# Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas Área Biología Subárea Neurociencias

Tesis de Maestría

# "Efecto de la Hormona Concentradora de Melanina sobre la actividad neuronal del núcleo mediano del rafe"

Dra. Claudia Pascovich Rognoni

Laboratorio de Neurobiología del Sueño Departamento de Fisiología Facultad de Medicina Universidad de la República

Orientador: Dr. Pablo Torterolo

Co-orientador: Dra. Alicia Costa

Montevideo, 22 de diciembre de 2015

# Agradecimientos

*Quería agradecer a las distintas personas que me han ayudado de alguna forma en este trabajo:* 

A mis tutores, Pablo Torterolo y Alicia Costa por su gran aporte en mi formación académica, y su invalorable ayuda en la generación del presente trabajo, desde la planificación de los experimentos, la realización de los mismos y la escritura de la tesis.

Se agradece especialmente a las personas que colaboraron directamente con este trabajo o aportaron al mismo: Patricia Lagos, Andrea Devera, Helena Deutch, Mayda Rivas, Patricia Vollono, Luciana Benedetto, Natalia Schwarkopf, Matías Cavelli y Atilio Falconi.

Se agradece también a las instituciones que financiaron y/o hicieron posible la realización de este trabajo: Facultad de Medicina, UdelaR, Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) y Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PE.DE.CI.BA).

# Contenido

ABREVIATURAS					
R	ESU	MEN	5		
PRESENTACIÓN DE TESIS					
1.		FUNDAMENTOS Y ANTECEDENTES	8		
	1.1	1 Sistema serotoninérgico	. 8		
		1.1.1 Consideraciones anatómicas del sistema serotoninérgico	. 8		
		1.1.2 Núcleo mediano del rafe	. 9		
		Tipos neuronales	. 9		
		Proyecciones del NMR	11		
		Consideraciones funcionales	13		
		1.1.3 Características electrofisiológicas de las neuronas serotoninérgicas	14		
		1.1.4 Electrofisiología del NMR	16		
		1.1.5 Modulación de las neuronas serotoninérgicas	18		
	1.2	2 Sistema MCHérgico	19		
		1.2.1 Hormona concentradora de melanina (MCH)	19		
		1.2.2 Proyecciones y receptores MCHérgicos	20		
		1.2.3 Rol del sistema MCHérgico en el control del sueño	23		
		1.2.4 Rol del sistema MCHérgico en la fisiopatología de la depresión mayor	26		
2.		HIPÓTESIS	28		
3.		OBJETIVOS	29		
	3.1	1 Objetivo general	29		
	3.2	2 Objetivos específicos	29		
4.		ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	29		
5.		METODOLOGÍA	30		
	5.1	1 Preparación del animal	30		
	5.2	2 Sistema de registro	31		
	5.3	3 Administración de MCH y antagonistas	31		
	5.4	4 Iontoforesis yuxtacelular	32		
	5.5	5 Protocolo de estimulación del hipotálamo posterolateral	33		
	5.6	5 Procesamiento de datos	33		
	5.7	7 Análisis estadístico	34		
	5.8	3 Procedimientos histológicos	34		
	5.9	9 Histoquímica	35		
		5.9.1 Revelado de neurobiotina con DAB	35		

	5.9.2 Revelado de neurobiotina con streptavidina			
	5.9.3 Inmunofluorescencia para serotonina			
	5.10 Comparación con neuronas del NDR			
6.	RESULTADOS			
	6.1 Localización de las neuronas registradas en el NMR			
	6.2 Caracterización electrofisiológica de las neuronas registradas en el NMR			
	6.3 Efecto de la administración intracerebroventricular de MCH			
	6.4 Efecto de la administración yuxtacelular de MCH y del antagonista de MCHR-1 48			
	6.5 Efecto de la MCH según las características electrofisiológicas de las neuronas			
	6.6 Comparación con las neuronas del NDR 56			
	6.7 Efecto de la estimulación hipotalámica sobre las neuronas del NMR			
	6.8 Efectos de la estimulación hipotalámica sobre las neuronas serotoninérgicas $60$			
7. DISCUSIÓN				
	7.1 Características electrofisiológicas de las neuronas registradas en el NMR			
	7.2 Efecto de la MCH sobre las neuronas del NMR			
	7.3 Efecto de la estimulación del HPL			
	2.4 MCH inhibe fisiológicamente las neuronas del NMR?			
	7.5 Efecto de la MCH en las neuronas serotoninérgicas			
	7.6 Diferencias en el efecto de la MCH en las neuronas del NMR y NDR 69			
7.7 Significado biológico del efecto de la MCH en el NMR. Fisiología y fisiopatología70				
	7.7.1 Relación con la fisiología del sueño			
	7.7.2 Relación con la fisiopatología de la depresión mayor $70$			
8.	CONCLUSIONES71			
9.	PERSPECTIVAS Y RESULTADOS PRELIMINARES72			
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS				
ANEXO				

# ABREVIATURAS

AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
CHEA	Comisión Honoraria de Experimentación Animal
CV	Coeficiente de variación
DM	Depresión Mayor
EEG	Electroencefalograma
GABA	Ácido gammaaminobutírico
GAD 67	Glutamato Descarboxilasa 67
FLM	Fascículo longitudinal medial
HAC	Histograma de autocorrelación
ні	Histograma de intervalos
HPL	Hipotálamo posterolateral
i.c.v.	Intracerebroventricular
ISRS	Inhibidores de la recaptación de serotonina
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico de tipo 1
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LDT-PPT	Tegmento latero-dorsal y pedúnculo-pontino
NDR	Núcleo dorsal del rafe
NDS	Suero normal de burro
NPO	Núcleo pontis oralis
NMR	Núcleo mediano del rafe
MCH	Hormona concentradora de melanina
MCH-R	MCH conjugada con rodamina
PA	Potencial de acción
PBS	Buffer fosfato salino
PFA	Paraformaldehído
PGO	Ponto-genículo-occipitales
PPSE	Potencial postsináptico excitatorio
RAPG	Receptores acoplados a proteínas G
SNC	Sistema nervioso central
SREM	Sueño de movimientos oculares rápidos
SNREM	Sueño no REM
URBE	Unidad de Reactivos para Biomodelos de Experimentación
5-HT	Serotonina
5-Htérgico	Serotoninérgico

#### RESUMEN

Las neuronas que utilizan a la hormona concentradora de melanina (MCH) como neuromodulador promueven la generación y el mantenimiento del sueño. Estas neuronas, localizadas en el hipotálamo posterolateral (HPL) y zona incerto-hipotalámica, proyectan a diversas regiones del sistema nervioso central, entre las que se encuentran el núcleo dorsal del rafe (NDR) y el núcleo mediano del rafe (NMR). Estos núcleos tienen una elevada densidad de neuronas serotoninérgicas que están involucradas en el control de la vigilia y del sueño de movimientos oculares rápidos (SREM), así como en la fisiopatología de la depresión mayor (DM).

Dado que experimentos previos de nuestro grupo muestran que la MCH disminuye la descarga de las neuronas del NDR (Devera, Pascovich y col., 2015), hipotetizamos que la MCH también producirá un efecto similar en las neuronas del NMR. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue caracterizar en primera instancia el perfil electrofisiológico de las neuronas registradas del NMR, para luego estudiar y analizar la modulación MCHérgica de las mismas.

Con este objetivo utilizamos ratas anestesiadas con el fin de registrar y analizar las características electrofisiológicas de las neuronas del NMR y el efecto de microinyecciones intracerebroventriculares (i.c.v.) de MCH sobre sus patrones de descarga. También estudiamos el efecto de la administración yuxtacelular de MCH y de un antagonista del receptor tipo I de MCH (MCHR-1) (ATC0175), sobre la actividad de dichas neuronas. Se analizó además el efecto de la estimulación eléctrica del HPL, lugar donde se ubican los somas de las neuronas MCHérgicas, sobre la descarga de las neuronas registradas. Parte de estas neuronas fueron marcadas con neurobiotina y posteriormente se analizó su fenotipo neuroquímico mediante inmunofluorescencia para serotonina. Por último, comparamos el efecto producido por la MCH sobre las neuronas del NMR con el efecto producido sobre las neuronas del NDR, estas últimas registradas y analizadas en nuestro trabajo anterior (Devera, Pascovich y col., 2015).

En el presente trabajo se registraron 107 neuronas en el NMR con las siguientes características generales: PA con una duración de 4,3  $\pm$  0,8 ms, una frecuencia de descarga basal de 8,8  $\pm$  11,1 Hz y con un coeficiente de variación de 0,43. La distribución de frecuencias de descarga en todas las neuronas registradas, sugiere la existencia de tres grupos neuronales: el más numeroso presenta frecuencias de descarga menores a 4 Hz, le sigue un grupo con frecuencias entre 4 y 10 Hz y finalmente el grupo con frecuencias mayores a 10 Hz. El 79% del total de neuronas registradas exhibió un histograma de intervalos unimodal y el 53% presentó un patrón rítmico o un intervalo predominante en el histograma de autocorrelación. En 23

neuronas del total de las neuronas registradas se estudió su relación con el ritmo theta de las cuales 12 neuronas (52%) fueron theta-on, 6 neuronas (26%) theta-off y 5 (22%) no presentaron relación alguna con éste. En 3 neuronas de 31 estimuladas en el HPL (10%) se identificó una respuesta antidrómica. Una de ellas se identificó como serotoninérgica.

El 53% de las neuronas registradas que fueron tratadas con MCH i.c.v., mostraron una disminución significativa en su frecuencia de descarga (de 7,2  $\pm$  2,0 Hz a 4,4  $\pm$  1,9 Hz). Éste efecto presentó una latencia promedio de 156,7  $\pm$  29,1 s y una duración de 389,6  $\pm$  95,8 s. La administración yuxtacelular de MCH disminuyó la frecuencia de descarga en el 65% de las neuronas; esta pasó de 3,9  $\pm$  0,2 Hz a 2,4  $\pm$  0,2 Hz. La latencia y duración del efecto fue de 30,4  $\pm$  9,7 s y 118,9  $\pm$  39,8 s, respectivamente. Por el contrario, la administración yuxtacelular del antagonista de MCHR-1 produjo un aumento de la frecuencia de descarga de 4,7  $\pm$  2,3 Hz a 8,3  $\pm$  3,5 Hz. Microinyecciones control de los vehículos utilizados (salina o DMSO) no produjeron ningún efecto. De todas las neuronas que mostraron disminución de su frecuencia de descarga con MCH, un 57% fueron presumiblemente serotoninérgicas según sus características electrofisiológicas.

La estimulación eléctrica del HPL disminuyó la frecuencia de descarga en 46% de las neuronas y produjo un aumento de la frecuencia de descarga en 32%. De todas estas neuronas, tres fueron marcadas exitosamente con neurobiotina y resultaron ser serotoninérgicas: una fue inhibida por la estimulación hipotalámica, otra presentó efecto excitatorio y la restante no modificó su frecuencia de descarga.

Al comparar estos datos con los resultados obtenidos en nuestro trabajo previo (Devera, Pascovich y col., 2015), la proporción de neuronas que mostraron disminución en su frecuencia de descarga luego de la administración de MCH fue del 61% en el NMR y del 70% en el NDR. De las neuronas del NMR que disminuyeron su descarga, 57% presentaron tres o más características electrofisiológicas clásicas de neuronas serotoninérgicas, mientras que el 80% de las neuronas del NDR que se inhibieron con MCH fueron presumiblemente serotoninérgicas (siendo estas diferencias no significativas).

En el presente trabajo hemos demostrando que la MCH disminuye la frecuencia de descarga de la mayoría de las neuronas del NMR, presentando algunas de ellas, características de neuronas serotoninérgicas. La disminución de la actividad de las neuronas serotoninérgicas del NMR, podría participar en la generación y/o mantenimiento del SREM y en la fisiopatología de la DM.

6

# PRESENTACIÓN DE TESIS

Este trabajo de tesis se enmarca dentro de un proyecto de investigación más amplio que tiene como objetivo estudiar el papel de la hormona concentradora de melanina (MCH) en la fisiología del sueño y la fisiopatología de la depresión mayor.

En este sentido, nuestro grupo ha demostrado la participación del sistema MCHérgico en la modulación del sueño, donde la MCH actuaría como factor hipnogénico (Monti y col., 2013, Torterolo P, 2010). Por otra parte, hemos puesto en evidencia que la MCH produce un efecto pro-depresivo en la rata al ser microinyectada en el núcleo dorsal del rafe (Lagos y col., 2011b, Urbanavicius y col., 2014) y en el núcleo mediano del rafe (NMR) (Lopez Hill y col., 2013). Acorde con esto, hemos demostrado que la MCH inhibe las neuronas del NDR (Devera, Pascovich y col., 2015). A partir de estos antecedentes se desprende el objetivo del presente trabajo, que es el estudio del efecto de la MCH sobre la actividad de las neuronas del NMR.

Este trabajo fue financiado por la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) y el Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA).

# **1. FUNDAMENTOS Y ANTECEDENTES**

# 1.1 Sistema serotoninérgico

El sistema serotoninérgico es uno de los sistemas neuroquímicos más distribuidos en el sistema nervioso central (SNC) de los vertebrados. Este juega un rol importante en diversas funciones entre las que se destacan analgesia, dolor, termorregulación, ingesta, funciones motoras, autonómicas y el ciclo sueño-vigilia (Jacobs y Azmitia, 1992, Portas y col., 2000, Wang y Nakai, 1994). Los cuerpos celulares de las neuronas serotoninérgicas están localizados en el tronco encefálico y definen varios núcleos (Jacobs y Azmitia, 1992). Entre ellos se encuentran el núcleo dorsal del rafe (NDR) y el núcleo mediano del rafe (NMR) (Lechin y col., 2006). Ambos núcleos son el origen de la gran mayoría de las fibras serotoninérgicas que inervan las estructuras del cerebro anterior (Jacobs y Azmitia, 1992). Se destaca que en comparación con el NDR son pocos los estudios centrados en el NMR; esto se debe principalmente a que en el primero existe un mayor número y densidad de neuronas serotoninérgicas (Wiklund y col., 1981).

#### 1.1.1 Consideraciones anatómicas del sistema serotoninérgico

Los cuerpos celulares de las neuronas serotoninérgicas están localizados principalmente en el tronco encefálico en o cerca de la línea media. Estos pueden ser divididos en dos grupos: el superior y el inferior (Figura 1), y se clasificaron en "clusters" denominadas B1 a B9 (Dahlstroem y Fuxe, 1964). El grupo superior consiste en 4 núcleos principales: núcleo caudal linear (B8), NMR (B8 y B5, también llamado núcleo centralis superior), las neuronas laterales dorsales al lemnisco medial (B9) y el NDR (B7 y B6). El grupo inferior consiste en 5 núcleos principales: I) núcleo del rafe obscurus (B2); II) núcleo del rafe pallidus (B1); III) núcleo del rafe magnus (B3); IV) las neuronas en la médula ventrolateral (núcleo lateral paragigantocelular), y el núcleo reticular intermedio (B2/B3); V) área postrema. Un grupo adicional de células serotoninérgicas se ha identificado en el núcleo dorsomedial del hipotálamo (Jacobs y Azmitia, 1992).

Las fibras serotoninérgicas que proyectan al cerebro anterior se originan principalmente en el grupo superior y desempeñan importantes funciones reguladoras en el control cardiovascular y termorregulador del hipotálamo, y regulan la actividad de las neuronas corticales (Saper, 2000). Se han descrito dos vías ascendentes principales en el primate. Una es la vía dorsal, que se extiende ventral al fascículo longitudinal medial. Esta se origina a nivel del locus coeruleus y recibe fibras de las alas laterales del NDR y el núcleo ventromedial del NDR. Un segundo haz de fibras serotoninérgicas, corre ventral y lateral al NMR. Este se origina a nivel del núcleo troclear y recibe fibras del NDR medio y NMR (Schofield y Everitt, 1981). El núcleo magno del rafe (B4), situado a nivel de la parte rostral del bulbo, se proyecta al asta posterior de la médula, y participa en el procesamiento del dolor (Ossipov y col., 2010). Las neuronas de los grupos celulares B1-B3 envían proyecciones descendentes a los sistemas motor y autónomo de la médula espinal (Saper, 2000).



**Figura 1. Neuronas serotoninérgicas y sus principales proyecciones**. Esquema de un corte sagital del encéfalo de la rata. Las neuronas de los grupos B1-3, que corresponden a los núcleos del rafe magno, el rafe pálido y el rafe oscuro, se proyectan a la parte inferior del tronco encefálico y la médula espinal. Las neuronas de los grupos B4-9, que incluye los núcleos de los rafes pontino, mediano y dorsal, se proyectan a la parte superior del tronco encefálico, el hipotálamo, el tálamo y la corteza cerebral. CD, núcleo caudado; HF, formación del hipocampo; H, hipotálamo; Th, tálamo. Tomado de Saper (2000).

# 1.1.2 Núcleo mediano del rafe

#### **Tipos neuronales**

El NMR es un grupo de células medianas y paramedianas que se ubican ventrales al NDR y caudales a la decusación cerebelar superior. Este grupo tiene una orientación rostrocaudal oblicua. Rostralmente las células terminan en la parte caudal del núcleo interpeduncular. Caudalmente, el borde ventral de este grupo es el cuerpo trapezoide, y el borde dorsal se fusiona con el componente ventromedial (interfascicular) del NDR (Jacobs y Azmitia, 1992).

Las neuronas del NMR están organizadas en dos regiones contiguas diferentes: en la línea media las neuronas se encuentran densamente empaquetadas, mientras que en la periferia del núcleo las neuronas están distribuidas de manera más dispersa como lo dibuja Ramón y Cajal (Figura 2) (Adell y col., 2002).



**Figura 2.** Dibujo original hecho por Ramón y Cajal de un corte coronal del NMR del gato adulto. Tomado de Adell y col. (2002).

El NMR es el núcleo con mayor contenido de neuronas serotoninérgicas (aproximadamente 1.100 en la rata) después del NDR (aproximadamente 11.500) (Jacobs y Azmitia, 1992). Las neuronas serotoninérgicas del NMR constituyen un 20-30% del total de neuronas del núcleo (Vertes y Crane, 1997).

El NMR también presenta neuronas GABAérgicas aunque en menor número (Stamp y Semba, 1995). Su distribución es diferente a la de las serotoninérgicas. Mientras que las neuronas serotoninérgicas se localizan principalmente en la línea media, las GABAérgicas se encuentran tanto en la línea media como en las regiones laterales del núcleo en toda su extensión anteroposterior (Calizo y col., 2011). Sin embargo, existe cierto grado de colocalización de ácido gammaaminobutírico (GABA) y serotonina (Belin y col., 1983, Calizo y col., 2011, Stamp y Semba, 1995). Así, un subtipo de neuronas del NMR podría liberar ambos neurotransmisores tanto a nivel local del NMR, como en sus sitios de proyección en el cerebro anterior.

Si bien inicialmente se creía que las neuronas GABAérgicas del NMR funcionaban como interneuronas, algunos estudios proporcionan evidencia de que envían proyecciones a estructuras del cerebro anterior (Puig y col., 2005). En el NMR también se han detectado neuronas glutamatérgicas (evidenciadas por inmunofluorescencia contra vGlut3; transportador vesicular de glutamato). El vGlut3 fue encontrado colocalizando en las neuronas serotoninérgicas y en las células no-serotoninérgicas laterales (Calizo y col., 2011).

#### Proyecciones del NMR

Las proyecciones desde el NMR descienden a lo largo de la línea media en el tronco encefálico y ascienden principalmente a través del haz medial del prosencéfalo hacia el cerebro anterior. Las fibras del NMR se distribuyen densamente en los siguientes sitios del tronco y cerebro anterior: núcleo del rafe caudal, núcleo tegmental laterodorsal, NDR, núcleo interpeduncular, cuerpo mamilar medial, núcleo supramamilar, núcleo posterior y región perifornical del hipotálamo, núcleo medial e intralaminar del tálamo, región dopaminérgica de la zona incerta, habénula lateral, vertientes diagonal y vertical de la banda diagonal, septo medial y formación del hipocampo. Virtualmente todas estas estructuras se encuentran en las cercanías de la línea media, indicando que el NMR representa un sistema de proyección medial/paramedial. Por otra parte, las proyecciones del NMR a la corteza cerebral son escasas. El NMR proyecta moderadamente a la corteza perirrinal, entorrinal y frontal. Una comparación de las proyecciones del NMR y NDR muestra que éstas se distribuyen en regiones que en la mayoría de los casos no se superponen en el cerebro anterior, sino que proyectan a regiones complementarias (Vertes y col., 1999). En la Figura 3 se muestran esquemas de las principales proyecciones de ambos núcleos.

