987S-995S.
- Guillod-Maximin, E., Lorsignol, A., Alquier, T., & Penicaud, L. (2004). Acute intracarotid glucose injection towards the brain induces specific c-fos activation in hypothalamic nuclei: Involvement of astrocytes in cerebral glucose-sensing in rats. *Journal of Neuroendocrinology*, *16*(5), 464-471. doi: DOI 10.1111/j.1365-2826.2004.01185.x
- Gutierrez, R., Lobo, M. K., Zhang, F., & de Lecea, L. (2011). Neural integration of reward, arousal, and feeding: Recruitment of VTA, lateral hypothalamus, and ventral striatal neurons. *IUBMB Life*, *63*(10), 824-830. doi: 10.1002/iub.539
- Hall, A. C., Hoffmaster, R. M., Stern, E. L., Harrington, M. E., & Bickar, D. (1997). Suprachiasmatic nucleus neurons are glucose sensitive. [In Vitro Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *J Biol Rhythms*, *12*(5), 388-400.
- Heiser, A. (2007). *Rat jugular vein and carotid artery catheterization for acute survival studies*. New York: Springer.
- Humphries, M. D., & Prescott, T. J. (2010). The ventral basal ganglia, a selection mechanism at the crossroads of space, strategy, and reward. *Progress in Neurobiology*, *90*(4), 385-417. doi: DOI 10.1016/j.pneurobio.2009.11.003

- Jenkins, D. J. A., Wolever, T. M. S., Taylor, R. H., Barker, H., Fielden, H., Baldwin, J. M., . . . Goff, D. V. (1981). Glycemic Index of Foods - a Physiological-Basis for Carbohydrate Exchange. *American Journal of Clinical Nutrition*, 34(3), 362-366.
- Kang, L., Routh, V. H., Kuzhikandathil, E. V., Gaspers, L. D., & Levin, B. E. (2004). Physiological and molecular characteristics of rat hypothalamic ventromedial nucleus glucosensing neurons. *Diabetes*, 53(3), 549-559. doi: DOI 10.2337/diabetes.53.3.549
- Karadi, Z., Faludi, B., Lenard, L., Czurko, A., Niedetzky, C., Vida, I., & Nishino, H. (1995). Glucose-sensitive neurons of the globus pallidus: II. Complex functional attributes. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Brain Res Bull*, 37(2), 157-162.
- Karnani, M., & Burdakov, D. (2011). Multiple hypothalamic circuits sense and regulate glucose levels. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 300(1), R47-R55. doi: DOI 10.1152/ajpregu.00527.2010
- Kawaguchi, Y., Wilson, C. J., Augood, S. J., & Emson, P. C. (1995). Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. [Review]. *Trends in Neurosciences*, 18(12), 527-535.
- Kelley, A. E., Baldo, B. A., & Pratt, W. E. (2005). A proposed hypothalamic-thalamic-striatal axis for the integration of energy balance, arousal, and food reward. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Comp Neurol*, 493(1), 72-85. doi: 10.1002/cne.20769
- Kelley, A. E., & Swanson, C. J. (1997). Feeding induced by blockade of AMPA and kainate receptors within the ventral striatum: a microinfusion mapping study. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Behav Brain Res*, 89(1-2), 107-113.
- Kiyatkin, E. A., & Lenoir, M. (2012). Rapid fluctuations in extracellular brain glucose levels induced by natural arousing stimuli and intravenous cocaine: fueling the brain during neural activation. *Journal of Neurophysiology*, 108(6), 1669-1684. doi: DOI 10.1152/jn.00521.2012
- Koob, G. F., & Bloom, F. E. (1988). Cellular and Molecular Mechanisms of Drug-Dependence. *Science*, 242(4879), 715-723. doi: DOI 10.1126/science.2903550
- Kraegen, E. W., James, D. E., Bennett, S. P., & Chisholm, D. J. (1983). In vivo insulin sensitivity in the rat determined by euglycemic clamp. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Am J Physiol*, 245(1), E1-7.
- Krause, M., German, P. W., Taha, S. A., & Fields, H. L. (2010). A Pause in Nucleus Accumbens Neuron Firing Is Required to Initiate and Maintain Feeding. *Journal of Neuroscience*, 30(13), 4746-4756. doi: Doi 10.1523/Jneurosci.0197-10.2010
- Kravitz, A. V., Freeze, B. S., Parker, P. R., Kay, K., Thwin, M. T., Deisseroth, K., & Kreitzer, A. C. (2010). Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. [Research Support, N.I.H., Extramural

- Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Nature*, 466(7306), 622-626. doi: 10.1038/nature09159
- Kreitzer, A. C. (2009). Physiology and pharmacology of striatal neurons. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Annu Rev Neurosci*, 32, 127-147. doi: 10.1146/annurev.neuro.051508.135422
- Kubota, Y., Mikawa, S., & Kawaguchi, Y. (1993). Neostriatal GABAergic interneurons contain NOS, calretinin or parvalbumin. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Neuroreport*, 5(3), 205-208.
- Lansink, C. S., Goltstein, P. M., Lankelma, J. V., & Pennartz, C. M. A. (2010). Fast-spiking interneurons of the rat ventral striatum: temporal coordination of activity with principal cells and responsiveness to reward. *European Journal of Neuroscience*, 32(3), 494-508. doi: DOI 10.1111/j.1460-9568.2010.07293.x
- Levin, B. E. (2002). Metabolic sensors: viewing glucosensing neurons from a broader perspective. [Review]. *Physiol Behav*, 76(3), 397-401.
- Lukas, S. E., & Moreton, J. E. (1979). A technique for chronic intragastric drug administration in the rat. [Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.]. *Life Sci*, 25(7), 593-600.
- Maldonado-Irizarry, C. S., Swanson, C. J., & Kelley, A. E. (1995). Glutamate receptors in the nucleus accumbens shell control feeding behavior via the lateral hypothalamus. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *J Neurosci*, 15(10), 6779-6788.
- Maldonadoirizarry, C. S., & Kelley, A. E. (1994). Differential Behavioral-Effects Following Microinjection of an Nmda Antagonist into Nucleus-Accumbens Subregions. *Psychopharmacology*, 116(1), 65-72. doi: Doi 10.1007/Bf02244872
- Marty, N., Dallaporta, M., & Thorens, B. (2007). Brain glucose sensing, counterregulation, and energy homeostasis. [Review]. *Physiology (Bethesda)*, 22, 241-251. doi: 10.1152/physiol.00010.2007
- Mcdonald, R. J., & White, N. M. (1993). A Triple Dissociation of Memory-Systems - Hippocampus, Amygdala, and Dorsal Striatum. *Behavioral Neuroscience*, 107(1), 3-22. doi: Doi 10.1037/0735-7044.107.1.3
- McNay, E. C., Fries, T. M., & Gold, P. E. (2000). Decreases in rat extracellular hippocampal glucose concentration associated with cognitive demand during a spatial task. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(6), 2881-2885. doi: DOI 10.1073/pnas.050583697
- McNay, E. C., & Gold, P. E. (1999). Extracellular glucose concentrations in the rat hippocampus measured by zero-net-flux: Effects of microdialysis flow rate, strain, and age. *Journal of Neurochemistry*, 72(2), 785-790. doi: DOI 10.1046/j.1471-4159.1999.720785.x
- McNay, E. C., McCarty, R. C., & Gold, P. E. (2001). Fluctuations in brain glucose concentration during behavioral testing: Dissociations between brain areas and between brain and blood. *Neurobiology of Learning and Memory*, 75(3), 325-337. doi: DOI 10.1006/nlme.2000.3976

- Mogenson, G. J., Jones, D. L., & Yim, C. Y. (1980). From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Prog Neurobiol*, *14*(2-3), 69-97.
- Oomura, Y., Ooyama, H., Sugimori, M., Nakamura, T., & Yamada, Y. (1974). Glucose inhibition of the glucose-sensitive neurone in the rat lateral hypothalamus. *Nature*, *247*(439), 284-286.
- Papp, S., Lukats, B., Takacs, G., Szalay, C., & Karadi, Z. (2007). Glucose-monitoring neurons in the nucleus accumbens. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Neuroreport*, *18*(15), 1561-1565. doi: 10.1097/WNR.0b013e3281667eca
- Pittenger, C., Quinn, J., Lee, A. S., Taylor, J. R., & Duman, R. S. (2006). The mechanisms of habit: Analysis of striatum-dependent procedural learning in wild-type and CREB transgenic mice. *Neuropsychopharmacology*, *31*, S133-S133.
- Puschel, G. P. (2004). Control of hepatocyte metabolism by sympathetic and parasympathetic hepatic nerves. *Anatomical Record Part a-Discoveries in Molecular Cellular and Evolutionary Biology*, *280A*(1), 854-867. doi: Doi 10.1002/Ar.A.20091
- Qiu, M. H., Vetrivelan, R., Fuller, P. M., & Lu, J. (2010). Basal ganglia control of sleep-wake behavior and cortical activation. *European Journal of Neuroscience*, *31*(3), 499-507. doi: DOI 10.1111/j.1460-9568.2009.07062.x
- Ragozzino, M. E., & Gold, P. E. (1991). Glucose effects on mecamylamine-induced memory deficits and decreases in locomotor activity in mice. [Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Behav Neural Biol*, *56*(3), 271-282.
- Routh, V. H. (2002). Glucose-sensing neurons: Are they physiologically relevant? *Physiol Behav*, *76*(3), 403-413.
- Routh, V. H. (2010). Glucose Sensing Neurons in the Ventromedial Hypothalamus. *Sensors (Basel)*, *10*(10), 9002-9025. doi: 10.3390/s101009002
- Routh, V. H., Song, Z., & Liu, X. (2004). The role of glucosensing neurons in the detection of hypoglycemia. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review]. *Diabetes Technol Ther*, *6*(3), 413-421. doi: 10.1089/152091504774198133
- Schuit, F. C., Huypens, P., Heimberg, H., & Pipeleers, D. G. (2001). Glucose sensing in pancreatic beta-cells - A model for the study of other glucose-regulated cells in gut, pancreas, and hypothalamus. *Diabetes*, *50*(1), 1-11. doi: DOI 10.2337/diabetes.50.1.1
- Shimizu, N., Oomura, Y., Novin, D., Grijalva, C. V., & Cooper, P. H. (1983). Functional Correlations between Lateral Hypothalamic Glucose-Sensitive Neurons and Hepatic Portal Glucose-Sensitive Units in Rat. *Brain Res*, *265*(1), 49-54.
- Silver, I. A., & Erecinska, M. (1998a). Glucose-induced intracellular ion changes in sugar-sensitive hypothalamic neurons. *Journal of Neurophysiology*, *79*(4), 1733-1745.