11





Figura 3. (A) Esquema de una sección sagital medial del cerebro de la rata que resume las principales proyecciones del NMR. Las líneas punteadas indican las fibras que pasan a través de estructuras. (B) Esquema de una sección sagital lateral que resume las principales proyecciones del NDR. Los puntos en A y B representan las neuronas del rafe medial y dorsal, respectivamente. Como se ilustra, el NMR y NDR esencialmente proyectan a sitios que no se superponen en el tronco encefálico y cerebro anterior. Tomado de Vertes y col. (1999). Abreviaturas: AC, comisura anterior; ACC, núcleo accumbens; AGm, corteza frontal medial; AMYG, amígdala; BST, núcleo de la stria terrminalis; C, cerebelo; CC, cuerpo calloso; CG, sustancia gris periacueductal; DR, rafe dorsal; EC, corteza entorrinal; F, fórnix; FL-HL, corteza del área del miembro superior e inferior; HF, formación hipocampal; IC, colículo inferior; InC, corteza insular; IP, núcleo interpeduncular; MB, cuerpos mamilares; MgPo, núcleo preóptico magnocelular; MR, rafe medial; MS-DB, septo medial-banda diagonal; NGC, núcleo gigantocelular; LDT, tegmento laterodorsal; LH, habénula lateral; LHy, hipotálamo lateral; ILr, núcleo intralaminar del tálamo grupo rostral; PrC, corteza perirrinal; PH, núcleo posterior del hipotálamo; PF, núcleo parafascicular del tálamo; PFo, región perifornical del hipotálamo; PPT, tegmento pedunculopontino; RE, núcleo reuniens del tálamo; SC, colículo superior; SUM, núcleo supramamilar; RP, rafe pontis; RPC, núcleo pontis caudalis; RPO, núcleo pontis oralis; RM, rafe magnus; OX, quiasma óptico; LC, locus coeruleus; LV, ventrículo lateral; OcC, corteza occipital; PiC, corteza piriforme; SNC, sustancia nigra, pars compacta;VTA, área tegmental ventral; ZI, zona incerta; 3v, tercer ventrículo; 4v cuarto ventrículo.

#### **Consideraciones funcionales**

Se ha visto que el NMR se asocia con la actividad motora. La destrucción química de las neuronas serotoninérgicas del NMR con 5,7-dihidroxitriptamina (5,7-DHT), produce una disminución permanente de la actividad locomotora (Salles y Salles, 1980). Sin embargo, la microinfusión de un agonista selectivo del receptor 5-HT<sub>1A</sub> (8-OH DPAT) en el NMR, el cuál inhibe la actividad de las neuronas serotoninérgicas, produce hiperactividad comportamental general, contrario a lo que ocurre en el NDR, con una disminución de ciertos comportamientos, tales como pararse en las patas traseras ("rearing") y acicalarse.

Por otro lado, también existe evidencia que apoya la participación del NMR en la respuesta al estrés. Tanto estresores leves como intensos, promueven la liberación de serotonina en el NMR, sin afectarla a nivel del NDR (Adell y col., 1997). Además se ha sugerido que las neuronas del NMR están involucradas en la liberación de renina durante el estrés (Van de Kar y col., 1984). Sin embargo, la lesión química de las neuronas serotoninérgicas el NMR, genera un comportamiento de tipo ansiogénico en animales en condiciones de estrés crónico (Netto y col., 2002), así como un aumento en la generación de úlceras gástricas por estrés (Andrade y Graeff, 2001).

Con respecto al control del dolor, la lesión electrolítica del NMR antagoniza la analgesia con morfina mientras que la destrucción de las neuronas serotoninérgicas de este núcleo no produce tal efecto, por lo cual el sustrato de este núcleo que media esta acción es todavía desconocido (Romandini y col., 1986). Sin embargo, la lesión del NDR aumenta la reactividad y la agresión evocada por dolor mientras que la lesión del NMR no tuvo tal efecto (Jacobs y Cohen, 1976, Przewlocka y col., 1977).

Los experimentos de lesión del NMR ponen en evidencia otras funciones en las cuales este participa tales como, la lactancia (Barofsky y Harney, 1978), el comportamiento maternal (Barofsky y col., 1983, Yurino y col., 2001), el ciclo ovárico (Meyer, 1978, Shimizu y Yamanouchi, 2011), la función reproductiva y sexual masculina (Albinsson y col., 1996, Kondo y Yamanouchi, 1997, Matsumoto y Yamanouchi, 1997, Monaghan y col., 1993), la ingesta de alimento y la obesidad (Coscina y Stancer, 1977, Salles y Salles, 1980, Shahid Salles y col., 1979), la agresividad (Koprowska y Romaniuk, 1997, Kostowski y col., 1975), la interacción social, (File y col., 1979), la motivación (Adell y Myers, 1995, Fletcher, 1995, Wogar y col., 1992), el miedo (Avanzi y col., 1998, Silva y col., 2002), el aprendizaje (Mosier y col., 1990, Thompson y col., 1989, Wirtshafter y Asin, 1986) y la memoria de trabajo (Babar y col., 2002a, Babar y col., 2002b). Existen evidencias que muestran la participación de las neuronas serotoninérgicas del NMR en la fisiología del ciclo sueño-vigilia (Peyron y col., 2009, Portas y col., 2000, Rasmussen y col., 1984).

Por último, estudios de nuestro grupo de investigación muestran que la administración de la hormona concentradora de melanina (MCH) en el NMR tiene un efecto pro-depresivo en la rata (Lopez Hill, Pascovich y col., 2014). Esto, junto con otras evidencias adicionales, sugiere una posible participación del NMR en la regulación de los estados emocionales.

#### 1.1.3 Características electrofisiológicas de las neuronas serotoninérgicas

La mayoría de los estudios que han contribuido a la caracterización de las neuronas serotoninérgicas, han sido realizados en el NDR. Es por esta razón que comentaremos inicialmente las características de las neuronas serotoninérgicas en este núcleo.

Los primeros estudios realizados utilizando técnicas de registro extracelular en ratas anestesiadas, detectaron neuronas en el NDR que descargaban espontáneamente, en forma regular (Aghajanian, 1972, Blier y col., 1990, Sawyer y col., 1985). Estudios en varias especies, empleando una gran variedad de preparaciones experimentales mostraron que las neuronas serotoninérgicas del NDR presentan característicamente una actividad espontánea con una frecuencia de descarga lenta (1-5 Hz) y regular descritas como tipo reloj ("clock-like") (Aghajanian y Vandermaelen, 1982a). Este patrón de descarga único serviría como una "firma neuronal" para este grupo neuroquímico de células del tronco encefálico (Jacobs y Azmitia, 1992). Los potenciales de acción (PA) extracelulares de estas neuronas presentan una deflexión positiva prominente, seguida por una deflexión negativa o negativa/positiva. La primera deflexión positiva más la primera deflexión negativa tiene una duración mayor de 1,4 ms (Aghajanian y col., 1978, Hajos y col., 1995). Las características electrofisiológicas de estas neuronas han sido demostradas en varias especies y en ausencia de anestesia (Jacobs y Fornal, 1991, Mundey y col., 1994).

Estas neuronas son inhibidas por agonistas 5-HT<sub>1A</sub>. Los receptores 5-HT<sub>1A</sub> son autoreceptores somatodendríticos, presentes en el NDR (y también en el NMR), que controlan la frecuencia de descarga de las neuronas serotoninérgicas (Arborelius y col., 1994, Blier y col., 1990, Jacobs y Azmitia, 1992, Sawyer y col., 1985, Sprouse y Aghajanian, 1987).

El patrón de descarga extraordinariamente regular de las neuronas serotoninérgicas llevó a la especulación de que podría ser endógeno, comandado por un marcapaso intrínseco.

Acorde con esto, la mayoría de las neuronas examinadas en condiciones *in vitro* presentan un patrón de descarga indistinguible del observado *in vivo* (Mosko y Jacobs, 1976). Registros intracelulares *in vitro* muestran que estas células presentan una larga hiperpolarización postpotencial (HPP) seguido de una gradual despolarización, sin evidencia de potencial postsináptico excitatorio (PPSE) (Aghajanian y Vandermaelen, 1982b, Crunelli y col., 1983).

Hajos y col. en 1995 describieron una propiedad electrofisiológica adicional de una subpoblación de neuronas serotoninérgicas. Estas neuronas, durante su descarga regular presentaban brotes de espigas (de 2 a 4 espigas) (Hajos y col., 2007, Hajos y col., 1995) (Figura 4).



Figura 4. Características electrofisiológicas de una neurona del NDR que descarga en dobletes. (A) Registro extracelular que muestra un patrón de descarga regular y lento. Tres de 26 espigas en este segmento eran dobletes (\*). (B) Ejemplos de neuronas con descarga simple y doble (ver marcas correspondientes en (A). Nótese una disminución de la amplitud del PA de la segunda descarga. (C) Histograma de intervalos interespiga. Nótese el gran pico al inicio y un segundo pico más ancho alrededor de 1,3 s. El recuadro muestra la distribución de los intervalos del primer pico. Calibración, 1 mV (A y B); 4 s (A) y 10 ms (B). Tomad de Hajos y col. (2007).

En estos brotes, las espigas tienen un corto intervalo (rango: 2,4-11,5 ms), y las espigas secundarias presentan una disminución de la amplitud (Figura 4 B). La proporción de espigas en dobletes en relación a las espigas solitarias mostró una gran variación entre las diferentes neuronas, entre 5 a 95% de las espigas. Sin embargo, para cada neurona, la proporción de espigas en dobletes y el intervalo entre las espigas en dobletes permanece constante durante los registros basales. Una característica adicional de estas descargas en brotes es que las espigas secundarias presentan un quiebre ("notch o brake") en la deflexión positiva. El patrón de descarga de estas neuronas es menos regular que las típicas neuronas serotoninérgicas; los

coeficientes de variación (CV) fueron 0,29 y 0,44 respectivamente. Estas neuronas se inhiben con agonistas serotoninérgicos  $5-HT_{1A}$  y con paroxetina, un inhibidor de la recaptación de serotonina (ISRS) (Hajos y col., 1995). Estudios que utilizaron registros intracelulares in vivo combinados con detección inmunocitoquímica coinciden que neuronas del NDR con estas características son serotoninérgicas (Abeles, 1982, Aghajanian y Vandermaelen, 1982a).

Neuronas no-serotoninérgicas con propiedades electrofisiológicas variadas también están presentes en el NDR. Esta población heterogénea de neuronas muestra un patrón menos regular de descarga, con frecuencias de descarga en el rango de 0,1-30 Hz (Aghajanian y Vandermaelen, 1982a, Aghajanian y col., 1978, Park, 1987, Sawyer y col., 1985). Estas neuronas generalmente no son inhibidas por agonistas serotoninérgicos aunque hay evidencia de que ciertas neuronas del NDR con baja frecuencia de descarga pero patrón de descarga irregular son inhibidas por éstos fármacos (Sawyer y col., 1985).

### 1.1.4 Electrofisiología del NMR

Comparado con el NDR, son pocos los trabajos que describen las características electrofisiológicas del NMR. Algunos trabajos fueron realizados *in vitro* (Beck y col., 2004, Calizo y col., 2011, Trulson y Frederickson, 1987) y otros en animales anestesiados *in vivo* (Hajos y col., 1995, Kocsis y col., 2006, Kocsis y Vertes, 1996, Viana Di Prisco y col., 2002).

Tradicionalmente los trabajos realizados *in vitro* mostraron que las neuronas serotoninérgicas presentan una alta resistencia de membrana, gran hiperpolarización postpotencial (HPP), PA anchos e hiperpolarización en respuesta al agonista 5-HT1<sub>A</sub> (Aghajanian y Lakoski, 1984, Aghajanian y Vandermaelen, 1982a). Trabajos más recientes con identificación del fenotipo neuronal, mostraron que las neuronas serotoninérgicas del NMR se diferenciaban de las del NDR dado que presentaban una constante de tiempo más corta y una HPP mayor. Además, las neuronas no-serotoninérgicas del NMR presentaron características muy diferentes a las serotoninérgicas (Beck y col., 2004, Calizo y col., 2011).

En ratas anestesiadas con uretano, mediante registros extracelulares, se estudió la relación del patrón de actividad de las neuronas con el ritmo theta hipocampal (véase Recuadro 1). Kocsis y col. (1996) evidenciaron que un subgrupo de neuronas presumiblemente no-serotoninérgicas, tanto del NMR como del NDR, descargaban rítmicamente en sincronía con el ritmo theta del hipocampo. Además, se demostró que la coherencia de las descargas y el ritmo theta hipocampal fue mayor en el NMR que en el NDR (Kocsis y Vertes, 1996).

16

De acuerdo al patrón de actividad en condiciones de anestesia con uretano, las neuronas del NMR fueron subdivididas en tres tipos: theta-on, theta-off y sin relación con el ritmo theta, basado en el aumento, la disminución, o falta de relación de su actividad con el ritmo theta del hipocampo, respectivamente (Viana Di Prisco y col., 2002). A su vez, las neuronas del NMR, también han sido clasificadas en neuronas de descarga lenta (~1 Hz), descarga moderada (5-11 Hz), o descarga rápida (>12 Hz). Las neuronas de descarga lenta así como un grupo de neuronas de descarga moderada theta-off, presentan características de "clásicas" neuronas serotoninérgicas del rafe (con descarga regular y lenta, y PA anchos). Todas las neuronas de descarga rápida son theta-on (Viana Di Prisco y col., 2002).

#### Recuadro 1. Ritmo theta.

Las oscilaciones en el rango de frecuencia theta (4-8 Hz), son más prominentes en el hipocampo (Green and Arduini, 1954) y sincronizan la actividad neuronal en numerosas estructuras del cerebro anterior (Lee y col., 2005a, Seidenbecher y col., 2003, Siapas y col., 2005). Ocurren selectivamente durante comportamientos exploratorios y durante el sueño de movimientos oculares rápidos (SREM), mientras que una actividad irregular del hipocampo se asocia con la vigilia tranquila, comportamientos consumatorios y sueño de ondas lentas (Kemp and Kaada, 1975). Es importante destacar que al igual que ocurre durante el sueño, bajo anestesia con uretano (que son las condiciones que se emplean en este trabajo), la actividad del hipocampo alterna entre ritmo theta y desincronización. La desincronización del hipocampo coincide con ondas lentas a nivel cortical.

El NMR está directamente involucrado en el control de la actividad del hipocampo (Vertes and Crane, 1997). La activación o supresión del NMR desincroniza o sincroniza, respectivamente, el ritmo theta del hipocampo (Kitchigina, 1999). Además, la supresión farmacológica de las neuronas serotoninérgicas resulta en un ritmo theta hippocampal de larga duración (Vertes and Crane, 1997). La correlación negativa entre la actividad theta hippocampal y la actividad de las neuronas del rafe, que sería consistente con estos hallazgos, se encontró en 29% de las neuronas de descarga lenta, supuestamente serotoninérgicas (Viana Di Prisco y col., 2002). Sin embargo, estudios de una gran población de neuronas del NMR tanto en animales anestesiados (Kocsis and Vertes, 1996, Vertes and Kocsis, 1997) como en no anestesiados (Kocsis and Vertes, 1992), muestran que más de un 55% del total de neuronas del NMR tienen correlación de fase con el ritmo theta hipocampal.

Mediante el uso de marcado yuxtacelular, Kocsis y col. (2006) evidenciaron una mayor diversidad en las neuronas del rafe que en los experimentos previos y clasificaron las neuronas del NMR y del NDR (sin diferenciar entre ambos núcleos y de las cuales 9/15 eran del NMR) en 3 subgrupos:

- <u>Neuronas serotoninérgicas de descarga lenta y potenciales de acción anchos</u>, que corresponderían a las "supuestas" neuronas serotoninérgicas descritas en los estudios previos. Estas neuronas tienen una descarga regular y no tienen correlación con el ritmo theta del hipocampo, pero presentan cambios en la frecuencia relacionados con el ritmo theta (theta-off o theta-on).
- <u>Neuronas serotoninérgicas de descarga rápida rítmicas con theta</u>. Este grupo muestra las características atribuidas previamente a neuronas no serotoninérgicas. A su vez, descargan a mayor frecuencia en correlación con una fase del ritmo theta hipocámpico.
- <u>Neuronas no serotoninérgicas</u>. Estas células forman un grupo heterogéneo con características de descarga variable. Estas también muestran coherencia con el ritmo theta. Sin embargo, algunas neuronas presentaron características electrofisiológicas indistinguibles de las serotoninérgicas.

Como se muestra aquí, los criterios electrofisiológicos usados en estudios previos para identificar las "supuestas" neuronas serotoninérgicas, serían apropiados como una clasificación preliminar a *grosso modo* de las neuronas del NMR.

Las neuronas con descargas en brotes, que han sido identificadas como neuronas serotoninérgicas en el NDR, se encuentran tanto en el NDR como en el NMR aunque son más frecuentes en el primero (27%) que en el segundo (10%). Sin embargo, no se ha estudiado aún en el NMR si estas neuronas contienen serotonina (Hajos y col., 2007, Hajos y col., 1995).

### 1.1.5 Modulación de las neuronas serotoninérgicas

La variable más importante que controla la actividad de las neuronas serotoninérgicas es la retroalimentación negativa neuronal. Así, si la liberación sináptica de serotonina incrementa, la actividad de las neuronas serotoninérgicas disminuye (Aghajanian, 1972, Trulson y Jacobs, 1976). Esta inhibición es menor en las neuronas del NMR que en las del NDR (Lechin y col., 2006). Se presume que esta inhibición se debería a una acción directa sobre los autoreceptores somatodendríticos 5-HT<sub>1A</sub>. Esto es un resultado de la serotonina liberada desde axones y dendritas de neuronas serotoninérgicas vecinas o vía una retroalimentación por axones colaterales. Aparentemente esta retroalimentación ejerce una influencia tónica porque la administración de antagonistas de los receptores de serotonina incrementa y regulariza el patrón de descarga (Fornal y col., 1989).

Por otra parte, las neuronas del NMR son moduladas en diversos estados como el sueño y la vigilia, distintos estados emocionales como la DM, y en la conducta agresiva y actividad locomotora, por diferentes neuromoduladores (oxitocina, glutamato, MCH, entre otros) (Lopez Hill y col., 2013, Pagani y col., 2015, Tao y Auerbach, 2003).

# 1.2 Sistema MCHérgico

#### 1.2.1 Hormona concentradora de melanina (MCH)

La MCH es un péptido cíclico de 19 aminoácidos que fue inicialmente caracterizado como un factor circulante que mediaba los cambios de color en los peces teleósteos (Kawauchi y col., 1983). Posteriormente se reconoció en ratas y se encontró que está presente en todos los mamíferos estudiados, inclusive en seres humanos (Bittencourt y col., 1992, Mouri y col., 1993). La MCH es generada mediante el clivaje de un precursor que a su vez, en forma adicional, genera los neuropéptidos E-I y G-E. Además se ha demostrado que las neuronas MCHérgicas también co-localizan con otros neurotransmisores como por ejemplo GABA (Chee y col., 2015). La función biológica de la MCH es mediada por dos receptores acoplados a la proteína-G, receptores tipo 1 y 2 de MCH (MCHR-1 y MCHR-2), aunque únicamente el MCHR-1 es funcional en roedores (Tan y col., 2002). El MCHR-1 se acopla a varios sistemas de segundos mensajeros: calcio, AMPc, activación de proteinquinasas. El MCHR-2 se acopla principalmente a la proteína Gq (Hawes y col., 2000, Saito y col., 1999).

Se ha determinado que en condiciones *in vitro* la MCH tiene un rol principalmente inhibitorio en neuronas del hipotálamo lateral, tanto a nivel presináptico donde disminuye la liberación de GABA y glutamato, así como a nivel postsináptico (Gao y van den Pol, 2001).

## 1.2.2 Proyecciones y receptores MCHérgicos

La MCH se sintetiza en neuronas cuyos somas están localizados en el hipotálamo posterolateral (HPL) y la zona incertohipotalámica (Figura 5) (Torterolo y col., 2008), proyectando a varias regiones del SNC (Bittencourt y col., 1992, Torterolo y col., 2006).



Figura 5. Neuronas MCHérgicas y fibras en el hipotálamo del gato. A. Microfotografía de baja magnificación ilustrando la distribución de las neuronas MCHérgicas a nivel tuberal en el hipotálamo. B. Microfotografía mostrando mayor aumento las neuronas en MCHérgicas (flecha) y fibras (cabezas de flechas). C. Ausencia de inmunoreactividad en la misma región del hipotálamo que en B luego del test de preabsorción. Fx, fornix; 3v, tercer ventrículo; 3vr, receso mamiliar del 3v. Barras de calibración: A, 1 mm; B y C, 50 μm. Tomado de Torterolo y col. (2008).

Como se esquematiza en la Figura 6 (Bittencourt y col., 1992)., existe una alta densidad de fibras MCHérgicas en regiones específicas del SNC tales como el NMR (Figura 7), NDR, el tegmento laterodorsal-pedunculopontino (LDT-PPT), la sustancia gris periacueductal y el *locus coeruleus*, áreas que están relacionadas con el ciclo sueño-vigilia.

Regiones que participan en el control de los estados emocionales tales como la amígdala y el área tegmental ventral, el núcleo *accumbens* y las cortezas límbicas también reciben una alta densidad de aferencias MCHérgicas (Figura 6). Estas regiones también expresan receptores para MCH (Borowsky y col., 2002, Hervieu y col., 2000, Kilduff y de Lecea, 2001, Saito y col., 2001).



Figura 6. Principales estructuras anatómicas que reciben proyecciones de las neuronas MCHérgicas localizadas en el hipotálamo posterolateral y zona incertohipotalámica de la rata. Los puntos indican los sitios de localización de los cuerpos neuronales que contienen la MCH, y las flechas indican las principales proyecciones MCHérgicas. AON, núcleo olfatorio anterior; BST, stría terminalis; CG, sustancia gris periacueductal; CP, caudadoputamen; CTX, corteza cerebral; Hab, habénula; HYP, hipotálamo; Mam, Complejo mamilar; ME, eminencia media; MidThal, tálamo medial; OB, bulbo olfatorio; PreCBL, núcleo precerebelar; POA, área preóptica; PP, pituitaria posterior; PPN, núcleo pedunculopontino; SC, colículo superior; SN, sustancia nigra; SEP, núcleo septal; Sp. Cd., médula espinal; Sp. V, núcleo vestibular espinal; Vest., núcleo vestibular; VTA, área tegmental ventral. Tomado de Bittencourt y col. (1992).



**Figura 7. A. Esquema mostrando la localización del NMR**. B, Microfotografía que muestra la inmunoreactividad para MCH en la región medial del NMR indicado por un cuadrado de líneas punteadas en A, a aproximadamente Bregma - 7,5 a -7,9 mm. Modificado de Lopez Hill, Pascovich y col. (2013).

Torterolo y col. (2008) han observado la presencia de tanicitos inmunomarcados para MCH en el NDR y el NMR (Figura 8 A). Los tanicitos son células ependimarias especializadas que presentan un soma en forma ovoide y un largo proceso basal que penetra en el tejido nervioso. Clásicamente han sido descritos en diversas especies animales bordeando el tercer ventrículo, aunque también se han descrito en las paredes del acueducto de Silvio, en el piso del cuarto ventrículo y en el canal central de la médula.

Los tanicitos transportan sustancias desde el LCR hacia el parénquima neuronal (Rodriguez y col., 2005). La presencia de MCH en los tanicitos llevó a plantear la hipótesis de que el sistema MCHérgico regularía la actividad de los núcleos del rafe mesopontinos por una vía neurohumoral (por conducción de volumen por el sistema ventricular), además de hacerlo por una vía neural directa. Cabe destacar que la MCH está presente en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de diversas especies incluso el ser humano (Dias A, 2015, Peyron y col., 2011, Ungerfeld y col., 2011), siendo su valor en la rata entre 20 y 65 pg/ml dependiendo del horario del día (Pelluru y col., 2013). Además, se han observado fibras MCHérgicas en aposición a las paredes del tercer ventrículo (Torterolo y col., observaciones no publicadas).

Una segunda evidencia de la existencia de una vía neurohumoral es la demostración de que las neuronas del NDR y NMR de gatos y ratas incorporan MCH conjugada con rodamina (MCH-R, Figura 8 B, 9 y 10) cuando es microinyectada en los ventrículos laterales (Devera, Pascovich y col., 2015; Torterolo y col., datos no publicados).



**Figura 8.** En A se muestra que los tanicitos muestran reactividad para MCH. Rojo: MCH; Verde: Vimentina. En B se muestra que la MCH-R microinyectada en la ventrículo lateral es incorporada en las neuronas del NDR y NMR del gato. Rojo: MCH-Rodamina; Verde: Vimentina. Barras de calibración en A 50 μm y en B 100 μm. Modificado de Torterolo y col. (2008) y Devera, Pascovich y col. (2015).

Las neuronas serotoninérgicas así como también las neuronas no-serotoninérgicas de pequeño tamaño incorporan MCH-R tanto en gatos como en ratas. En gatos, las neuronas que

internalizan la MCH-R están en íntima relación con los procesos basales de los tanicitos. Por último, en el gato también se puede evidenciar que neuronas GABAérgicas del NDR también incorporan MCH-R (Devera, Pascovich y col., 2015). Estos resultados también sugieren la presencia de receptores para MCH en neuronas serotoninérgicas y no-serotoninérgicas del NDR y NMR.



**Figura 9.** La MCH-R (rojo) es incorporada en neuronas serotoninérgicas (verde) y no serotoninérgicas del NRD de la rata. Barra de calibración 20 μm. Modificado de Devera, Pascovich y col. (2015).

# 1.2.3 Rol del sistema MCHérgico en el control del sueño

El HPL que contiene las neuronas MCHérgicas, se considera como un área crítica en el mantenimiento de la vigilia. Sin embargo, también fue involucrado en la regulación del SREM. Una de las primeras evidencias de esto fue que la inyección de muscimol, un agonista GABA<sub>A</sub>, en el HPL del gato indujo una drástica inhibición del SREM (Lin y col., 1989).

Sin embargo, aún no están claros los mecanismos por los cuales el HPL regula los circuitos mesopontinos responsables de la generación de éste estado. Diversos estudios experimentales sugieren que la MCH es un factor hipnogénico poderoso y que juega un papel crucial en el control del SREM (Torterolo y col., 2011). Estudios en ratones "knock-out" del receptor MCHR-1 así como para la MCH (supresión del gen que los codifica) indican que dichos animales poseen una alteración de la arquitectura del sueño (Monti y col., 2013). Los animales que carecen de MCH presentan menos SREM, lo que se hace especialmente evidente en condiciones de balance energético negativo.

La administración intracerebroventricular (i.c.v.) de MCH en la rata produce un marcado aumento del SREM y un moderado aumento del sueño lento (Verret y col., 2003). A su vez, la administración sistémica del antagonista del MCHR-1 en la misma especie disminuye el sueño lento y el SREM e incrementa el tiempo de vigilia (Ahnaou y col., 2008).

Mediante la utilización de marcadores retrógrados en nuestro laboratorio observamos proyecciones de las neuronas MCHérgicas al núcleo pontis oralis (NPO), área ejecutiva para la generación de SREM. Mediante microinyecciones de MCH en el NPO del gato, demostramos que ésta facilita la generación de SREM (Torterolo y col., 2009). La MCH también promueve el SREM actuando a nivel del cerebro anterior basal de la rata (Lagos y col., 2012).

A su vez, microinyecciones de MCH en el NDR también facilitan la generación de SREM mientras que la inmunoneutralización de la MCH endógena bloquea este efecto (Lagos y col., 2009, Lagos y col., 2011a). Datos preliminares de nuestro grupo, muestran que la inyección de MCH en el NMR también facilita la generación tanto de sueño lento como de SREM (Pascovich, Torterolo y col., datos no publicados). Por otro lado, la administración de MCH en el área preóptica ventrolateral en la rata, área implicada en la generación del sueño lento, favorece su generación (Benedetto y col., 2013).

Las neuronas hipotalámicas que sintetizan MCH están co-distribuidas con las neuronas que sintetizan orexinas/ hipocretinas en el HPL, un péptido crítico en el mantenimiento de la vigilia (Torterolo y col., 2006, Torterolo P, 2014a). Las neuronas MCHérgicas fueron inmunomarcadas para c-Fos, usado como marcador de actividad neuronal, específicamente durante la hipersomnia evocada después de una privación de SREM de larga duración (Hanriot y col., 2007, Verret y col., 2006, Verret y col., 2003). Las neuronas MCHérgicas no descargan durante la vigilia sino que descargan selectivamente durante el sueño, ocasionalmente durante el sueño lento, y máximamente durante el SREM. Por esta razón, a las neuronas MCHérgicas se les denomina Wake-off/ REM-On, y descargan en una manera recíproca a las neuronas hipocretinérgicas que son Wake-On/ REM-Off (Hassani y col., 2009, Lee y col., 2005b). Sin embargo, hay evidencias que una subpoblación de neuronas hipocretinérgicas descarga durante el componente fásico del SREM (Torterolo P, 2014a). La MCH podría jugar un rol complementario a las hipocretinas en el control del sueño y la vigilia y contribuir a la fisiopatología de ciertos trastornos del sueño como la narcolepsia.

24



**Figura 10.** La MCH-R (rojo) es incorporada en neuronas serotoninérgicas (verde) y no serotoninérgicas del NMR. Barra de calibración 20  $\mu$ m. (Torterolo y col, datos no publicados).

Recientemente se ha utilizado la técnica de optogenética para estimular específicamente las neuronas MCHérgicas en ratones (Jego y col., 2013, Konadhode y col., 2013, Tsunematsu y col., 2014). A modo de ejemplo, Konadhode y col. (2013), insertaron el gen para el canal catiónico fotosensible canal rodopsina-2 en las neuronas MCHérgicas y posteriormente fueron capaces de estimularlas de forma específica con un estímulo luminoso. La estimulación indujo una disminución de la latencia al sueño, reducción de la duración del tiempo de vigilia, así

como un incremento del tiempo total de sueño lento y SREM durante la noche. Durante el día aumentó la profundidad del sueño. Los autores sostienen que la actividad MCHérgica es capaz de contrarrestar la actividad combinada de los sistemas activadores y, por lo tanto, los agonistas MCHérgicos podrían ser potencialmente útiles para el tratamiento del insomnio (Konadhode y col., 2013).

#### 1.2.4 Rol del sistema MCHérgico en la fisiopatología de la depresión mayor

El rol de la MCH en la DM se ha revisado recientemente (Torterolo P, 2014b). La importante densidad de fibras MCHérgicas en el NDR, la presencia de MCHR-1 en las neuronas serotoninérgicas de este núcleo, así como las importantes proyecciones MCHérgicas al sistema límbico, sugieren un rol de la MCH en el control de los estados emocionales. A su vez, datos indirectos, como que la MCH facilita el SREM (y que el SREM está aumentado en la DM) y estimula el eje hipotálamo-hipofiso-adrenal (que está sobreactivado en la DM) también sugieren que una hiperactividad del sistema MCHérgico podría estar relacionada con algunos aspectos de la DM.

Borowsky y colaboradores, en el año 2002, demostraron que un antagonista de MCHR-1, SNAP-7941, posee un perfil antidepresivo y ansiolítico al ser evaluado en modelos animales. Otros autores, utilizando otros antagonistas así como diversos modelos animales de depresión, obtuvieron resultados similares (Borowsky y col., 2002, Chung y col., 2011, Shimazaki y col., 2006). La importancia del sistema MCHérgico en la DM es enfatizada en un estudio reciente que propone que un aumento de la expresión de la preproMCH y una consecuente regulación en menos de los receptores MCHérgicos, podría ser un biomarcador de la severidad de los comportamientos depresivos (Garcia-Fuster y col., 2012).

Los trabajos de nuestro grupo, en concordancia con los de otros autores (Chung y col., 2011, Shimazaki y col., 2006), sugieren que la DM podría relacionarse con un aumento en la actividad de las neuronas MCHérgicas. Si esta hipótesis fuese correcta, sería de esperar que los antidepresivos disminuyeran directa o indirectamente la actividad de estas neuronas. De manera interesante se ha observado que el tratamiento agudo con escitalopram (antidepresivo del grupo de los ISRS) inhibe tanto el rebote de SREM luego de una privación de sueño como la actividad de las neuronas MCHérgicas (Katai y col., 2013). En este sentido, nuestro grupo ha demostrado que el tratamiento con fluoxetina disminuye la concentración de MCH en el LCR (Calegare BF, 2015). Estos resultados sugieren un papel pro-depresivo de la MCH.

Existe una estrecha relación entre el sistema serotoninergico y la DM. Acorde con esto, la MCH microinyectada en el NDR tiene un efecto pro-depresivo en el modelo de test de nado forzado (aumento de la inmovilidad), el cual fue prevenido por antagonistas de MCHR-1 y por la administración previa de un antidepresivo ISRS (fluoxetina) (Lagos y col., 2011b) y col., noradrenérgico (nortriptilina) (Urbanavicius 2014). У Adicionalmente, la inmunoneutralización de MCH en el NDR evidenció un efecto antidepresivo dado por una disminución del tiempo de inmovilidad (Lagos y col., 2011b). El efecto pro-depresivo podría relacionarse con la inhibición de la actividad serotoninérgica en el NDR inducida por la MCH, sugerida por estudios electrofisiológicos (Devera, Pascovich y col., 2015) y por microdiálisis (Urbanavicius J, 2015). Por último, en estrecha relación con esta tesis, hemos demostrado recientemente que el NMR también participa en el efecto pro-depresivo inducido por MCH (Lopez Hill y col., 2013).

# 2. HIPÓTESIS

En el trabajo que se adjunta como Anexo (Devera, Pascovich y col., 2015) demostramos que la MCH microinyectada en el ventrículo lateral disminuye la frecuencia de descarga de un 59 % de las neuronas del NDR, mientras que la administración de MCH yuxtacelular reduce la descarga del 80% de estas neuronas. Muchas de estas neuronas presentan las características electrofisiológicas de neuronas serotoninérgicas (Devera y col., 2015). En dicho trabajo propusimos que la disminución de la frecuencia de descarga de las neuronas del NDR podría estar relacionada con el rol promotor del SREM y pro-depresivo de la MCH. Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, nuestra hipótesis de trabajo es que la MCH, también actuaría sobre las neuronas del NMR tanto a través de una vía neurohumoral, al ser liberada hacia el LCR desde el hipotálamo, como de una vía neural directa. Hipotetizamos que la MCH endógena tendría un efecto inhibitorio actuando sobre las neuronas serotoninérgicas del NMR. En la Figura 11 se muestra un esquema representativo de esta hipótesis.



Figura 11. Hipótesis de trabajo. Arriba se muestra un esquema del hipotálamo y debajo un esquema del tronco encefálico a nivel del rafe. 3V, tercer ventrículo; 4V, cuarto ventrículo; MD,núcleo mediodorsal EN, del tálamo, núcleo entopeduncular; fx, fornix; DA, área dorsal hipotalámica; PL, área hipotalámica lateral; INF, núcleo infundibular; mlf, fascículo longitudinal medial; mt, tracto mamilotalámico; NMR, núcleo del rafe medial; NDR, núcleo dorsal del rafe; PA, núcleo paraventricular del hipotálamo; PE, complejo periventricular del hipotálamo; PV, núcleo parvocelular del hipotálamo; TC, área del tubercinereum; VM,núcleo ventromedial del hipotálamo; ZI, zona incerta.

# 3. OBJETIVOS

# 3.1 Objetivo general

Nuestro objetivo fue conocer el efecto de la MCH sobre la actividad de las neuronas del NMR.

# 3.2 Objetivos específicos

- 1) Describir las características electrofisiológicas de las neuronas del NMR registradas.
- Analizar el efecto de microinyecciones de MCH en el ventrículo lateral sobre la frecuencia y patrón de descarga de las neuronas del NMR, con el objetivo de estudiar la vía neurohumoral.
- Analizar el efecto de la administración yuxtacelular de MCH sobre las neuronas del NMR, con el fin de estudiar el efecto celular y local de la MCH sobre dichas neuronas *in vivo*.
- 4) Analizar el efecto de la administración yuxtacelular de los antagonistas de MCHR-1 sobre la frecuencia y patrón de descarga de las neuronas del NMR, con el fin de poner en evidencia la existencia de una liberación endógena de este neuromodulador, así como testear la especificidad del efecto de la MCH inyectada.
- 5) Analizar el efecto de la estimulación del HPL, donde se encuentran los somas de las neuronas MCHérgicas, sobre la descarga de las neuronas del NMR.
- Estudiar el fenotipo neuronal de las neuronas del NMR a las que se les administró MCH o respondieron frente a la estimulación del HPL.
- 7) Comparar el efecto de la MCH (en latencia, duración del efecto y porcentaje de cambio de la frecuencia de descarga) sobre las neuronas del NMR con el producido sobre las neuronas del NDR (Devera, Pascovich y col., 2015).

# 4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para cumplir estos objetivos se realizaron registros extracelulares en neuronas del NMR, en ratas anestesiadas con uretano. Se administró MCH en forma i.c.v., condición *sine qua non* para demostrar la existencia de una vía neurohumoral desde el hipotálamo hacia el NMR. En segundo lugar, se aplicó MCH o antagonistas de MCHR-1 en forma yuxtacelular mediante micropipetas acopladas al electrodo de registro. La frecuencia y el patrón de descarga de las neuronas del rafe fueron analizados antes, durante y después de la aplicación de las sustancias. A su vez se registró la respuesta neuronal del NMR a la estimulación eléctrica del HPL, donde se encuentran las neuronas MCHérgicas. Posteriormente se marcaron las neuronas registradas (utilizando Neurobiotina) y se identificó mediante inmunofluorescencia su fenotipo neuronal (serotoninérgico o no-serotoninérgico).

# 5. METODOLOGÍA

Para este estudio se utilizó un total de 39 ratas adultas, de ambos sexos, de 250-300 gr de peso. Los animales fueron obtenidos de la Unidad de Reactivos para Biomodelos de Experimentación (URBE) de la Facultad de Medicina. Estos fueron alojados, cuidados y se mantuvieron con un ciclo luz-oscuridad de 12-12 horas con comida y agua *ad libitum*. Todos los estudios realizados en animales fueron conducidos de acuerdo a normas éticas establecidas por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA) y Comisión Nacional de Experimentación Animal (CNEA), conforme a las directivas de "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals; 8<sup>va</sup> edición, National Academy Press, Washington D.C., 2010". El protocolo experimental fue aprobado por la CHEA (Nº 071140-001056-11). A su vez, se hizo lo posible para reducir el número de animales y mejorar el bienestar de los mismos con el fin de evitarles dolor y estrés.

## 5.1 Preparación del animal

Las ratas fueron anestesiadas con uretano (1.5 g/Kg, i.p.) y se fijaron en un aparato estereotáxico (Figura 12). La temperatura corporal fue mantenida y controlada mediante una bolsa térmica. La cirugía consistió en una incisión sagital del cuero cabelludo hasta exponer el cráneo. Para registrar las neuronas del NMR se realizó una trepanación en el cráneo de 5 mm de diámetro en el lugar de descenso de los electrodos de registro. Estos se descendieron con un ángulo de 20º para evitar la lesión del seno venoso sagital (coordenadas medidas desde Bregma: AP, -8; L, 2,6; DV, 7-9) (Paxinos 2005).

Para la administración de MCH i.c.v. se colocó una cánula guía 20 G a nivel del ventrículo lateral; AP, -1; L, -1,6; DV, 3,4. Se colocaron dos electrodos superficiales de nicromo para el registro diferencial de la actividad de campo electroencefalográfica (EEG)\* de las cortezas

fronto-parietales. También se descendió un trenza de nicromo en el hipocampo (coordenadas: AP, -4,4; L, -2,6; DV, 3,4) para el registro diferencial de su electrograma. Además se colocaron electrodos bipolares de nicromo (200  $\mu$ m de diámetro) para la estimulación hipotalámica (coordenadas: AP,-3,2; L, 1,2; DV, 8,3) y se monitorizó continuamente el electrocardiograma.



**Figura 12. Dispositivo experimental.** En la foto se muestra el animal anestesiado colocado en el aparato estereotáxico. 1, orificio para registro de unidades del NMR; 2, electrodo implantado para estimulación del HPL; 3, electrodo para registro de hipocampo; 4 y 5, electrodos para registro de EEG; 6, electrodo indiferente; 7, electrodo para registro de unidades; 8, micropipeta para registro de unidades y iontoforesis; 9, micropipeta para aplicación de sustancias; 10, inyector de presión; 11, aparato estereotáxico.

# 5.2 Sistema de registro

Para el registro extracelular de unidades, se utilizaron micropipetas de vidrio rellenas con NaCl 2M o Neurobiotina al 2% (Vector Labs, en NaCl 0,5M, pH 5,4; resistencia de 10-20 MΩ). Las pipetas se descendieron en sentido dorso-ventral utilizando un micromanipulador hidráulico. Este se conectó mediante un alambre de plata clorurada a un preamplificador. Se colocó un electrodo de referencia del mismo metal, de forma subcutánea en el cuello. La señal fue amplificada (x2000) y filtrada (300–10000 Hz), Esta fue adquirida y visualizada en una computadora utilizando el programa Spike 2 que permite, *a posteriori*, la discriminación de las espigas y procesamientos que se detallan abajo. La frecuencia de muestreo utilizada fue de 20 KHz y 16 bits para el registro de unidades y de 500 Hz para los registros de campo.

## 5.3 Administración de MCH y antagonistas

En el caso de la microinyección i.c.v., se administraron 5  $\mu$ l de MCH (concentración: 1  $\mu$ g/ $\mu$ l) (Phoenix Pharmaceuticals) en 60 s mediante una microjeringa (Hamilton, 2  $\mu$ l) conectada

a una bomba de inyección (Harvard Apparatus). Para la administración yuxtacelular de los fármacos se utilizaron micropipetas dobles (Figura 13).



**Figura 13. Micropipetas dobles.** Micropipetas fabricadas de forma artesanal. En A se muestran ejemplos de micropipetas. A través de una de ellas se realiza el registro extracelular y la iontoforesis de neurobiotina, y mediante la otra micropipeta se inyecta la sustancia a testear por presión. En B se muestra el desfasaje entre la punta de la pipeta de registro y la de inyección. Barra de calibración 150 μm.

La pipeta de inyección se acopla al electrodo de registro (diámetro 20 µm, distancia entre ambas puntas de 50 a 150 µm). La inyección se realizó mediante pulsos de presión mediante un inyector (Dagan Corporation, PMI 200). Usualmente los volúmenes inyectados no excedieron los 100 pl, estimados a partir del diámetro de la gota de solución en el aire, para la característica del pulso de presión utilizado. Se utilizó una concentración de MCH de 0,25 µg/µl y una presión de 5 a 20 psi, durante 200 ms. La administración i.c.v. o yuxtacelular del vehículo (solución salina, NaCl 0,9%) se utilizó como control. La misma estrategia se empleó utilizando el antagonista selectivo de MCHR-1 ACT0175 clorhidrato (Tocris Biocience, Mi, USA) a una concentración de 1 mM, disuelto en DMSO al 0,1%. Por último, se utilizó DMSO 0,1% como control. La elección de la concentración de MCH o del antagonista se basó en nuestros trabajos previos (Devera, Pascovich y col., 2015; Urbanavicius y col., 2014).

# 5.4 Iontoforesis yuxtacelular

Parte de las neuronas registradas se marcaron con neurobiotina. Ésta se administró mediante iontoforesis con el siguiente protocolo: corriente anódica, 5 nA, 200ms on/200ms off, por 5 minutos (Devera, Pascovich y col., 2015). Se administró neurobiotina a una única neurona por rata.