- Silver, I. A., & Erecinska, M. (1998b). Glucose-induced intracellular ion changes in sugar-sensitive hypothalamic neurons. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Journal of Neurophysiology*, *79*(4), 1733-1745.
- St-Onge, M. P., McReynolds, A., Trivedi, Z. B., Roberts, A. L., Sy, M., & Hirsch, J. (2012). Sleep restriction leads to increased activation of brain regions sensitive to food stimuli. *American Journal of Clinical Nutrition*, *95*(4), 818-824. doi: DOI 10.3945/ajcn.111.027383
- Stratford, T. R., & Kelley, A. E. (1997). GABA in the nucleus accumbens shell participates in the central regulation of feeding behavior. *Journal of Neuroscience*, *17*(11), 4434-4440.
- Tellez, L. A., Perez, I. O., Simon, S. A., & Gutierrez, R. (2012). Transitions between sleep and feeding states in rat ventral striatum neurons. *Journal of Neurophysiology*, *108*(6), 1739-1751. doi: DOI 10.1152/jn.00394.2012
- Tepper, J. M., & Bolam, J. P. (2004). Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Current Opinion in Neurobiology*, *14*(6), 685-692. doi: DOI 10.1016/j.conb.2004.10.003
- Thrivikraman, K. V., Huot, R. L., & Plotsky, P. M. (2002). Jugular vein catheterization for repeated blood sampling in the unrestrained conscious rat. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Brain Res Brain Res Protoc*, *10*(2), 84-94.
- Vazquez, M. E., Petrone, F., & Levitin, H. P. (1981). A simple method of permanent gastric cannulation in laboratory rodents. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Res Exp Med (Berl)*, *179*(2), 99-102.
- Wang, R., Liu, X., Hentges, S. T., Dunn-Meynell, A. A., Levin, B. E., Wang, W., & Routh, V. H. (2004). The regulation of glucose-excited neurons in the hypothalamic arcuate nucleus by glucose and feeding-relevant peptides. *Diabetes*, *53*(8), 1959-1965. doi: DOI 10.2337/diabetes.53.8.1959
- Yang, X. J., Kow, L. M., Funabashi, T., & Mobbs, C. V. (1999). Hypothalamic glucose sensor - Similarities to and differences from pancreatic beta-cell mechanisms. *Diabetes*, *48*(9), 1763-1772. doi: DOI 10.2337/diabetes.48.9.1763
- Yang, X. J., Kow, L. M., Pfaff, D. W., & Mobbs, C. V. (2004). Metabolic pathways that mediate inhibition of hypothalamic neurons by glucose. *Diabetes*, *53*(1), 67-73.
- Yarom, O., & Cohen, D. (2011). Putative cholinergic interneurons in the ventral and dorsal regions of the striatum have distinct roles in a two choice alternative association task. *Front Syst Neurosci*, *5*, 36. doi: 10.3389/fnsys.2011.00036
- Yelnik, J. (2002). Functional anatomy of the basal ganglia. *Movement Disorders*, *17*, S15-S21. doi: Doi 10.1002/Mds.10138
- Young, W. G., & Deutsch, J. A. (1981). The Construction, Surgical Implantation, and Use of Gastric Catheters and a Pyloric Cuff. *Journal of Neuroscience Methods*, *3*(4), 377-384. doi: Doi 10.1016/0165-0270(81)90025-X
- Zoltan Karadi, B. L., Szilard Papp, Gabor Takacs,, & Robert Egyed1, L. L. (2004). The central glucose-monitoring neural network: major protector of the adaptive

homeostatic balance for well being of the organism. *International Congress Series, 1269*, 30-33.