#### 5.5 Protocolo de estimulación del hipotálamo posterolateral

La estimulación hipotalámica se realizó con corriente mediante un estimulador Dagan S-900 conectado a una SIU (unidad aisladora del estímulo). A las neuronas registradas se le aplicaron de 25 a 30 trenes de corriente. Cada pulso presentó una duración de 0,3 ms y la duración de los trenes fue de 200 ms. La frecuencia intra-tren fue de 90 Hz y la frecuencia de los trenes entre 0,1 Hz. Se estimuló con intensidades crecientes de 100 a 500  $\mu$ A (Yamuy y col., 2004). Para el análisis se eligieron intensidades en que las neuronas respondían en forma clara y estable. Se utilizaron 100  $\mu$ A o 300  $\mu$ A de acuerdo a la respuesta de la neurona. En caso de que la neurona no respondiera claramente, se aumentó la intensidad (en pasos de 50  $\mu$ A) hasta 500  $\mu$ A.

#### 5.6 Procesamiento de datos

Los PA de cada neurona fueron promediados y analizados en su forma y duración. También se analizó la frecuencia y el patrón de descarga espontánea. Las neuronas fueron clasificadas en theta-on y theta-off, según su actividad durante la presencia de ritmo theta en el hipocampo (espontáneo o inducido por un estímulo sensorial, "pinch"). Del grupo theta-on, se consideraron sólo las neuronas que presentaron un cambio en su frecuencia mayor del 20% con el ritmo theta (Kocsis y col., 2006), y del grupo theta-off, las que se inhibieron totalmente con el theta. Se calculó la frecuencia de descarga espontánea y desvío estándar en ventanas de 60-300 s de actividad estable. La respuesta a la MCH o el antagonista de MCHR-1, se analizó por ventanas de 100 a 300 s dependiendo de la duración de la respuesta. Además, se analizó el patrón de la descarga espontánea con histogramas de intervalos (HI) y de autocorrelación (HAC). Para el análisis del efecto de la estimulación hipotalámica se realizaron histogramas periestímulo. Para determinar la regularidad de la frecuencia de descarga se utilizó el CV. Para la medida de la duración se tomó el tiempo entre el inicio del PA y el final de la segunda deflexión (Devera, Pascovich y col., 2015). Para la clasificación de las neuronas en "serotoninérgicas" o "no-serotoninérgicas" según sus características electrofisiológicas, nos basamos en los criterios "clásicos" de clasificación descritos en la literatura (Aghajanian, 1972, Aghajanian y col., 1978, Blier y col., 1990, Hajos y col., 1995, Jacobs y Azmitia, 1992, Kocsis y col., 2006).

### 5.7 Análisis estadístico

Los datos muestrales se expresan como media  $\pm$  error estándar (EE). El análisis estadístico se realizó mediante el *test* de Mann Withney tanto para los histogramas periestímulo (cuando se estimuló el HPL) como para el análisis de la frecuencia de descarga antes y después de la administración de MCH, antagonista de MCHR-1 o vehículo. En caso de observarse un efecto estadísticamente significativo, se obtuvo un valor aproximado de la latencia y duración del efecto. La latencia fue medida desde el inicio de la inyección o estimulación hasta el inicio de la respuesta. Para determinar la duración se tomó el tiempo en el cual el valor promedio disminuyó o aumentó en forma sostenida por encima o debajo del valor medio que presentaba en condiciones basales. Para el caso de comparación de poblaciones de neuronas antes y después de la administración de sustancias o estimulación hipotalámica, se utilizó el *test* de Student pareado. También se realizó correlación de Pearson entre duración del PA y la frecuencia de la actividad neuronal o el CV. Para la comparación de proporciones se utilizó el *test* de chi-cuadrado. La latencia y la duración de los efectos de la MCH entre el NMR y el NDR, se compararon con el *test* de Student no-pareado a dos colas. La hipótesis nula se rechazó con un *p* < 0,05.

#### 5.8 Procedimientos histológicos

Se realizaron dos tipos de análisis dependiendo del experimento. Con el objetivo de determinar la localización de los electrodos de registro, luego de su disección el cerebro se dejó inmerso en formol al 10% por 48 hs y luego fue seccionado en cortes de 100 µm utilizando un vibrátomo. El trayecto de la micropipeta de registro y la localización de los macroelectrodos de registro y estimulación se reconocieron mediante microscopía de luz y se tomaron fotografías con una lupa histológica (Figuras 14, 15 y 34).

Al final de aquellos experimentos en los que se marcó una neurona con neurobiotina, los animales fueron perfundidos transcardíacamente con NaCl 0,9% heparinizado y luego paraformaldehido (PFA) 4%. Los cerebros fueron extraídos y se realizó una post-fijación en PFA 4% por 24hs. Posteriormente se dejaron en inmersión en sacarosa al 30% por 48 hs. Finalmente fueron cortados en bloques y congelados en hielo seco. Se realizaron cortes coronales de 30 μm de espesor mediante un crióstato a -20°C.

Posteriormente se realizaron procedimientos immunohistoquímicos con la técnica de incubación secuencial de cortes en libre flotación.



Figura 14. Confirmación histológica de la localización del electrodo de registro en hipocampo. Hip, hipocampo. La barra de calibración corresponde a 1mm. Coordenada anteroposterior, -4,4 mm desde Bregma

## 5.9 Histoquímica

#### 5.9.1 Revelado de neurobiotina con DAB

Para la localizar a la neurona marcada con neurobiotina se llevó a cabo el siguiente protocolo. Luego del lavado de las secciones con PBS (3 lavados por 10 min), estas fueron incubadas con Buffer fosfato salino más Tritón X-100 (PBST) 0,3% por 90 min. Luego se procedió a la incubación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1% por 30 min. Luego de tres lavados de 10 min se procedió a la incubación con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC 1:200, Vector labs) por 120 min y luego fueron expuestos a diaminobencidina (DAB, 0,02%) por 150 min. Así, la neurona marcada con neurobiotina puede ser visualizada. Los cortes se lavaron nuevamente y fueron montados y cubiertos con glicerol. Por último se tomaron fotografías en microscopio de luz (Olympus BH-2).

# 5.9.2 Revelado de neurobiotina con streptavidina

Luego de los lavados con buffer fosfato salino (PBS) (tres lavados por 10 min), se realizó bloqueo con borhidruro de sodio 0,5% por 25 min. Se hicieron lavados y luego otro bloqueo con Glicina 50 mM más albúmina sérica bobina (BSA) 0,1% por 60 min. Luego se lavó nuevamente y se incubó con el conjugado streptavidina-Alexa fluor 555 (1:5000, Molecular Probes) en PBST al 0,3% por 2,5 h. Por último se montaron las secciones y se observaron con microscopio de fluorescencia con el objetivo de buscar la neurona marcada con neurobiotina. Una vez encontrada la sección que contenía la neurona, este corte fue separado para la posterior realización de inmunofluorescencia para serotonina.
#### 5.9.3 Inmunofluorescencia para serotonina

Las secciones fueron preincubadas en suero normal de burro (NDS) al 5% en PBS por 60 min. Luego se incubaron los tejidos con el anticuerpo primario policional anti-serotonina hecho en conejo 1:500 (Inmunostar, Hudson, WI, USA), en PBST con NDS 5% por 48hs a 4°C. Posteriormente al lavado los cortes fueron incubados con un anticuerpo secundario de burro anti-IgG de conejo conjugado con Alexa Fluor 488 (Jackson laboratories) 1:1500 por 90 min. Los cortes se lavaron nuevamente y fueron montados y cubiertos con glicerol. Por último, se tomaron fotos en microscopio de fluorescencia (Nikon eclipse 50i).

Para confirmar la especificidad de los anticuerpos utilizados se realizaron controles en ausencia del anticuerpo primario.

#### 5.10 Comparación con neuronas del NDR

En nuestro trabajo previo (Devera, Pascovich y col. 2015; ver Anexo 1) se estudiaron los efectos de la MCH sobre las neuronas del NDR. En el presente trabajo se compararon dichos efectos, con los generados por la administración de MCH sobre las neuronas del NMR.

# 6. **RESULTADOS**

#### 6.1 Localización de las neuronas registradas en el NMR

El análisis de las unidades se realizó en neuronas que estuvieran localizadas dentro de los límites del NMR de la rata. Noventa y nueve neuronas registradas se localizaron exitosamente en el NMR. Esto fue confirmado al reconstruir en el corte cerebral el trayecto guiado por el trazo de la micropipeta y por los datos de la estereotaxia (Figura 15). Otras ocho neuronas fueron localizadas e identificadas con neurobiotina (Figura 16). La Figura 17 muestra la reconstrucción de la localización de las neuronas registradas.



**Figura 15. Confirmación histológica de la localización del sitio de registro.** En la figura se muestra un ejemplo de un trazo de una micropipeta de vidrio. La barra de calibración corresponde a 1 mm. Coordenadas anteroposterior -7,8 mm desde Bregma.



**Figura 16. Neuronas del NMR marcadas con neurobiotina.** En A y B se muestra el marcado de una sola neurona mientras que en B y C se muestran ejemplos de marcación múltiple. Estas últimas no se utilizaron para identificación del fenotipo neuronal aunque si se utilizaron para localizar el sitio de registro. La barra de calibración corresponde a 100 µm.



**Figura 17. Localización de las neuronas registradas**. Se esquematiza la localización y el efecto sobre la descarga de las neuronas registradas de diferentes tratamientos: MCH administrada de forma i.c.v. (n=15) o yuxtacelular (n=21); antagonista de MCH R-1 ATC0175 (n=7); salina (n=10) o DMSO (n=4). También se muestra la localización de las neuronas que fueron tratadas con estimulación del hipotálamo posterolateral (n=31). No se muestra la localización de las neuronas en las que sólo se analizaron sus características electrofisiológicas basales. Las neuronas tratadas con MCH, antagonista de MCHR-1 y también tratadas con estimulación del HPL se localizan en los esquemas correspondientes. Aq, acueducto; Atg, tegmento ventral; DR, rafe dorsal; ECIC, colículo inferior; MnR, núcleo mediano del rafe; mlf, fascículo longitudinal medial; ts, tracto tectoespinal; ml, lemnisco medial; RtTg, retículo tegmental; PnO, núcleo pontis oralis; VLL, núcleo lateral del lemnisco ventral; PPTg, tegmento pedunculopontino; xscp, cruzamiento de pedúnculo cerebeloso superior. Para simplificar se dibujó la localización de las neuronas superpuestas en el plano de Bregma -7.8 (Paxinos y Watson, 2005).

# 6.2 Caracterización electrofisiológica de las neuronas registradas en el NMR

De 107 neuronas registradas (Tabla 1), 36 fueron tratadas con MCH (15 i.c.v. y 21 yuxtacelular); 7 con el antagonista de MCHR-1 ATC0175 (yuxtacelular); 10 con salina (8 i.c.v. y 2 yuxtacelular) y 4 con DMSO yuxtacelular.

Tabla	1.	Distintos	tratamientos	administrados	а	las
neuro	na	s del NDR.				

	Nº de neuronas
Total registradas	107
Estimuladas HPL	31
Solo registro basal	19
MCH i.c.v.	15
Salina i.c.v	8
MCH yuxtacelular	21
Salina yuxtacelular	2
Antagonista de MCHR-1	7
DMSO yuxtacelular	4

Siete de las neuronas estimuladas en el HPL, fueron a su vez tratadas con MCH (n=6) o antagonista de MCHR-1 (n=1).

La población de neuronas registradas (n=107) mostró las siguientes características electrofisiológicas en condiciones basales. Los PA presentaron una duración de 4,3 ± 0,8 ms, la frecuencia de descarga basal fue de 8,8 ± 11,1 Hz y el CV fue de 0,43 de acuerdo a lo descrito por (Viana Di Prisco y col., 2002). La distribución de frecuencias de todas las neuronas registradas, sugiere la

existencia de 3 grupos de neuronas: un grupo de neuronas con frecuencias menores a 4 Hz, otro grupo con frecuencias entre 4 y 10 Hz, y otro grupo más disperso, con frecuencias mayores a 10 Hz (Figura 18). No se encontró correlación entre la frecuencia de descarga y la duración del PA, ni tampoco entre éstas variables y el CV. El 79% del total de las neuronas registradas exhibieron un HI unimodal y el 53% presentaron un patrón rítmico o un intervalo predominante en el HAC (se mostrarán ejemplos más adelante). En 23 neuronas se estudió su relación con el ritmo theta de las cuales 12 neuronas (52%) fueron theta-on (Figura 19), 6 neuronas (26%) theta-off (Figura 20) y 5 (22%) no presentaron relación con el ritmo theta.





Frecuencia de descarga (Hz)



**Figura 19. Ejemplo de neurona theta-on**. Nótese que la frecuencia de descarga de la neurona aumenta en relación con la aparición de ritmo theta en el hipocampo y a su vez esto se asocia con desincronización en la corteza frontoparietal. Esto ocurre tanto de forma espontánea como provocada mediante la aplicación de un estímulo somestésico ("pinch"). Arriba se muestra el registro extracelular de una unidad, en segundo lugar se muestra el espectrograma del hipocampo (valores no calibrados, rojo es mayor potencia), abajo se muestran los registros de hipocampo y corteza frontoparietal. Con las líneas punteadas se indica el momento del "pinch".



**Figura 20. Ejemplo de neurona theta-off**. Nótese que la frecuencia de descarga de la neurona disminuye en relación con la aparición de ritmo theta en el hipocampo y a su vez esto se asocia con desincronización en la corteza frontoparietal. Esto ocurre tanto de forma espontánea (theta espontáneo, líneas punteadas azules) como provocada mediante la aplicación de un estímulo somestésico (*"pinch"*, líneas punteadas rojas). Arriba se muestra el registro extracelular de una unidad, en segundo lugar se muestra el espectrograma del hipocampo (valores no calibrados, rojo es mayor potencia), abajo se muestran los registros de hipocampo y corteza frontoparietal.

En tres (10%) de las 31 neuronas registradas durante la estimulación del HPL se identificó una respuesta antidrómica. Dichas respuestas fueron reconocidas por su baja latencia (< 2 ms), su poca variabilidad en la respuesta, porque siguen frecuencias altas de estimulación (90 Hz) y la presencia del fenómeno de "colisión" (Figura 21). Dichas neuronas no mostraron características electrofisiológicas diferentes a las demás neuronas registradas en el NMR.



**Figura 21. Respuesta antidrómica**. Se muestran los registros de los PA de una neurona del NMR frente a la estimulación del HPL. En A se observa que el PA de la neurona aparece con una latencia muy corta (aproximadamente 1 ms, flecha) después del inicio del artefacto. En B se superponen los registros de dos respuestas y se observa la baja variabilidad en la latencia. En C se observa que el potencial antidrómico sigue a alta frecuencia (90Hz). En D se observa el fenómeno de "colisión", es decir, la aparición de una espiga de forma espontánea justo antes del estímulo bloquea la aparición de la respuesta. En E se muestra una espiga que aparece previamente al estímulo pero antes que en D, y que no produce el fenómeno de "colisión". La línea roja punteada indica el artefacto del estímulo.

Un ejemplo de las características de una neurona con respuesta antidrómica se muestra en la Figura 22. La neurona presenta un patrón de descarga irregular, de 0,8  $\pm$  0,6 Hz, con un intervalo predominante en el HAC, un HI unimodal y un PA trifásico con una duración de 2,1 ms. La estimulación hipotalámica produjo un aumento de la frecuencia de descarga desde un valor de 0,8  $\pm$  0,6 Hz a 4,1  $\pm$  1,1 Hz (*test* de Mann Withney, p < 0,05), con una muy baja latencia del efecto y una duración del efecto de 0,2 s (Figura 22 C), que corresponde con la duración del tren de estímulos. Durante el tren de estímulos, se diferencian claramente las respuestas de los artefactos de estimulación. Debido a sus características, esta es una respuesta antidrómica (Figura 22 B, recuadro).



Figura 22. Efecto de la estimulación eléctrica del hipotálamo posterolateral sobre la actividad de una neurona del NMR de forma antidrómica. A. Características electrofisiológicas de la neurona registrada. B. Arriba se muestra el registro extracelular de la neurona y se señala el momento de la estimulación. En el recuadro se muestra el aumento de la descarga neuronal durante un tren de estímulos. C. El histograma periestímulo muestra un aumento de la frecuencia de descarga frente a la estimulación hipotalámica. La flecha indica el momento de inicio de la estimulación.

Un patrón de descarga en brotes (dobletes o tripletes) se observó en 21 neuronas (20%) (Figura 23). Un hallazgo inesperado pero interesante, fue el hecho de que neuronas que en su descarga basal no presentaban brotes de PA, durante y luego de la estimulación hipotalámica cambiaron su patrón de descarga presentando típicas descargas en brotes en forma de dobletes (Figura 23). Esto ocurrió en un 20% de las neuronas sin descarga en brotes (5/25). Las neuronas que tenían descarga en brotes en condiciones basales (n=6, 19%), continuaron presentando el mismo patrón de descarga luego de la estimulación hipotalámica.



**Figura 23.** Aparición de descargas repetitivas luego de la estimulación hipotalámica. A. Registro crudo. Los eventos (en azul) indican la presencia de descargas en brotes. Como se puede observar, estas descargas aparecen cerca del final de la serie de trenes y se mantienen luego de la finalización de los mismos. La intensidad del estímulo fue de 300  $\mu$ A B. Registros ampliados antes (a) y después (b) de la estimulación hipotalámica. En b se observa la presencia de dobletes (indicado con asteriscos). Se muestran algunos ejemplos de estos dobletes en el recuadro.

Se pudo identificar el fenotipo serotoninérgico en cuatro neuronas. Se muestran ejemplos de dos neuronas en la Figura 24. Sus características electrofisiológicas fueron las siguientes: descarga rítmica, HI unimodales y PA trifásicos anchos. Tres de ellas presentaron frecuencias de descarga regulares menores de 5 Hz y una presentó una frecuencia de 11,6 ± 5,6 Hz. En ninguna de ellas se observó descarga en brotes. Una de estas neuronas presentó una respuesta antidrómica frente a la estimulación del HPL.

También se registró una neurona identificada como no-serotoninérgica (Figura 28), cuyas características se describirán más adelante.



**Figura 24. Neuronas del NMR doblemente marcadas para neurobiotina y serotonina.** En rojo se muestra la marcación para neurobiotina (flecha, A1 y B1), en verde serotonina (cabezas de flecha, A2 y B2) y en amarillo (A3 y B3) la superposición de las imágenes. La barra de calibración corresponde a 20 μm.

### 6.3 Efecto de la administración intracerebroventricular de MCH

Se estudió el efecto de la administración i.c.v. de MCH (5  $\mu$ g) sobre 15 neuronas del NMR. La Figura 25 muestra una foto representativa de la localización de la cánula guía para dicha inyección a nivel del ventrículo lateral.



Figura 25. Ejemplo de la confirmación histológica de la localización de la cánula guía para la inyección intracerebroventricular de MCH o salina. cc, cuerpo calloso; Cx, corteza cerebral; CP, caudadoputamen; fx, fórnix; GPE, globo pálido externo; VLI, ventrículo lateral izquierdo. Calibración 1mm. AP -0,6 mm desde Bregma.

La MCH produjo una disminución significativa de la frecuencia de descarga en el 53% de las neuronas (*test* de Mann Whitney; p < 0.05) (Figura 26). Las neuronas en que la administración de MCH resultó en una disminución de la frecuencia de descarga, pasaron de una descarga basal de 7,2 ± 2,0 Hz a 4,4 ± 1,9 Hz (*test* de Student pareado; p = 0,02). La disminución de la descarga presentó una latencia de 157 ± 29,1 s y una duración de 390 ± 96 s. En tres neuronas, la disminución de la frecuencia de descarga fue seguida por un rebote (frecuencia de descarga significativamente mayor comparada con el registro basal). Un incremento significativo de la descarga se observó en una neurona, de una frecuencia de 2,3 ± 0,3 Hz a 4,9 ± 1,0 Hz (*test* de Student no pareado; p < 0,05). En contraste, la administración de salina no modificó la frecuencia de descarga de las neuronas registradas (n=8). La frecuencia antes y después de la aplicación de salina fue de 7,6 ± 3,5 Hz y 7,5 ± 3,3 Hz, respectivamente (*test* de Student pareado, p=0,56). No se encontraron diferencias significativas en la duración del PA, la frecuencia de descarga basal o el CV entre el grupo de neuronas tratadas con MCH i.c.v. y el grupo tratado con vehículo (*test* de Student no pareado).



**Figura 26. Efecto de la administración intracerebroventricular de MCH comparado con la administración de salina.** En A se muestra que frente a la administración de MCH i.c.v., 53% de las neuronas del NMR disminuyen su frecuencia de descarga, 1% la aumentan, y 46% no muestran cambios. La administración de salina no produce cambios. En B se muestra la frecuencia de descarga de las neuronas que presentaron inhibición, antes y después de la administración de MCH.

En la Figura 27 se muestra un ejemplo del efecto producido por la administración de MCH i.c.v. La neurona tiene un PA de una duración de 3,4 ms, así como una frecuencia de descarga irregular y lenta (0,6  $\pm$  0,3 Hz). La administración i.c.v. de MCH produjo una marcada disminución de la frecuencia de descarga, con una latencia aproximada de 179 s y una duración de 800 s.



**Figura 27. Efecto de la microinyección de MCH intracerebroventricular en la descarga de una neurona del NMR.** En el recuadro se muestra el promedio del PA. Arriba el registro extracelular estándar de la unidad. Abajo el histograma de frecuencias. Las flechas indican el momento de inyección. La línea punteada representa la frecuencia media basal.

Solo una de las neuronas registradas se logró marcar con neurobiotina luego de la administración de MCH y se identificó su fenotipo neuronal. Esta neurona presentó un PA bifásico ancho de 3,3 ms de duración, con una descarga en brotes, irregular con una frecuencia de  $10,1 \pm 1,1$  Hz. Muestra un HI bimodal a expensas de la presencia de descargas en brotes y un intervalo predominante en el HAC. Esta neurona no presentó cambios significativos en su frecuencia de descarga después de la administración de MCH y resultó ser no-serotoninérgica (Figura 28).





**Figura 28. Neurona que no se inhibe con MCH, no-serotoninérgica.** A, Características electrofisiológicas de la neurona. Se observa un pequeño primer modo correspondiente a la descarga en brotes. B, Registro extracelular de la neurona registrada antes y después de la administración i.c.v. de MCH. Como se puede apreciar en la figura, no existen cambios significativos en la frecuencia de descarga frente a la administración de MCH. Con los asteriscos se señala la presencia de descargas en brotes. Un ejemplo de estos, se muestra en el recuadro C. D, Neurona del NMR marcada con neurobiotina (rojo) señalada con la flecha. E, inmunofluorescencia para serotonina (verde) y F, superposición de las imágenes. La barra de calibración corresponde a 20 μm.

## 6.4 Efecto de la administración yuxtacelular de MCH y del antagonista de MCHR-1

Se administró MCH de forma yuxtacelular en 21 neuronas. En 13 neuronas (65%), la MCH produjo una disminución significativa de la frecuencia de descarga (Figura 29), mientras que ninguna de ellas respondió con un incremento de la frecuencia de descarga. En promedio, la MCH disminuyó la frecuencia de descarga desde 3,9  $\pm$  0,2 Hz a 2,4  $\pm$  0,2 Hz (*test* de Student

pareado, p < 0,05), con una latencia de 30,4  $\pm$  9,7 s y una duración del efecto de 118,9  $\pm$  39,8 s. La Figura 30 muestra un ejemplo del efecto inhibitorio de la MCH yuxtacelular sobre una neurona del NMR. Se evidenció también un rebote post-inhibición en 8 de estas neuronas (ejemplo en Figura 31). La inyección de salina no provocó cambios significativos en la frecuencia de descarga (3,9  $\pm$  0,6 Hz antes vs 3,9  $\pm$  0,5 Hz, n=3).



**Figura 29. Efecto de la microinyección yuxtacelular de MCH y antagonista de MCHR-1 en las neuronas del NMR**. En A se muestra que frente a la administración de MCH yuxtacelular, un 65% de las neuronas del NMR disminuyen su frecuencia de descarga y un 35% no muestran cambios. Frente a la administración de antagonista de MCHR-1, un 71% aumentan su frecuencia de descarga y un 29% no muestran cambios. La administración de solvente (salina o DMSO) no muestra efecto. En B se muestra la frecuencia de descarga de las neuronas que presentaron inhibición, antes y después de la administración de MCH. En C se muestra la frecuencia de descarga de las neuronas que presentaron aumento de su frecuencia, antes y después del agregado de antagonista de MCHR-1.

Por el contrario, la aplicación del antagonista de MCHR-1 provocó un aumento de la frecuencia de descarga en 5 de 7 neuronas; 71% (Figura 29) de una frecuencia de 4,7 ± 2,3 a 8,3 ± 3,5 Hz (*test* de Student pareado; p < 0,05) (se muestra un ejemplo en la Figura 30) mientras que en el resto no provocó cambios. La latencia del efecto fue de 27,6 ± 12,4 s y la duración del efecto de 116,0 ± 21,4 s. La administración del solvente (DMSO), no provocó cambios en la frecuencia de descarga ( $32,7 \pm 9,3$  Hz antes vs  $33,0 \pm 9,4$  Hz, n=4). No se encontraron diferencias significativas en la duración del PA, la frecuencia de descarga basal o el CV entre el grupo de neuronas tratadas con MCH y antagonista de MCHR-1 yuxtacelular y el grupo tratado con vehículo (*test* de Student no pareado).

A continuación se presentan varios ejemplos de estos resultados.

En la Figura 30 se muestra una neurona que presenta una frecuencia de descarga de 3,8  $\pm$  2,2 Hz, aparentemente irregular pero presenta una ritmicidad en el HAC. Presenta un HI claramente bimodal, un PA trifásico con una duración de 1,9 ms (Figura 30 A). La administración de MCH disminuyó la frecuencia de descarga a un valor de 0,7  $\pm$  0,5 Hz (*test* de Mann Withney; p < 0,05). La latencia del efecto fue de aproximadamente 6 s con una duración del efecto de 130 s (Figura 30 B y C).



**Figura 30. Efecto de la administración de MCH yuxtacelular**. A. Características electrofisiológicas de la neurona. B. Registro extracelular de la neurona registrada. C. Histograma de frecuencias. La línea punteada indica la frecuencia basal media. El recuadro rosa indica el momento de máximo efecto.

Otro ejemplo se muestra en la Figura 31. Esta neurona tiene un patrón de descarga irregular de 1,6 ± 1,8 Hz, sin dobletes, no es rítmica en el HAC, presenta un HI unimodal y un PA bifásico con una duración de 2,4 ms. La administración de MCH produjo una disminución de la frecuencia a un valor de 0,3 ± 0,1 Hz (*test* de Mann Withney; p < 0,05). La latencia del efecto supresor fue de 61 s con una duración del efecto de 180 s. Posteriormente se observó un marcado rebote post-inhibición de 3,4 ± 0,4 Hz (*test* de Mann Withney; p < 0,05).



**Figura 31. Neurona microinyectada con MCH yuxtacelular**. En la figura A se muestra el registro extracelular de la neurona registrada. En la figura B se muestra el histograma de frecuencias. Las flechas indican el momento de inyección de la MCH. En el recuadro se muestra el PA promedio (n=10). La línea punteada marca la media de la frecuencia de descarga antes de la administración de MCH. Como se puede observar, la MCH produce una disminución de la frecuencia de los PA de la neurona seguido de un marcado rebote postinhibición. El recuadro rosa claro indica el momento donde se observa el efecto de la MCH y el recuadro rosa oscuro indica el período donde se observa el rebote postinhibición.

Con el fin de confirmar si el efecto se reproduce en sucesivas microinyecciones de MCH, se administró MCH varias veces sobre dos neuronas, y se observó que la disminución en la frecuencia se mantuvo luego de cada administración. Un ejemplo se muestra en la Figura 32 donde se aplicó cinco veces MCH, obteniéndose en todos los casos una disminución en la frecuencia de descarga desde un promedio de 9,5  $\pm$  0,6 Hz a 6,4  $\pm$  0,7 Hz. La latencia fue de aproximadamente 0,6  $\pm$  0,01 s y una duración promedio de 31  $\pm$  2,5 s. Como se observa en la Figura 32, no se evidencia una clara variación de la intensidad del efecto en las primeras cuatro microinyecciones, pero sí se observa un mayor efecto luego de la quinta microinyección. Esta neurona presenta una descarga regular y rítmica, un HI unimodal, con un PA trifásico y una duración del PA de 2,2 ms.



**Figura 32. Neurona microinyectada con MCH yuxtacelular**. En A se muestra las características electrofisiológicas de la neurona. En B se muestra el registro extracelular de la neurona donde se observa que disminuye su frecuencia de descarga luego de la administración yuxtacelular de MCH. En C se muestra la frecuencia media (promedio cada 0,5 s) de la neurona en función del tiempo. La flecha señala el momento de administración de MCH. Se puede observar que la MCH produce una disminución de la frecuencia de descarga todas las veces, con una latencia muy similar. Orden de las inyecciones: 1º, anaranjado; 2º, rosa; 3º, verde; 4º, azul y 5º, negro.

En la Figura 33 se muestra una neurona con un patrón de descarga irregular y lento de 5,3  $\pm$  1,0 Hz, que no es rítmica en el HAC. Presenta un HI claramente bimodal, un PA trifásico con una duración de 1,9 ms (Figura 33 A). La aplicación del antagonista de MCHR-1 aumentó la frecuencia a un valor de 8,5  $\pm$  0,6 Hz (*test* de Mann Withney; p < 0,05). La latencia del efecto fue de aproximadamente 16 s con una duración del efecto de 85 s (Figura 33 B y C). Esta neurona presenta dobletes, pero por su bajo número no se evidencian en el HI.



**Figura 33. Neurona microinyectada con el antagonista de MCHR-1 ATCO175 yuxtacelular**. En A se muestra las características electrofisiológicas de la neurona. En B se muestra la frecuencia media de la neurona (promedio cada 0,1 s) en función del tiempo y el registro extracelular, donde se observa que aumenta su frecuencia de descarga luego de la administración yuxtacelular de antagonista de MCHR-1. En C se muestra el registro extracelular antes y después de la administración de antagonista de MCHR-1. Con los asteriscos se señala la presencia de dobletes mostrados en mayor detalle en el recuadro.

#### 6.5 Efecto de la MCH según las características electrofisiológicas de las neuronas

En conjunto, las microinyecciones de MCH en forma yuxtacelular e i.c.v., disminuyeron la actividad en el 61% de las neuronas registradas en el NMR (Tabla 2). De 22 neuronas que se inhibieron con MCH (tanto i.c.v. como yuxtacelular), 19 tenían PA con duraciones > 1.4 ms y 9 tenían frecuencias de descarga < a 4 Hz. Cuatro neuronas mostraron un patrón regular en su descarga y once presentaron una descarga rítmica o presentaron un intervalo predominante en el HAC. De las siete neuronas que presentaron descarga en brotes, cuatro de ellas fueron inhibidas con MCH (57%). De las 36 neuronas a las que se les administró MCH, siete presentaban tres o más de las clásicas características electrofisiológicas de las neuronas serotoninérgicas (PA ancho, baja frecuencia, actividad regular, rítmica y descarga en brotes). De éstas, cuatro neuronas (57%) fueron inhibidas por MCH. Es de destacar que de las neuronas que no fueron inhibidas por MCH, un 43% serían serotoninérgicas según sus características electrofisiológicas (Tabla 2).

Características	Nº de	Nº de neuronas (%)		
electrofisiológicas	neuronas	disminuyeron su Frec.	NO disminuyeron su Frec.	
Todas las neuronas	36	22 (61)	14 (39)	
PA > 1,4 ms	32	19 (57)	13 (39)	
Frecuencia de descarga < 4Hz	18	9 (50)	9 (50)	
Patrón rítmico	14	11 (78)	3 (21)	
Descarga en brotes	7	4 (57)	3 (43)	
3 o más características	7	4 (57)	3 (43)	

 Tabla 2. Efecto de la administración de MCH (i.c.v. o yuxtacelular) de acuerdo a características electrofisiológicas que distinguen a las neuronas serotoninérgicas.

En siete neuronas inyectadas con MCH se pudo determinar su relación con el ritmo theta. De éstas, cinco eran theta-on (Figura 19) y dos theta-off (Figura 20). De las neuronas theta-on, cuatro se inhibieron con MCH pero ninguna de éstas presenta las clásicas características de neurona serotoninérgica del rafe. Las neuronas theta-off no fueron inhibidas por MCH y tampoco presentaron características tipo serotoninérgica.

En toda la población de neuronas que fue tratada con MCH, no se detectaron diferencias significativas en la duración de los PA, la frecuencia basal ni el CV entre aquellas que disminyeron (n= 22) o no (n=14) su frecuencia de descarga frente a la administración de MCH (*test* de Student no pareado).

#### 6.6 Comparación con las neuronas del NDR

En comparación con los resultados obtenidos en nuestro trabajo previo en las neuronas del NDR (Devera, Pascovich y col., 2015; Anexo 1), la proporción de neuronas que mostraron disminución en su frecuencia de descarga luego de la administración de MCH fue de 61% en el NMR y de 70% en el NDR (*test* de Chi cuadrado; p =0,44). De las neuronas del NMR que se inhibieron con MCH, una menor proporción presentaba tres o más características electrofisiológicas clásicas de neuronas serotoninérgicas (57% vs 80%; *test* de Chi cuadrado; p = 0,11). El efecto de la MCH i.c.v. tuvo una latencia (156,1 ± 29,1 s vs 102,5 ± 29,3 s; NMR vs NDR; *test* de Student no pareado; p = 0,27) y una duración similar (389,6 ± 95,8 vs 480,3 ± 319,1 s; NMR vs NDR; *test* de Student no pareado; p = 0,78) en las neuronas de ambos núcleos. El efecto de la MCH yuxtacelular tuvo también una latencia similar (30,4 ± 9,7 s vs 32,6 ± 14,6 s; NMR vs NDR; *test* de Student no pareado; p = 0,76). Hay una tendencia a ser mayor la duración en el NDR (118,9 ± 39,8 s vs 252,0 ± 58,8 s; NMR vs NDR; *test* de Student; p = 0,052). En la Tabla 3 se presenta un resumen de estos resultados.

Tabla 3. Tabla comparativa del efecto de la MCH en el NMR y NDR.

	NMR	NDR
Neuronas inhibidas por MCH (%)	61	70
3 o + características serotoninérgicas (%)	57	80
Latencia MCH yxt. (s; media ± EE)	30,4 ± 9,7	32,6 ± 14,6
Duración MCH yxt. (s; media ± EE)	118,9 ± 39,8	252,0 ± 58,8
Latencia MCH i.c.v. (s; media ± EE)	156,1 ± 29,1	102,5 ± 29,3
Duración MCH i.c.v. (s; media ± EE)	389,6 ± 95,8	480,3 ± 319,1

Se compararon sólo las neuronas en que la MCH disminuía la frecuencia de descarga.

#### 6.7 Efecto de la estimulación hipotalámica sobre las neuronas del NMR

Se evaluó la respuesta de 31 neuronas del NMR a la estimulación eléctrica en trenes del HPL. La Figura 34 muestra la localización del electrodo de estimulación en el HPL. Utilizando intensidades entre 100 y 500  $\mu$ A no observamos diferencias mayores en la respuesta. Tres de estas neuronas mostraron una respuesta antidrómica (ya descritas previamente). De las restantes (n=28), trece neuronas (46%) se inhibieron frente a la estimulación del HPL modificando su frecuencia de descarga de 4,3 ± 1,3 Hz a 0,6 ± 0,2 Hz. Siete mostraron un rebote luego del efecto inhibitorio.



Figura 34. Confirmación histológica de la localización del electrodo de estimulación en el hipotálamo posterolateral. HPL, hipotálamo posterolateral. La barra de calibración corresponde a 1 mm. Coordenada: AP -3.2 mm desde Bregma.

Otro grupo de neuronas del NMR (n=9, 32%) mostró un aumento de la frecuencia de descarga frente a la estimulación hipotalámica desde una frecuencia basal de 12,8  $\pm$  4,2 Hz a 35,6  $\pm$  11,4 Hz. Cuatro de estas presentaron una supresión de la descarga posterior al efecto excitatorio.

Otro grupo de neuronas (n=3), presentaron una respuesta compleja de difícil interpretación. Dicha respuesta consistió en oscilaciones sucesivas en su frecuencia de descarga. El resto de las neuronas (n=2), no presentó cambios frente a la estimulación hipotalámica. Ejemplos del efecto de la estimulación hipotalámica se muestran más adelante.

Como se resume en la Tabla 4, de las neuronas que mostraron disminución de su frecuencia frente a la estimulación hipotalámica (n=13), seis (46%) presentaron características de las clásicas neuronas serotoninérgicas. De las neuronas que mostraron un aumento en la frecuencia de descarga en respuesta a la estimulación del HPL (n=9), tres (33%) mostraron características clásicas de neuronas serotoninérgicas. En dos de ellas se confirmó mediante inmunohistoquímica su fenotipo serotoninérgico (ver más adelante).

Características electrofisiológicas	№ de neuronas (%) que disminuyeron su Frec.	№ de neuronas (%) que aumentaron su Frec.
Todas las neuronas	13	9
PA > 1,4 ms	12 (92)	9 (100)
Frecuencia de descarga < 4Hz	8 (62)	4 (44)
Patrón rítmico	7 (54)	7 (78)
Descarga en brotes	1 (8)	1 (11)
3 o más características o 5-HT +	6 (46)	3 (33)

 Tabla 4. Características electrofisiológicas de las neuronas del NMR que aumentaron o disminuyeron la frecuencia de descarga frente a la estimulación del HPL.

De manera interesante, se observó que las neuronas que fueron inhibidas por la estimulación hipotalámica, presentaban frecuencias de descarga menores a 16,2 Hz (media de 4,3 ± 4,6 Hz), mientras que el grupo que respondía con aumento de la frecuencia frente a la estimulación era más heterogéneo, encontrándose frecuencias de descarga desde 0,03 Hz hasta 45,2 Hz (media de 13,8 ± 16,4 Hz). La frecuencia de descarga basal de las dos poblaciones tiende a ser significativamente diferente (*test* de Student no pareado; p=0,05), sugiriendo la presencia de dos poblaciones diferentes de neuronas en el NMR. El grupo de neuronas que se inhibieron presentó una duración del PA menor comparada con el grupo que respondió con aumento de la frecuencia (1,8  $\pm$  0,1 ms contra 2,6  $\pm$  0,01 ms; test de Student no pareado; p < 0,05). Sin embargo, estos grupos no difieren significativamente en sus CV (p=0,71), latencia del efecto (p=0,24) ni duración del mismo (p=0,65). Tampoco hay correlación entre la frecuencia basal y la latencia del efecto ( $R^2$ =0,00), ni entre la frecuencia basal y la duración del efecto ( $R^2$ =0,07). Además, las neuronas que respondieron con inhibición a la estimulación del HPL se encuentran localizadas todas en el centro del NMR, dónde existe mayor densidad de neuronas serotoninérgicas, mientras que tanto las neuronas que presentaron estimulación, efecto complejo o no presentaron efecto se localizaron en el rafe paramedial (ver Figura 17).

La latencia del efecto inhibitorio frente a la estimulación hipotalámica fue de 0,1  $\pm$  0,06 s y la duración de 0,7  $\pm$  0,1 s. La latencia promedio del efecto excitatorio fue de 0,03  $\pm$  0,01 s y la duración de 1,2  $\pm$  0,6 s.

En la Figura 35 se muestra un ejemplo del efecto de la estimulación hipotalámica. Esta neurona presenta un patrón de descarga de 2,2  $\pm$  0,6 Hz, irregular, con un intervalo predominante en el HAC, un HI bimodal y un PA trifásico con una duración de 1,6 ms. La estimulación hipotalámica produjo una disminución de la frecuencia de descarga desde un valor de 0,1  $\pm$  0,1 Hz a 0,03  $\pm$  0,08 Hz (*test* de Mann Withney; p < 0,05). La latencia del efecto fue de menor a 1 s, con una duración del efecto de aproximadamente 1,5 s.



Figura 35. Efecto de la estimulación eléctrica del hipotálamo posterolateral sobre la actividad de una neurona del NMR. A. Características electrofisiológicas de la neurona registrada. B. Registro extracelular. Las flechas indican los momentos de estimulación. La intensidad de estimulación fue de 100  $\mu$ A.C. Histograma periestímulo. D. Localización de la neurona registrada identificada por neurobiotina. Coordenada anteroposterior -8 mm de Bregma. Calibración 20  $\mu$ m. Nótese en B la aparición de una neurona con un PA de menor amplitud luego de la estimulación.

Otro ejemplo se muestra en la Figura 36. La neurona presenta un patrón de descarga de 44,4  $\pm$  9,8 Hz, irregular, que muestra ritmicidad en el HAC, un HI unimodal y un PA trifásico con una duración de 1,9 ms. La estimulación hipotalámica produjo un aumento de la frecuencia de descarga desde un valor de 44,4  $\pm$  9,8 Hz a 130,0  $\pm$  41,2 Hz (*test* de Mann Withney; p < 0,05). La latencia del efecto fue 0,1 s, con una duración del efecto fue de 0,3 s (Figura 36 C). Nótese como el aumento de la descarga comienza hacia el final del tren de estímulos y continua después del mismo (Figura 36 B, recuadro).



**Figura 36. Efecto de la estimulación eléctrica del hipotálamo posterolateral sobre la actividad de una neurona del NMR.** A. Características electrofisiológicas de la neurona registrada. B. Registro extracelular de la unidad registrada. La barra indica el momento de la estimulación. C. El histograma periestímulo muestra un aumento de la frecuencia frente a la estimulación hipotalámica. La intensidad de estimulación fue de 100 μA.

## 6.8 Efectos de la estimulación hipotalámica sobre las neuronas serotoninérgicas

Del grupo de neuronas sobre el que se estudió el efecto de la estimulación hipotalámica, se marcaron ocho con neurobiotina. Todas se encontraban dentro de los límites del NMR (Figura 16). De éstas, cuatro presentaron marcación múltiple para neurobiotina y por esa razón fueron descartadas para la identificación fenotípica, pero no para su localización (Figura 16 C y D). Las otras cuatro neuronas fueron exitosamente marcadas. De estas últimas, todas resultaron ser serotoninérgicas (se muestran ejemplos en la Figura 24). Una de estas neuronas presentó estimulación antidrómica (ya comentado previamente). De las otras tres, una respondió con un aumento de su frecuencia de descarga, otra con una disminución y la restante no presentó efecto.

# 7. DISCUSIÓN

En el presente trabajo describimos en primera instancia las características de las neuronas registradas en el NMR. Luego nos centramos en analizar el efecto de la MCH sobre esta población neuronal y para ello utilizamos diferentes estrategias experimentales: la administración i.c.v. y la administración yuxtacelular. También analizamos el efecto de la estimulación directa del HPL, dónde se localizan los somas de las neuronas MCHérgicas. Pudimos demostrar que aproximadamente un 60% de las neuronas del NMR disminuyeron su frecuencia de descarga frente a la MCH administración yuxtacelular del antagonista de MCHR-1 tuvo el efecto contrario; el 70% de las neuronas registradas aumentó su frecuencia de descarga en el 46% de las neuronas. En conjunto, los datos obtenidos en el presente trabajo sugieren que el sistema MCHérgico participa en la regulación de la actividad neuronal del NMR.

#### 7.1 Características electrofisiológicas de las neuronas registradas en el NMR

Las características de las neuronas del NMR son menos conocidas que las del NDR. Existen algunos trabajos que intentan clasificar estas neuronas en grupos de frecuencias pero sobre todo han estudiado su relación con el ritmo theta hipocampal (Kocsis y col., 2006, Viana Di Prisco y col., 2002). Viana Di Prisco y col. (2002), clasifica las neuronas registradas bajo uretano en tres grupos según sus frecuencias de descarga: de alrededor de 1 Hz, de 5-11 Hz y mayor a 12 Hz. En nuestro trabajo hemos estudiado las características electrofisiológicas de 107 neuronas y acorde con este antecedente, se obtuvo una distribución similar: uno grupo presenta frecuencias menores a 4 Hz, otro de 4-10 Hz y un tercer grupo frecuencias mayores a 10 Hz (Figura 18). Para obtener un resultado más claro de esta distribución, sería necesario registrar y analizar un número mayor de neuronas. En cuanto a la relación con el ritmo theta, en este trabajo se logro estudiar dicha relación en veintitrés neuronas. Doce de éstas (52%) fueron theta-on (Figura 19), seis neuronas (26%) fueron theta-off (Figura 20) y cinco (22%) no presentaron relación con el ritmo theta. Estas proporciones son similares a las descritas por Viana di Prisco y col. (2002), que fueron de 68% para las neuronas theta-on, y 32% para las theta-off.

En cuatro neuronas se pudo identificar su fenotipo serotoninérgico (Figuras 24). Éstas presentaron descarga rítmica, HI unimodales y PA trifásicos anchos. Tres de ellas presentaban

frecuencias de descarga regulares menores de 5 Hz y una presentó una frecuencia de aproximadamente 12 Hz. Esta heterogeneidad en las características de las neuronas del NMR sugiere la existencia de subgrupos funcionalmente distintos en el NMR, aunque un número mayor de neuronas identificadas sería necesario para comprobarlo.

Una característica poco estudiada en las neuronas del NMR es la descarga en brotes. Hajos y col., (1995), han reportado que un 10% (4/40) de las neuronas del NMR presentan descarga en brotes. En nuestro estudio, hemos encontramos que un 20% de las neuronas registradas (21/107) presentan descarga en brotes (Figura 23). Esta proporción es mayor que la reportada previamente. Determinar si todas o sólo una subpoblación de neuronas serotoninérgicas del rafe son capaces de descargar con un patrón en brotes es un punto de discusión interesante. En el presente estudio encontramos una neurona con descarga en brotes identificada como no-serotoninérgica, sugiriendo una heterogeneidad mayor en el NMR que en el NDR.

Es importante notar, que las neuronas con descargas en brotes que fueron examinadas hasta ahora, no cambian a un modo de descarga simple durante el periodo de registro control y tampoco ocurre la situación inversa. Más aún, las neuronas con descarga en brotes, luego de ser inhibidas por agonistas serotoninérgicos, continúan descargando de esta manera (Hajos y col., 1995). Sin embargo, los antagonistas serotoninérgicos incrementan la proporción de dobletes en neuronas con descarga en brotes pero no modifican el patrón de descarga de potenciales únicos a brotes (Hajos y col., 1995). En nuestros experimentos observamos efectivamente un cambio en el patrón de descarga de las neuronas del NMR frente a la estimulación del HPL. Neuronas que en su descarga basal no presentaban brotes, durante y luego de una estimulación hipotalámica que resultó excitatoria, cambiaron su patrón de descarga presentando típicas descargas en brotes en forma de dobletes. Esto ocurrió en un 20% de las neuronas sin descarga en brotes (5/25), llevando el porcentaje total de neuronas con este tipo de descarta a un 24%. Las neuronas que tenían descarga en brotes en condiciones basales (4/31, 13% de las neuronas estimuladas), continuaron presentando el mismo patrón de descarga luego de la estimulación hipotalámica.

No se sabe aún el significado funcional de este tipo de descarga en estas neuronas. Se ha planteado que podría modificar tanto la liberación de serotonina a nivel dendrítico como axonal y proveer una opción adicional de señalización neuronal. En este sentido, es posible que la diferencia de potencial generada por la segunda espiga de los dobletes provoque una

62

despolarización que invade una proporción mayor de la célula, lo cual podría modificar la liberación de serotonina dendrítica (Pecci Saavedra y col., 1986).

Neuronas con descarga en brotes también se han descrito en el hipocampo y en la sustancia nigra (Grace y Bunney, 1983). Estudios previos han demostrado que el patrón de descarga en brotes de neuronas en otras regiones del SNC puede ser modificado en situaciones fisiológicas o patológicas (Calvin, 1975, Kjerulf y col., 1973). Entonces, es posible que en diversas situaciones fisiológicas en que el HPL cumpla un rol predominante (Ej. situación de huída o lucha), éste pueda contribuir a aumentar la descarga en brotes en neuronas blanco. En este sentido, las hipocretinas, que intervienen en las respuestas de huída o lucha y que activan las neuronas del rafe (Takahashi y col., 2005), podrían facilitar la descarga en brotes (Chase, 2013).

En tres neuronas del NMR se identificó una respuesta antidrómica (Figura 22); los que demuestra que un grupo de neuronas del NMR (10%), proyecta al HPL o a través del mismo. Estas neuronas no presentaron características diferentes a las demás neuronas del NMR. Una de estas neuronas se identificó como serotoninérgica lo cual demuestra la proyección de las neuronas serotoninérgicas al HPL o su proyección a través del mismo.

#### 7.2 Efecto de la MCH sobre las neuronas del NMR

Acorde con resultados previos a nivel del NDR (Devera, Pascovich y col., 2015), observamos que cuando la MCH es administrada en el ventrículo lateral de la rata, ésta alcanza las neuronas del NMR luego de una latencia de un par de minutos. La MCH produce una disminución en la frecuencia de descarga en el 53% de las neuronas del NMR que duró por varios minutos (Figuras 26 y 27). Además del efecto directo de la MCH sobre las neuronas del NMR, la modulación de otros circuitos neuronales también podría participar de la supresión de la descarga. Sin embargo, la administración yuxtacelular de MCH demuestra la presencia de una respuesta local (pre y/o postsináptica) en las neuronas testeadas (Figura 29), que además es estable y reproducible después de repetidas administraciones de MCH (Figura 32). La falta de efecto sobre algunas neuronas va acorde con el hecho de que algunas neuronas del NMR no presentan receptores para MCH (estudiado por la internalización de MCH-R, Figura 9, resultados no publicados) y sugiere especificidad celular de la modulación MCHérgica a nivel del NMR.

En algunas neuronas, la disminución de la descarga inducida por MCH fue seguida por un fuerte incremento en la frecuencia de disparo (rebote). Este efecto podría ser producido por corrientes rectificadoras entrantes (que están presentes en las neuronas serotoninérgicas) que resultan en un rebote postinhibitorio (Williams y col., 1988), aunque un mecanismo circuital no puede descartarse.

El efecto opuesto producido por la administración yuxtacelular del antagonista de MCHR-1 sugiere especificidad en la respuesta producida por la administración de MCH; a la vez que sugiere una acción inhibitoria de la MCH sobre estas neuronas. También sugiere que existe una liberación endógena de MCH.

En este trabajo se utilizó como control el solvente del péptido, el cual no generó efecto en ninguna de las neuronas testeadas. No consideramos utilizar el péptido desnaturalizado porque el efecto obtenido es un efecto consistente, acorde a lo que dice la literatura en otras áreas. A su vez, se destaca que un péptido de similar peso molecular como las hipocretinas, tiene un efecto opuesto (Tao y col., 2006).

#### 7.3 Efecto de la estimulación del HPL

Desde el punto de vista técnico, es importante destacar que no observamos cambios de signo en la respuesta neuronal para intensidades de estimulación entre 100 y 500  $\mu$ A. Sin embargo, sabemos que las latencias y duraciones de las respuestas son dependientes de la intensidad del estímulo. Por lo tanto, las latencias y duraciones descritas, tienen como fin brindar una visión global del efecto para las intensidades utilizadas.

Varias evidencias apoyan la hipótesis de la modulación neural directa del sistema MCHérgico sobre el rafe. La evidencia más clara es la presencia de fibras que contienen MCH y neuropéptido E-I en el NMR (Bittencourt y col., 1992, Lopez Hill y col., 2013). En nuestros experimentos hemos observado que la estimulación eléctrica del HPL, donde se encuentran los cuerpos neuronales MCHérgicos, produce una disminución de la frecuencia de descarga en el 46% de las neuronas testeadas del NMR. Además, seis de éstas (46%) presentaron características electrofisiológicas de neuronas serotoninérgicas, de las cuales una fue confirmada mediante inmunofluorescencia. Esta supresión de la descarga puede estar mediada por MCH, aunque para demostrarlo es necesario revertir el efecto con antagonistas MCHergicos (ver perspectivas). Es interesante destacar que la estimulación hipotalámica disminuyó la frecuencia de descarga sobre todo en una población de neuronas que presentaban menor frecuencia de descarga y también en las que se localizaron principalmente en el sector medial del NMR. Estos hechos sugieren que la población blanco de este efecto sería sobre todo las neuronas serotoninérgicas.

64

En el 32% se observó un aumento de la frecuencia de descarga. De éstas, tres neuronas (33%) tenían características electrofisiológicas de ser serotoninérgicas y una de ellas fue confirmada mediante inmunofluorescencia. El aumento de la frecuencia de descarga observado frente a la estimulación del HPL podría ser explicado por la supresión de una inhibición local preexistente. Otra posibilidad es que sea mediado por la liberación de hipocretinas, ya que las neuronas hipocretinérgicas también se encuentran en el HPL (Hahn, 2010). Estudios in vitro en neuronas serotoninérgicas y GABAérgicas del NDR (Brown y col., 2002, Liu y col., 2002) e in vivo tanto en animales anestesiados como despiertos (Takahashi y col., 2005), muestran que las hipocretinas despolarizan estas neuronas. Acorde con esto, se ha demostrado la existencia de receptores para hipocretinas 1 y 2 en las neuronas serotoninérgas del NDR (Brown y col., 2002) y la existencia de receptores para hipocretina 1 pero no para hipocretina 2 en el NMR (Trivedi y col., 1998). Se ha estudiado el efecto de las hipocretinas en la liberación de serotonina mediante microdiálisis in vivo. La hipocretina-1 produce un incremento dosis dependiente de los niveles de serotonina in vivo en el NDR, pero no en el NMR. Sin embargo, la hipocretina-2 provocó un pequeño pero significativo efecto excitatorio tanto en el NDR como el NMR in vivo en ratas no anestesiadas (Tao y col., 2006). Es importante saber que la hipocretina-1 tiene mayor afinidad que la hipocretina-2 por el receptor de hipocretina tipo 1, pero ambos péptidos tienen similar afinidad por el receptor de hipocretina tipo 2.

Existe la posibilidad de que los efectos observados sean mediados por otros neurotransmisores presentes en otras neuronas del HPL, o presentes en las propias terminales MCHérgicas. En este sentido, evidencia reciente sugiere que las varicosidades MCHérgicas pueden contener otros neurotransmisores. Por ejemplo, además de mediar sus efectos inhibitorios de forma parácrina a través péptidos, también lo pueden hacer a través de la liberación sináptica de GABA en el locus coeruleus (Del Cid-Pellitero y Jones, 2012). Además, se ha demostrando mediante optogenética, que las fibras MCHérgicas a nivel del núcleo septal lateral pueden liberar glutamato. Esto lleva secundariamente a una liberación de GABA que disminuye la actividad neuronal del septo lateral (Chee y col., 2015). No se puede descartar tampoco, que en nuestros experimentos, tanto el efecto inhibitorio como el estimulatorio estén mediados por otros neurotransmisores como por ejemplo el neuropéptido E-I cuyos efectos celulares aún no se conocen.

#### 7.4 ¿La MCH inhibe fisiológicamente las neuronas del NMR?

Si bien evidenciamos el efecto de la administración yuxtacelular de MCH sobre las neuronas del NMR, no podemos afirmar que dicho efecto sea fisiológico. Para comprobar que un neurotransmisor o un neuromodulador es el mediador fisiológico de una respuesta inducida por un estímulo se requiere que se cumplan diversos criterios: la presencia del neurotransmisor o neuromodulador en las terminaciones nerviosas y liberación hacia el efector con la estimulación nerviosa, la correlación temporal entre el aumento del neurotransmisor en el efector y la respuesta, la administración exógena debe producir la respuesta, la respuesta debe ser reproducida con concentraciones del mediador equivalentes a las del estímulo fisiológico y la respuesta al estímulo debe ser bloqueada por antagonistas específicos de los receptores o eliminada con anticuerpos específicos para el agente propuesto.

En el caso de la MCH en el rafe, existen evidencias que apoyan algunos de estos puntos. Se ha demostrado la presencia de terminaciones de fibras MCHérgicas en el NMR (Bittencourt y col., 1992, Lopez Hill y col., 2013) y también evidencia de la existencia de receptores de MCH a dicho nivel (Torterolo y col., datos no publicados).

También hemos observado en nuestros experimentos una clara correlación temporal entre la administración exógena de MCH (mediante administración yuxtacelular) y la respuesta. Sin embargo, no hemos realizado experimentos para comprobar la relación entre el aumento de la MCH endógena y la respuesta observada.

Las concentraciones utilizadas en el presente trabajo se basaron en trabajos previos (Devera y col., 2015, Torterolo y col., 2008). Dado que no conocemos las concentraciones fisiológicas de MCH en el NMR es muy probable que no hayamos utilizado niveles comparables a los endógenos. En este sentido sería de interés realizar una curva dosis-respuesta para explorar con más detalle este punto. Por otro lado, los niveles fisiológicos de MCH en el LCR, están en el órden de los pg/ml (Pelluru y col., 2013). Sin embargo, la MCH administrada i.c.v. se encuentran en el órden del los ng/ml, si se ajusta al volumen de LCR en la rata, de aproximadamente 90 µl (Pardridge, 2011). Dado que las dosis utilizadas en este trabajo son suprafisiológicas, no se puede descartar que el efecto observado se deba a unión inespecífica de la MCH sobre otros receptores. Sin embargo, la administración del antagonista de MCHR-1 provocó un efecto opuesto, lo cual apoya la especificidad del efecto observado y pone en evidencia la existencia de liberación endógena de MCH en el NMR.

Si bien hemos realizado estimulación eléctrica en el HPL con el fin de provocar la liberación de MCH en el rafe, no podemos afirmar que este neuromodulador efectivamente se esté liberando en el rafe, ni que éste sea el único liberado en respuesta a la estimulación. Por lo tanto, no podemos afirmar con total certeza que la MCH inhibe fisiológicamente por esta vía las neuronas del rafe, si bien nuestros resultados apoyan dicha hipótesis.

#### 7.5 Efecto de la MCH en las neuronas serotoninérgicas

Nuestros resultados sugieren que la MCH disminuye la frecuencia de descarga de neuronas serotoninérgicas del NMR. Este hecho se sustenta en que una población neuronal con características electrofisiológicas de "tipo-serotoninérgico" disminuye su frecuencia de descarga en presencia de MCH, basados en los criterios "clásicos" de clasificación descritos en la literatura (Aghajanian, 1972, Aghajanian y col., 1978, Blier y col., 1990, Hajos y col., 1995, Jacobs y Azmitia, 1992, Kocsis y col., 2006). Es decir, PA anchos, frecuencia de descarga regular, de 1-5 Hz, rítmicas y que descargan en brotes. Con esta clasificación sabemos que estamos subestimando el número de neuronas serotoninergicas (aproximación conservadora), ya que neuronas con descarga atípica pueden ser serotoninergicas (Kocsis y col., 2006). Sin embargo, también hay un pequeño grupo de neuronas con estas características que no serían serotoninérgicas según la bibliografía (Calizo y col., 2011). Si bien los criterios electrofisiológicos usados para identificar las "supuestas" neuronas serotoninérgicas en estudios previos serían apropiados como una primera aproximación a la clasificación de las neuronas del rafe, éstos fallan en identificar subpoblaciones con propiedades de descarga atípica (Allers y Sharp, 2003, Kirby y col., 2003, Kocsis y col., 2006, Li y col., 2001). Por lo tanto, además de los datos electrofisiológicos, es necesario confirmar el fenotipo serotoninérgico con inmunohistoquímica, técnica que hemos utilizado con éxito en cuatro neuronas del NMR. Estas cuatro neuronas presentaron descarga rítmica, HI unimodales y PA trifásicos anchos. Tres de ellas tuvieron frecuencias de descarga regulares menores de 5 Hz y una exhibió una frecuencia de 11,6 ± 5,6 Hz. Estas características electrofisiológicas concuerdan con las características de las neuronas serotoninérgicas descritas en la bibliografía (Aghajanian y Vandermaelen, 1982a), aunque sería necesario aumentar el "n" para llegar a una conclusión más certera. En una de estas neuronas se demostró su proyección al HPL, ya que presentó una respuesta antidrómica frente a la estimulación hipotalámica. De las tres neuronas restantes, una fue inhibida por la estimulación del HPL; otra fue estimulada y la última no presentó efecto alguno. Esta heterogeneidad de la respuesta de las neuronas serotoninérgicas del NMR sugiere la posibilidad de la existencia de subgrupos funcionalmente distintos en el NMR.

En una neurona que no presentó efecto frente a la MCH, se pudo determinar su fenotipo neuronal como no-serotoninérgica (Figura 28). Sin embargo, dicha neurona cumplía con los criterios clásicos de neurona serotoninérgica, incluida la descarga en brotes, lo cual recalca la importancia de la inmunodetección para determinar el fenotipo neuronal (Allers y Sharp, 2003, Kirby y col., 2003, Kocsis y col., 2006, Li y col., 2001).

Dado que la MCH es un neuromodulador inhibitorio, esperamos un efecto directo (postsináptico) inhibitorio en las células del NMR. Sin embargo, un aumento de la frecuencia de descarga fue observado en una neurona con características electrofisiológicas de "tipo-GABAérgica". Las neuronas que presentan PA de corta duración (< 1,4 ms), rápidos (7-30 Hz) han sido descritos como probablemente GABAérgicas en el NDR (Aghajanian y col., 1978, Hajos y col., 1995). En gatos y ratas, la MCH-R es internalizada en neuronas no serotoninérgicas de pequeño tamaño del NMR (Torterolo y col., datos no publicados; Figura 10). En nuestro trabajo previo (Devera, Pascovich y col., 2015), hemos demostrado que algunas de estas neuronas de pequeño tamaño que internalizaron MCH-R en el NDR, eran GABAérgicas. Por lo tanto, es posible que exista un efecto excitatorio en neuronas no serotoninérgicas (posiblemente GABAérgicas). Dado que la MCH provoca un fuerte efecto presináptico, disminuyendo la liberación de GABA en el hipotálamo (Gao y van den Pol, 2001), el efecto excitatorio podrían explicarse por una desinhibición presináptica. De hecho, además de la presencia de MCH-R en el soma de las neuronas del NMR, se observaron marcas puntuales de MCH-R tanto en el NMR (Figura 10), como en el NDR (Figura 9 B) (Devera, Pascovich y col., 2015), sugiriendo la presencia de internalización de MCH-R en estructuras presinápticas.

En nuestros experimentos, tres neuronas con características de "tipo-serotoninérgica" no respondieron a la MCH. A su vez, la MCH provocó una disminución de la frecuencia en 18 neuronas con características electrofisiológicas de "tipo no-serotoninérgica", posiblemente GABAérgicas. Esto concuerda con los estudios de MCH-R (Torterolo y col., resultados no publicados), dónde evidenciamos que la MCH-R se internalizó tanto en neuronas serotoninérgicas como no-serotoninérgicas, y también que algunas neuronas serotoninérgicas no internalizaron MCH-R.

#### 7.6 Diferencias en el efecto de la MCH en las neuronas del NMR y NDR

En nuestro trabajo previo (Devera, Pascovich y col., 2015), hemos estudiado el efecto de la MCH en neuronas del NDR empleando la misma metodología que en el presente trabajo. En el NMR, el porcentaje de neuronas consideradas como serotoninérgicas, según sus características electrofisiológicas, fue menor que en el NDR (19 vs 27% respectivamente) aunque esta diferencia no es significativa para la muestra trabajada. Esto estaría de acuerdo con el hecho de que el número y la proporción de neuronas serotoninérgicas es un poco mayor en el NDR que en el NMR (aproximadamente un tercio del total de neuronas del NDR) (Adell y col., 2002). Además, el porcentaje de neuronas serotoninérgicas constituye un 20-30% del total de neuronas del NMR (Vertes y Crane, 1997). Esto hace que la probabilidad de registrar neuronas serotoninérgicas en el NDR sea algo mayor que en el NMR.

Las microinyecciones de MCH (yuxtacelular e i.c.v.) disminuyeron la actividad en un menor porcentaje de neuronas en el NMR que en el NDR (61 vs 70%) (Tabla 3). En el NMR 3/7 (61%) supuestas neuronas serotoninérgicas, se inhibieron con MCH mientras en el NDR esta proporción fue mayor (8/10; 80%).

La proporción de neuronas con descarga en brotes en el NDR fue de 13% mientras que en el NMR fue de 20%. Es de destacar, que de siete neuronas con descarga en brotes en el NMR (con similares características a las consideradas serotoninérgicas en el NDR (Hajos y col., 2007), cuatro de ellas fueron inhibidas con MCH (57%). Sin embargo, no se ha demostrado en el NMR que las neuronas con descarga en brotes sean serotoninérgicas. Además, cabe destacar que una neurona identificada por inmunohistoquímica como no serotoninérgica, presentó descarga en brotes. A diferencia de esto, en el NDR todas las neuronas con descarga en brotes consideradas serotoninérgicas fueron inhibidas por MCH.

En el NMR, la latencia al efecto de la MCH administrada intraventricularmente tuvo tendencia a ser mayor que en el NDR, aunque esta diferencia no fue significativa probablemente debido al bajo "n" (nueve en el NMR y cuatro en el NDR). Una mayor latencia en el NMR era esperable ya que según nuestra hipótesis, la MCH sería transportada desde el LCR hacia el parénquima y el NMR se encuentra a mayor profundidad que el NDR. La duración del efecto fue similar cuando al MCH fue administrada de forma i.c.v.. Por otro lado, el efecto de la MCH yuxtacelular tuvo una latencia y duración similar al comparar los resultados obtenidos en el

69

NMR y NDR (Tabla 3). Hay una tendencia a ser mayor la duración en el NDR. En este caso no esperábamos diferencias en la latencia ni en la duración del efecto de la MCH.

## 7.7 Significado biológico del efecto de la MCH en el NMR. Fisiología y fisiopatología.

#### 7.7.1 Relación con la fisiología del sueño

Las neuronas serotoninérgicas del NMR como las del NDR, que son parte de la formación reticulada mesopontina, la cual es la clave para la generación y mantenimiento del SREM (Siegel, 2009). Estas neuronas presentan una descarga tónica durante la vigilia, decrecen su actividad durante el sueño lento y se inactivan casi totalmente durante el SREM (McGinty y Harper, 1976, Rasmussen y col., 1984, Trulson y col., 1984). La disminución de la liberación de serotonina en diversas áreas cerebrales durante el sueño y el aumento durante la vigilia se correlaciona con estos hallazgos electrofisiológicos (Portas y col., 2000, Rueter y Jacobs, 1996). En estrecha relación a la inhibición de las neuronas serotoninérgicas mesopontinas durante el SREM, se destaca que la activación experimental de éstas, bloquea la generación de SREM, mientras que su inhibición lo promueve (Monti y Jantos, 2003, Monti y col., 2002, Monti y col., 2000). Así, estas neuronas son consideradas "permisivas" para la generación de SREM (Adrien, 2002). Dado que las neuronas MCHérgicas, que proyectan al NMR, están activas durante el SREM (Hassani y col., 2009, Yoon y Lee, 2013), así como el hecho de que microinyecciones de MCH en el NDR (Lagos y col., 2009) y NMR (Pascovich y col, resultados preliminares) promueven el SREM, tenemos la hipótesis de que la MCH inhibe a las neuronas serotoninérgicas en este núcleo y mediante esta acción contribuye a la generación del SREM. Por lo tanto, la disminución de la frecuencia de descarga de las supuestas neuronas serotoninergicas por la MCH, podría estar involucrada en este efecto. De todas formas, es necesario comprobar que este efecto sea producido en neuronas identificadas como serotoninergicas por inmunohistoquimica.

## 7.7.2 Relación con la fisiopatología de la depresión mayor

Un hecho de particular interés, es la relación de la DM con el SREM (Kimura y col., 2014). Los síntomas de DM se acompañan de trastornos en los patrones del ciclo sueño-vigilia, en particular, se caracteriza por presentar una disminución de la latencia al SREM (uno de los signos más robustos y específicos), aumento del tiempo en SREM, aumento de la duración del primer período nocturno de SREM y aumento de la densidad de los movimientos oculares rápidos durante esta etapa. El hecho de que los fármacos antidepresivos disminuyan o supriman el SREM y que la privación selectiva de SREM sea eficaz en el tratamiento de la DM subraya la relación entre esta patología y el SREM (Cryan y col., 2002).

Cuando la MCH es administrada en el NDR (Lagos y col., 2009) o en el NMR (Pascovich y col., observaciones no publicadas), se promueve el SREM y también se induce un efecto prodepresivo (Lagos y col., 2011b, Lopez Hill y col., 2013). Nuestra hipótesis es que este efecto es mediado por la inhibición de las neuronas serotoninergicas. En este trabajo un 57% de neuronas con características de tipo serotoninértica diminuyeron su decarga frente a la administración MCH. Se necesitaría un mayor número y sobre todo la confirmación del fenotipo neuroquímico para poder determinar con mayor exactitud la proporción de neuronas serotoninérgicas que disminuyen su frecuencia de descarga frente a la MCH en este núcleo.

# 8. CONCLUSIONES

Concluimos que la MCH disminuye tanto la actividad de neuronas serotoninérgicas como no-serotoninérgicas en el NMR. La existencia de una importante inervación MCHérgica en el NMR sugiere que este efecto puede ser llevado a cabo a través de una vía neural directa.

Por otro lado, las evidencias previas de la presencia de MCH en el LCR y en los tanicitos, la incorporación de MCH-R (microinyectada en el ventrículo lateral), sugieren que el efecto podría ser producido por una vía neurohumoral mediante su liberación al LCR. En este sentido, evidenciamos la modulación de la frecuencia de descarga de las neuronas del NMR cuando la MCH es microinyectada a nivel ventricular. A través de esta vía la MCH ejercería un efecto modulador tónico y posiblemente un efecto neurotrófico (Azmitia, 1999, Azmitia, 2007) sobre las neuronas del NMR.

Al comparar el efecto de la MCH sobre las neuronas del NMR y el NDR (Devera, Pascovich y col., 2015), no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la proporción de neuronas de "tipo serotoninérgica" que disminuyeron su descarga, la duración ni la latencia del efecto.

Por último proponemos que el efecto inhibitorio de la MCH sobre las neuronas serotoninérgicas del NMR contribuye a la generación, modulación y/o mantenimiento del SREM y al efecto pro-depresivo inducido por la MCH.

71
## 9. PERSPECTIVAS Y RESULTADOS PRELIMINARES

Dado que los resultados que hemos obtenido en este trabajo dan lugar a nuevas preguntas a responder, nos hemos planteado nuevos objetivos a corto y a mediano plazo, los cuales mencionaremos a continuación.

## En primer lugar nos proponemos los siguientes objetivos:

## • Completar el estudio del efecto inhibitorio de la MCH

Con el fin de estudiar si el efecto en la disminución de la descarga observado es fisiológico, en primer lugar se planea determinar la concentración fisiológica de MCH a nivel del NMR mediante microdiálisis, para posteriormente realizar curvas dosis-respuesta para la MCH y para el antagonista de MCHR-1 yuxtacelular. También se plantea hacer curvas dosis-respuesta del efecto de la MCH i.c.v., teniendo en cuenta los valores fisiológicos conocidos de la MCH en el LCR (Pelluru y col., 2013).

## Determinar el efecto de la MCH en las neuronas serotoninérgicas o GABAérgicas

Nos proponemos continuar con los experimentos de inyección y marcado yuxtacelular con doble inmunofluorescencia, para determinar y caracterizar si las neuronas que disminuyen su frecuencia de descaga frente a la administración de MCH son serotoninérgicas, GABAérgicas o de otro fenotipo neuroquímico y aumentar el número de las neuronas identificadas como serotoninérgicas. A a esto también se podrían sumar herramientas farmacológicas como por ejemplo la administración de agonistas 5HT<sub>1A</sub>, utilizado para identificar neuronas serotoninergicas, ya que presentan autoreceptores 5HT<sub>1A</sub>.

## • Completar los estudios de estimulación hipotalámica

Hemos determinado que frente a la estimulación del HPL, 46% de las neuronas presentaron una disminución de su frecuencia de descarga. Una de las hipótesis planteadas es que esta respuesta se podría deber a la inhibición mediada por MCH. Como primera aproximación a esta pregunta nos proponemos realizar la estimulación hipotalámica bajo el efecto de antagonistas de MCH aplicados de forma yuxtacelular en NMR. Otra hipótesis es que el efecto en la disminución de la descarga se deba a otro neuromodulador como el GABA. Para comprobar ésto una estrategía sería estimular el HPL y obervar si el efecto en la disminución de la descarga se bloquea en presencia de un antagonista GABAérgico.

### Otros objetivos a mediano plazo son:

## • Estudiar la presencia de receptores para MCH en el NMR

Nuestros resultados muestran que tanto las neuronas que presentan características electrofisiológicas de "tipo-serotoninérgico" como las que no, pueden responder a la MCH (Tabla 2). El paso posterior es estudiar la presencia de receptores para MCH en el NMR y si son solo las neuronas serotoninérgicas que los presentan o también están presentes en las GABAérgicas y/o otros tipos neuronales. Estamos realizando experimentos en ese sentido (ver Figura 10).

## • Estudiar el efecto de la administración de MCH en el NMR sobre el sueño

Dado que la MCH tiene un efecto inhibitorio en una gran proporción de las neuronas del NMR, nos hemos planteado la pregunta de si a través de esta vía la MCH estaría implicada en la generación y/o mantenimiento del SREM. Para demostrar dicha hipótesis, estamos estudiando el efecto de la microinyección de MCH en el NMR sobre el ciclo sueño-vigilia, en ratas implantadas para registro polisomnográfico y en condiciones de libre movimiento. En la Figura 37 se muestran resultados representativos de experimentos preliminares. El promedio de los tres animales estudiados muestra que la MCH aumentó el porcentaje tanto de SNREM profundo (sueño de ondas lentas) de 16% a 22%, como de SREM de un valor basal de 4% a 9%. Estos resultados preliminares apoyan nuestra hipótesis de que la MCH actuando a través del NMR, facilita la generación de sueño.



Figura 37. Hipnogramas representativos que ilustran la ocurrencia de sueño y vigilia luego de la microinyección de MCH en el NMR. Se muestra el efecto de la aplicación de salina, 50 ng de MCH y 100 ng de MCH. Se observa un aumento tanto del número de episodios de S2, como de sueño REM. Los registros fueron realizados en el periodo de oscuridad. V, Vigilia; S1 y S2, SNREM ligero y profundo; REM, sueño de movimientos oculares rápidos.

### Estudiar el efecto de antidepresivos sobre las neuronas MCHérgicas

Existe evidencia que muestra que el sistema MCHérgico está involucrado en la DM (Torterolo P, 2014b). A partir de estos datos, nos planteamos la hipótesis de que los antidepresivos podrían modular, directa o indirectamente, la frecuencia de descarga de las neuronas MCHérgicas. Como abordaje experimental, nos planteamos estudiar el efecto de la fluoxetina sobre la descarga de las neuronas MCHérgicas. En experimentos preliminares en ratas anestesiadas, se realizaron registros neuronales extracelulares en el HPL mediante micropipetas dobles y se administró fluoxetina yuxtacelularmente. Las neuronas registradas fueron marcadas con neurobiotina e identificadas mediante doble inmunofluorescencia para neurobiotina y MCH. Los resultados preliminares muestran que la fluoxetina (1,25  $\mu$ g/ $\mu$ l) disminuyó la frecuencia de descarga de las neuronas del HPL en el 89% de las neuronas inyectadas (n=9) de 5,4 ± 5,7 a 2,5 ± 3,2 Hz con una latencia de 12,3 ± 16,3 s y una duración del efecto de 86 ± 60 s (Figura 38 A). De cuatro neuronas marcadas con neurobiotina, una resultó ser MCHérgica (Figura 38 B, C y D) y las

otras tres no-MCHérgicas. Todas ellas fueron inhibidas por fluoxetina. El vehículo no provocó efecto significativo. Estos datos preliminares evidencian que la fluoxetina disminuye la actividad tanto de neuronas MCHérgicas como no MCHérgicas del HPL (Pascovich, 2014).

Tenemos previsto realizar también inmunofluorescencia para hipocretinas para determinar el fenotipo neuronal de las neuronas no-MCHérgicas inhibidas por fluoxetina, ya que las neuronas hipocretinérgicas se encuentran entremezcladas con las MCHérgicas en el HPL (Hahn, 2010).

Por último, también tenemos pensado complementar este trabajo con el estudio de la respuesta de las neuronas MCHérgicas frente a la administración sistémica de fluoxetina.



**Figura 38. Neurona MCHérgica del HPL inhibida por fluoxetina.** (A) La aplicación de fluoxetina yuxtacellular (dosis) disminuye la frecuencia de descarga de la neurona de  $1,0 \pm 0,3$  a  $0,1 \pm 0,3$  Hz, con una latencia aproximada de 42 s y una duración de 195 s. El registro pone en evidencia la presencia de una segunda neurona, con descargas de menor amplitud, que no se inhibe frente a la administración de fluoxetina. Abajo se muestra el efecto de la fluoxetina en histograma de frecuencias de la neurona con descargas de mayor amplitud. En (B) se muestra la inmunofluorescencia para MCH, en (C) se muestra el revelado de la neurobiotina y en (D) se muestra la superposición de ambas imágenes donde se evidencia la colocalización.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ABELES, M. 1982. Quantification, smoothing, and confidence limits for single-units' histograms. J Neurosci Methods, 5, 317-25.
- ADELL, A., CASANOVAS, J. M. & ARTIGAS, F. 1997. Comparative study in the rat of the actions of different types of stress on the release of 5-HT in raphe nuclei and forebrain areas. *Neuropharmacology*, 36, 735-41.
- ADELL, A., CELADA, P., ABELLAN, M. T. & ARTIGAS, F. 2002. Origin and functional role of the extracellular serotonin in the midbrain raphe nuclei. *Brain Res Brain Res Rev*, 39, 154-80.
- ADELL, A. & MYERS, R. D. 1995. Selective destruction of midbrain raphe nuclei by 5,7-DHT: is brain 5-HT involved in alcohol drinking in Sprague-Dawley rats? *Brain Res*, 693, 70-9.
- ADRIEN, J. 2002. Neurobiological bases for the relation between sleep and depression. *Sleep Med Rev*, 6, 341-51.
- AGHAJANIAN, G. K. 1972. Chemical-feedback regulation of serotonin-containing neurons in brain. Ann N Y Acad Sci, 193, 86-94.
- AGHAJANIAN, G. K. & LAKOSKI, J. M. 1984. Hyperpolarization of serotonergic neurons by serotonin and LSD: studies in brain slices showing increased K+ conductance. *Brain Res*, 305, 181-5.
- AGHAJANIAN, G. K. & VANDERMAELEN, C. P. 1982a. Intracellular identification of central noradrenergic and serotonergic neurons by a new double labeling procedure. *J Neurosci*, 2, 1786-92.
- AGHAJANIAN, G. K. & VANDERMAELEN, C. P. 1982b. Intracellular recordings from serotonergic dorsal raphe neurons: pacemaker potentials and the effect of LSD. *Brain Res*, 238, 463-9.
- AGHAJANIAN, G. K., WANG, R. Y. & BARABAN, J. 1978. Serotonergic and non-serotonergic neurons of the dorsal raphe: reciprocal changes in firing induced by peripheral nerve stimulation. *Brain Res*, 153, 169-75.
- AHNAOU, A., DRINKENBURG, W. H., BOUWKNECHT, J. A., ALCAZAR, J., STECKLER, T. & DAUTZENBERG, F.
   M. 2008. Blocking melanin-concentrating hormone MCH1 receptor affects rat sleep-wake architecture. *Eur J Pharmacol*, 579, 177-88.
- ALBINSSON, A., ANDERSSON, G., ANDERSSON, K., VEGA-MATUSZCZYK, J. & LARSSON, K. 1996. The effects of lesions in the mesencephalic raphe systems on male rat sexual behavior and locomotor activity. *Behav Brain Res*, 80, 57-63.
- ALLERS, K. A. & SHARP, T. 2003. Neurochemical and anatomical identification of fast- and slow-firing neurones in the rat dorsal raphe nucleus using juxtacellular labelling methods in vivo. *Neuroscience*, 122, 193-204.
- ANDRADE, T. G. & GRAEFF, F. G. 2001. Effect of electrolytic and neurotoxic lesions of the median raphe nucleus on anxiety and stress. *Pharmacol Biochem Behav*, 70, 1-14.
- ARBORELIUS, L., HOOK, B. B., HACKSELL, U. & SVENSSON, T. H. 1994. The 5-HT1A receptor antagonist (S)-UH-301 blocks the qR)-8-OH-DPAT-induced inhibition of serotonergic dorsal raphe cell firing in the rat. J Neural Transm Gen Sect, 96, 179-86.
- AVANZI, V., CASTILHO, V. M., DE ANDRADE, T. G. & BRANDAO, M. L. 1998. Regulation of contextual conditioning by the median raphe nucleus. *Brain Res*, 790, 178-84.
- AZMITIA, E. C. 1999. Serotonin neurons, neuroplasticity, and homeostasis of neural tissue. *Neuropsychopharmacology*, 21, 33S-45S.
- AZMITIA, E. C. 2007. Serotonin and brain: evolution, neuroplasticity, and homeostasis. *Int Rev Neurobiol*, 77, 31-56.
- BABAR, E., MELIK, E. & OZGUNEN, T. 2002a. Excitotoxic median raphe lesions aggravate working memory storage performance deficits caused by scopolamine infusion into the dentate gyrus of the hippocampus in the inhibitory avoidance task in rats. *Braz J Med Biol Res*, 35, 479-84.
- BABAR, E., MELIK, E., OZGUNEN, T., KAYA, M. & POLAT, S. 2002b. Effects of excitotoxic median raphe lesions on scopolamine-induced working memory deficits in inhibitory avoidance. *Int J Neurosci*, 112, 525-35.
- BAROFSKY, A. L. & HARNEY, J. W. 1978. Impairments in lactation in the rat following destruction of the median raphe nucleus. *Neuroendocrinology*, 26, 333-51.

- BAROFSKY, A. L., TAYLOR, J., TIZABI, Y., KUMAR, R. & JONES-QUARTEY, K. 1983. Specific neurotoxin lesions of median raphe serotonergic neurons disrupt maternal behavior in the lactating rat. *Endocrinology*, 113, 1884-93.
- BECK, S. G., PAN, Y. Z., AKANWA, A. C. & KIRBY, L. G. 2004. Median and dorsal raphe neurons are not electrophysiologically identical. *J Neurophysiol*, 91, 994-1005.
- BELIN, M. F., NANOPOULOS, D., DIDIER, M., AGUERA, M., STEINBUSCH, H., VERHOFSTAD, A., MAITRE, M. & PUJOL, J. F. 1983. Immunohistochemical evidence for the presence of gamma-aminobutyric acid and serotonin in one nerve cell. A study on the raphe nuclei of the rat using antibodies to glutamate decarboxylase and serotonin. *Brain Res*, 275, 329-39.
- BENEDETTO, L., RODRIGUEZ-SERVETTI, Z., LAGOS, P., D'ALMEIDA, V., MONTI, J. M. & TORTEROLO, P. 2013. Microinjection of melanin concentrating hormone into the lateral preoptic area promotes non-REM sleep in the rat. *Peptides*, 39, 11-5.
- BITTENCOURT, J. C., PRESSE, F., ARIAS, C., PETO, C., VAUGHAN, J., NAHON, J. L., VALE, W. & SAWCHENKO,
   P. E. 1992. The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. *J Comp Neurol*, 319, 218-45.
- BLIER, P., SERRANO, A. & SCATTON, B. 1990. Differential responsiveness of the rat dorsal and median raphe 5-HT systems to 5-HT1 receptor agonists and p-chloroamphetamine. *Synapse*, 5, 120-33.
- BOROWSKY, B., DURKIN, M. M., OGOZALEK, K., MARZABADI, M. R., DELEON, J., LAGU, B., HEURICH, R., LICHTBLAU, H., SHAPOSHNIK, Z., DANIEWSKA, I., BLACKBURN, T. P., BRANCHEK, T. A., GERALD, C., VAYSSE, P. J. & FORRAY, C. 2002. Antidepressant, anxiolytic and anorectic effects of a melaninconcentrating hormone-1 receptor antagonist. *Nat Med*, 8, 825-30.
- BROWN, R. E., SERGEEVA, O. A., ERIKSSON, K. S. & HAAS, H. L. 2002. Convergent excitation of dorsal raphe serotonin neurons by multiple arousal systems (orexin/hypocretin, histamine and noradrenaline). *J Neurosci*, 22, 8850-9.
- CALEGARE BF, C. A., FERNANDES L, DIAS AL, TORTEROLO P AND D'ALMEIDA V. 2015. Effect of subchronical treatment with Fluoxetine on melanin-concentrating hormone (MCH) concentration in the CSF and preproMCH gene expression. *Enviado a publicar*.
- CALIZO, L. H., AKANWA, A., MA, X., PAN, Y. Z., LEMOS, J. C., CRAIGE, C., HEEMSTRA, L. A. & BECK, S. G. 2011. Raphe serotonin neurons are not homogenous: electrophysiological, morphological and neurochemical evidence. *Neuropharmacology*, 61, 524-43.
- CALVIN, W. H. 1975. Generation of spike trains in CNS neurons. Brain Res, 84, 1-22.
- COSCINA, D. V. & STANCER, H. C. 1977. Selective blockade of hypothalamic hyperphagia and obesity in rats by serotonin-depleting midbrain lesions. *Science*, 195, 416-9.
- CRUNELLI, V., FORDA, S., BROOKS, P. A., WILSON, K. C., WISE, J. C. & KELLY, J. S. 1983. Passive membrane properties of neurones in the dorsal raphe and periaqueductal grey recorded in vitro. *Neurosci Lett*, 40, 263-8.
- CRYAN, J. F., MARKOU, A. & LUCKI, I. 2002. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci*, 23, 238-45.
- CHASE, M. H. 2013. A unified survival theory of the functioning of the hypocretinergic system. J Appl Physiol (1985), 115, 954-71.
- CHEE, M. J., ARRIGONI, E. & MARATOS-FLIER, E. 2015. Melanin-concentrating hormone neurons release glutamate for feedforward inhibition of the lateral septum. *J Neurosci*, 35, 3644-51.
- CHUNG, S., PARKS, G. S., LEE, C. & CIVELLI, O. 2011. Recent updates on the melanin-concentrating hormone (MCH) and its receptor system: lessons from MCH1R antagonists. *J Mol Neurosci*, 43, 115-21.
- DAHLSTROEM, A. & FUXE, K. 1964. Evidence for the Existence of Monoamine-Containing Neurons in the Central Nervous System. I. Demonstration of Monoamines in the Cell Bodies of Brain Stem Neurons. *Acta Physiol Scand Suppl*, SUPPL 232:1-55.
- DEL CID-PELLITERO, E. & JONES, B. E. 2012. Immunohistochemical evidence for synaptic release of GABA from melanin-concentrating hormone containing varicosities in the locus coeruleus. *Neuroscience*, 223, 269-76.

- DEVERA, A., PASCOVICH, C., LAGOS, P., FALCONI, A., SAMPOGNA, S., CHASE, M. H. & TORTEROLO, P. 2015. Melanin-concentrating hormone (MCH) modulates the activity of dorsal raphe neurons. *Brain Res*, 1598, 114-28.
- DIAS A, C. B., FERNANDES L, COSTA A, LAGOS P, TORTEROLO P, D'ALMEIDA V 2015. MCH levels in the CSF, brain preproMCH and MCHR1 gene expression during sleep deprivation, sleep rebound and sleep restriction. *Enviado a publicar*.
- FILE, S. E., HYDE, J. R. & MACLEOD, N. K. 1979. 5,7-dihydroxytryptamine lesions of dorsal and median raphe nuclei and performance in the social interaction test of anxiety and in a home-cage aggression test. *J Affect Disord*, 1, 115-22.
- FLETCHER, P. J. 1995. Effects of combined or separate 5,7-dihydroxytryptamine lesions of the dorsal and median raphe nuclei on responding maintained by a DRL 20s schedule of food reinforcement. *Brain Res,* 675, 45-54.
- FORNAL, C. A., LITTO, W. J., MORILAK, D. A. & JACOBS, B. L. 1989. Single-unit responses of serotonergic neurons to glucose and insulin administration in behaving cats. *Am J Physiol*, 257, R1345-53.
- GAO, X. B. & VAN DEN POL, A. N. 2001. Melanin concentrating hormone depresses synaptic activity of glutamate and GABA neurons from rat lateral hypothalamus. *J Physiol*, 533, 237-52.
- GARCIA-FUSTER, M. J., PARKS, G. S., CLINTON, S. M., WATSON, S. J., AKIL, H. & CIVELLI, O. 2012. The melanin-concentrating hormone (MCH) system in an animal model of depression-like behavior. *Eur Neuropsychopharmacol*, 22, 607-13.
- GRACE, A. A. & BUNNEY, B. S. 1983. Intracellular and extracellular electrophysiology of nigral dopaminergic neurons--1. Identification and characterization. *Neuroscience*, 10, 301-15.
- GREEN, J. D. & ARDUINI, A. A. 1954. Hippocampal electrical activity in arousal. J Neurophysiol, 17, 533-57.
- HAHN, J. D. 2010. Comparison of melanin-concentrating hormone and hypocretin/orexin peptide expression patterns in a current parceling scheme of the lateral hypothalamic zone. *Neurosci Lett*, 468, 12-7.
- HAJOS, M., ALLERS, K. A., JENNINGS, K., SHARP, T., CHARETTE, G., SIK, A. & KOCSIS, B. 2007. Neurochemical identification of stereotypic burst-firing neurons in the rat dorsal raphe nucleus using juxtacellular labelling methods. *Eur J Neurosci*, 25, 119-26.
- HAJOS, M., GARTSIDE, S. E., VILLA, A. E. & SHARP, T. 1995. Evidence for a repetitive (burst) firing pattern in a sub-population of 5-hydroxytryptamine neurons in the dorsal and median raphe nuclei of the rat. *Neuroscience*, 69, 189-97.
- HANRIOT, L., CAMARGO, N., COURAU, A. C., LEGER, L., LUPPI, P. H. & PEYRON, C. 2007. Characterization of the melanin-concentrating hormone neurons activated during paradoxical sleep hypersomnia in rats. J Comp Neurol, 505, 147-57.
- HASSANI, O. K., LEE, M. G. & JONES, B. E. 2009. Melanin-concentrating hormone neurons discharge in a reciprocal manner to orexin neurons across the sleep-wake cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 2418-22.
- HAWES, B. E., KIL, E., GREEN, B., O'NEILL, K., FRIED, S. & GRAZIANO, M. P. 2000. The melaninconcentrating hormone receptor couples to multiple G proteins to activate diverse intracellular signaling pathways. *Endocrinology*, 141, 4524-32.
- HERVIEU, G. J., CLUDERAY, J. E., HARRISON, D., MEAKIN, J., MAYCOX, P., NASIR, S. & LESLIE, R. A. 2000. The distribution of the mRNA and protein products of the melanin-concentrating hormone (MCH) receptor gene, slc-1, in the central nervous system of the rat. *Eur J Neurosci*, 12, 1194-216.
- JACOBS, B. L. & AZMITIA, E. C. 1992. Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev*, 72, 165-229.
- JACOBS, B. L. & COHEN, A. 1976. Differential behavioral effects of lesions of the median or dorsal raphe nuclei in rats: open field and pain-elicited aggression. *J Comp Physiol Psychol*, 90, 102-8.
- JACOBS, B. L. & FORNAL, C. A. 1991. Activity of brain serotonergic neurons in the behaving animal. *Pharmacol Rev*, 43, 563-78.
- JEGO, S., GLASGOW, S. D., HERRERA, C. G., EKSTRAND, M., REED, S. J., BOYCE, R., FRIEDMAN, J., BURDAKOV, D. & ADAMANTIDIS, A. R. 2013. Optogenetic identification of a rapid eye movement sleep modulatory circuit in the hypothalamus. *Nat Neurosci*, 16, 1637-43.

- KATAI, Z., ADORI, C., KITKA, T., VAS, S., KALMAR, L., KOSTYALIK, D., TOTHFALUSI, L., PALKOVITS, M. & BAGDY, G. 2013. Acute escitalopram treatment inhibits REM sleep rebound and activation of MCH-expressing neurons in the lateral hypothalamus after long term selective REM sleep deprivation. *Psychopharmacology (Berl)*, 228, 439-49.
- KAWAUCHI, H., KAWAZOE, I., TSUBOKAWA, M., KISHIDA, M. & BAKER, B. I. 1983. Characterization of melanin-concentrating hormone in chum salmon pituitaries. *Nature*, 305, 321-3.
- KEMP, I. R. & KAADA, B. R. 1975. The relation of hippocampal theta activity to arousal, attentive behaviour and somato-motor movements in unrestrained cats. *Brain Res*, 95, 323-42.
- KILDUFF, T. S. & DE LECEA, L. 2001. Mapping of the mRNAs for the hypocretin/orexin and melaninconcentrating hormone receptors: networks of overlapping peptide systems. *J Comp Neurol*, 435, 1-5.
- KIMURA, M., CURZI, M. L. & ROMANOWSI, C. P. 2014. REM sleep alteration and depression. Arch Ital Biol, 152, 111-7.
- KIRBY, L. G., PERNAR, L., VALENTINO, R. J. & BECK, S. G. 2003. Distinguishing characteristics of serotonin and non-serotonin-containing cells in the dorsal raphe nucleus: electrophysiological and immunohistochemical studies. *Neuroscience*, 116, 669-83.
- KJERULF, T. D., O'NEAL, J. T., CALVIN, W. H., LOESER, J. D. & WESTRUM, L. E. 1973. Deafferentation effects in lateral cuneate nucleus of the cat: correlation of structural alterations with firing pattern changes. *Exp Neurol*, 39, 86-102.
- KOCSIS, B., VARGA, V., DAHAN, L. & SIK, A. 2006. Serotonergic neuron diversity: identification of raphe neurons with discharges time-locked to the hippocampal theta rhythm. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 1059-64.
- KOCSIS, B. & VERTES, R. P. 1992. Dorsal raphe neurons: synchronous discharge with the theta rhythm of the hippocampus in the freely behaving rat. *J Neurophysiol*, 68, 1463-7.
- KOCSIS, B. & VERTES, R. P. 1996. Midbrain raphe cell firing and hippocampal theta rhythm in urethaneanaesthetized rats. *Neuroreport*, **7**, 2867-72.
- KONADHODE, R. R., PELLURU, D., BLANCO-CENTURION, C., ZAYACHKIVSKY, A., LIU, M., UHDE, T., GLEN, W.
   B., JR., VAN DEN POL, A. N., MULHOLLAND, P. J. & SHIROMANI, P. J. 2013. Optogenetic stimulation of MCH neurons increases sleep. J Neurosci, 33, 10257-63.
- KONDO, Y. & YAMANOUCHI, K. 1997. Potentiation of ejaculatory activity by median raphe nucleus lesions in male rats: effect of p-chlorophenylalanine. *Endocr J*, 44, 873-9.
- KOPROWSKA, M. & ROMANIUK, A. 1997. Behavioral and biochemical alterations in median and dorsal raphe nuclei lesioned cats. *Pharmacol Biochem Behav*, 56, 529-40.
- KOSTOWSKI, W., CXLONKOWSKI, A., MARKOWDKA, L. & MARKIEWICZ, L. 1975. Intraspecific aggressiveness after lesions of midbrain raphe nuclei in rats. *Pharmacology*, 13, 81-5.
- LAGOS, P., MONTI, J. M., JANTOS, H. & TORTEROLO, P. 2012. Microinjection of the melanin-concentrating hormone into the lateral basal forebrain increases REM sleep and reduces wakefulness in the rat. *Life Sci*, 90, 895-9.
- LAGOS, P., TORTEROLO, P., JANTOS, H., CHASE, M. H. & MONTI, J. M. 2009. Effects on sleep of melaninconcentrating hormone (MCH) microinjections into the dorsal raphe nucleus. *Brain Res*, 1265, 103-10.
- LAGOS, P., TORTEROLO, P., JANTOS, H. & MONTI, J. M. 2011a. Immunoneutralization of melaninconcentrating hormone (MCH) in the dorsal raphe nucleus: effects on sleep and wakefulness. *Brain Res*, 1369, 112-8.
- LAGOS, P., URBANAVICIUS, J., SCORZA, M. C., MIRABALLES, R. & TORTEROLO, P. 2011b. Depressive-like profile induced by MCH microinjections into the dorsal raphe nucleus evaluated in the forced swim test. *Behav Brain Res*, 218, 259-66.
- LECHIN, F., VAN DER DIJS, B. & HERNANDEZ-ADRIAN, G. 2006. Dorsal raphe vs. median raphe serotonergic antagonism. Anatomical, physiological, behavioral, neuroendocrinological, neuropharmacological and clinical evidences: relevance for neuropharmacological therapy. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 30, 565-85.
- LEE, M. G., HASSANI, O. K., ALONSO, A. & JONES, B. E. 2005a. Cholinergic basal forebrain neurons burst with theta during waking and paradoxical sleep. *J Neurosci*, **25**, 4365-9.

- LEE, M. G., HASSANI, O. K. & JONES, B. E. 2005b. Discharge of identified orexin/hypocretin neurons across the sleep-waking cycle. *J Neurosci*, 25, 6716-20.
- LI, Y. Q., LI, H., KANEKO, T. & MIZUNO, N. 2001. Morphological features and electrophysiological properties of serotonergic and non-serotonergic projection neurons in the dorsal raphe nucleus. An intracellular recording and labeling study in rat brain slices. *Brain Res*, 900, 110-8.
- LIN, J. S., SAKAI, K., VANNI-MERCIER, G. & JOUVET, M. 1989. A critical role of the posterior hypothalamus in the mechanisms of wakefulness determined by microinjection of muscimol in freely moving cats. *Brain Res*, 479, 225-40.
- LIU, R. J., VAN DEN POL, A. N. & AGHAJANIAN, G. K. 2002. Hypocretins (orexins) regulate serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus by excitatory direct and inhibitory indirect actions. *J Neurosci*, 22, 9453-64.
- LOPEZ HILL, X., PASCOVICH, C., URBANAVICIUS, J., TORTEROLO, P. & SCORZA, M. C. 2013. The median raphe nucleus participates in the depressive-like behavior induced by MCH: differences with the dorsal raphe nucleus. *Peptides*, 50, 96-9.
- MATSUMOTO, T. & YAMANOUCHI, K. 1997. Effects of p-chlorophenylalanine on male sexual behavior in female rats with mesencephalic raphe nuclei lesions. *Endocr J*, 44, 383-8.
- MCGINTY, D. J. & HARPER, R. M. 1976. Dorsal raphe neurons: depression of firing during sleep in cats. *Brain Res*, 101, 569-75.
- MEYER, D. C. 1978. Hypothalamic and raphe serotonergic systems in ovulation control. *Endocrinology*, 103, 1067-74.
- MONAGHAN, E. P., ARJOMAND, J. & BREEDLOVE, S. M. 1993. Brain lesions affect penile reflexes. *Horm Behav*, 27, 122-31.
- MONTI, J. M. & JANTOS, H. 2003. Differential effects of the 5-HT1A receptor agonist flesinoxan given locally or systemically on REM sleep in the rat. *Eur J Pharmacol*, 478, 121-30.
- MONTI, J. M., JANTOS, H. & MONTI, D. 2002. Increased REM sleep after intra-dorsal raphe nucleus injection of flesinoxan or 8-OHDPAT: prevention with WAY 100635. *Eur Neuropsychopharmacol*, 12, 47-55.
- MONTI, J. M., JANTOS, H., MONTI, D. & ALVARINO, F. 2000. Dorsal raphe nucleus administration of 5-HT1A receptor agonist and antagonists: effect on rapid eye movement sleep in the rat. *Sleep Res Online*, **3**, 29-34.
- MONTI, J. M., TORTEROLO, P. & LAGOS, P. 2013. Melanin-concentrating hormone control of sleep-wake behavior. *Sleep Med Rev*, 17, 293-8.
- MOSIER, H. D., JANSONS, R. A., THOMPSON, R., CRINELLA, F. M. & YU, J. 1990. Production of generalized learning deficit and permanent growth stunting by bilateral brain stem lesions. *Pediatr Res*, 27, 181-5.
- MOSKO, S. S. & JACOBS, B. L. 1976. Recording of dorsal raphe unit activity in vitro. *Neurosci Lett*, 2, 195-200.
- MOURI, T., TAKAHASHI, K., KAWAUCHI, H., SONE, M., TOTSUNE, K., MURAKAMI, O., ITOI, K., OHNEDA, M., SASANO, H. & SASANO, N. 1993. Melanin-concentrating hormone in the human brain. *Peptides*, 14, 643-6.
- MUNDEY, M. K., FLETCHER, A. & MARSDEN, C. A. 1994. Effect of the putative 5-HT1A antagonists WAY100135 and SDZ 216-525 on 5-HT neuronal firing in the guinea-pig dorsal raphe nucleus. *Neuropharmacology*, 33, 61-6.
- NETTO, S. M., SILVEIRA, R., COIMBRA, N. C., JOCA, S. R. & GUIMARAES, F. S. 2002. Anxiogenic effect of median raphe nucleus lesion in stressed rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 26, 1135-41.
- OSSIPOV, M. H., DUSSOR, G. O. & PORRECA, F. 2010. Central modulation of pain. J Clin Invest, 120, 3779-87.
- PAGANI, J. H., WILLIAMS AVRAM, S. K., CUI, Z., SONG, J., MEZEY, E., SENERTH, J. M., BAUMANN, M. H. & YOUNG, W. S. 2015. Raphe serotonin neuron-specific oxytocin receptor knockout reduces aggression without affecting anxiety-like behavior in male mice only. *Genes Brain Behav*, 14, 167-76.
- PARDRIDGE, W. M. 2011. Drug transport in brain via the cerebrospinal fluid. Fluids Barriers CNS, 8, 7.

- PARK, M. R. 1987. Intracellular horseradish peroxidase labeling of rapidly firing dorsal raphe projection neurons. *Brain Res*, 402, 117-30.
- PASCOVICH, C., RIVAS, M., SCHWARKOPF, N., DEUTCH, H., VOLLONO, P., LAGOS, P., FALCONI, A., TORTEROLO, P. 2014. Efecto de la fluoxetina sobre la actividad de neuronas MCHérgicas y no MCHérgicas del hipotálamo posterolateral. Jornadas de la Sociedad de Neurociencias del Uruguay. Montevideo, Uruguay.
- PECCI SAAVEDRA, J., BRUSCO, A., PERESSINI, S. & OLIVA, D. 1986. A new case for a presynaptic role of dendrites: an immunocytochemical study of the n. raphe dorsalis. *Neurochem Res*, 11, 997-1009.
- PELLURU, D., KONADHODE, R. & SHIROMANI, P. J. 2013. MCH neurons are the primary sleep-promoting group. *Sleep*, 36, 1779-81.
- PEYRON, C., SAPIN, E., LEGER, L., LUPPI, P. H. & FORT, P. 2009. Role of the melanin-concentrating hormone neuropeptide in sleep regulation. *Peptides*, 30, 2052-9.
- PEYRON, C., VALENTIN, F., BAYARD, S., HANRIOT, L., BEDETTI, C., ROUSSET, B., LUPPI, P. H. & DAUVILLIERS, Y. 2011. Melanin concentrating hormone in central hypersomnia. *Sleep Med*, **12**, 768-72.
- PORTAS, C. M., BJORVATN, B. & URSIN, R. 2000. Serotonin and the sleep/wake cycle: special emphasis on microdialysis studies. *Prog Neurobiol*, 60, 13-35.
- PRZEWLOCKA, B., KUKULKA, L. & TATARCZYNSKA, E. 1977. The effect of lesions of dorsal or median raphe nucleus on rat behavior. *Pol J Pharmacol Pharm*, 29, 573-9.
- PUIG, M. V., ARTIGAS, F. & CELADA, P. 2005. Modulation of the activity of pyramidal neurons in rat prefrontal cortex by raphe stimulation in vivo: involvement of serotonin and GABA. *Cereb Cortex*, 15, 1-14.
- RASMUSSEN, K., HEYM, J. & JACOBS, B. L. 1984. Activity of serotonin-containing neurons in nucleus centralis superior of freely moving cats. *Exp Neurol*, 83, 302-17.
- RODRIGUEZ, E. M., BLAZQUEZ, J. L., PASTOR, F. E., PELAEZ, B., PENA, P., PERUZZO, B. & AMAT, P. 2005. Hypothalamic tanycytes: a key component of brain-endocrine interaction. *Int Rev Cytol*, 247, 89-164.
- ROMANDINI, S., PICH, E. M., ESPOSITO, E., KRUSZEWSKA, A. & SAMANIN, R. 1986. The effect of different lesions of the median raphe on morphine analgesia. *Brain Res*, 377, 351-4.
- RUETER, L. E. & JACOBS, B. L. 1996. A microdialysis examination of serotonin release in the rat forebrain induced by behavioral/environmental manipulations. *Brain Res*, 739, 57-69.
- SAITO, Y., CHENG, M., LESLIE, F. M. & CIVELLI, O. 2001. Expression of the melanin-concentrating hormone (MCH) receptor mRNA in the rat brain. *J Comp Neurol*, 435, 26-40.
- SAITO, Y., NOTHACKER, H. P., WANG, Z., LIN, S. H., LESLIE, F. & CIVELLI, O. 1999. Molecular characterization of the melanin-concentrating-hormone receptor. *Nature*, 400, 265-9.
- SALLES, M. S. & SALLES, K. S. 1980. Behavioral effect of selective and non-selective lesions of median raphe nucleus in the rat. *Jpn J Physiol*, 30, 105-14.
- SAPER, C. B. 2000. Regulación de la sensibilidad, el movimiento y la consciencia por el tronco encefálico. *In:* KANDEL E.R., S. J. H., JESSELL T.M. (ed.) *Principios de Neurociencias*. 4th ed.
- SAWYER, S. F., TEPPER, J. M., YOUNG, S. J. & GROVES, P. M. 1985. Antidromic activation of dorsal raphe neurons from neostriatum: physiological characterization and effects of terminal autoreceptor activation. *Brain Res*, 332, 15-28.
- SCHOFIELD, S. P. & EVERITT, B. J. 1981. The organization of indoleamine neurons in the brain of the rhesus monkey (Macaca mulatta). *J Comp Neurol*, 197, 369-83.
- SEIDENBECHER, T., LAXMI, T. R., STORK, O. & PAPE, H. C. 2003. Amygdalar and hippocampal theta rhythm synchronization during fear memory retrieval. *Science*, 301, 846-50.
- SHAHID SALLES, M. S., HEYM, J. & GLADFELTER, W. E. 1979. Effects of damage to median raphe nucleus on ingestive behavior and wheel running activity. *Brain Res Bull*, 4, 643-9.
- SHIMAZAKI, T., YOSHIMIZU, T. & CHAKI, S. 2006. Melanin-concentrating hormone MCH1 receptor antagonists: a potential new approach to the treatment of depression and anxiety disorders. CNS Drugs, 20, 801-11.
- SHIMIZU, H. & YAMANOUCHI, K. 2011. Acceleration of irregular estrous cycle in forced running by midbrain raphe lesions in female rats. *Neurosci Lett*, 495, 192-5.

- SIAPAS, A. G., LUBENOV, E. V. & WILSON, M. A. 2005. Prefrontal phase locking to hippocampal theta oscillations. *Neuron*, 46, 141-51.
- SIEGEL, J. M. 2009. The neurobiology of sleep. Semin Neurol, 29, 277-96.
- SILVA, R. C., CRUZ, A. P., AVANZI, V., LANDEIRA-FERNANDEZ, J. & BRANDAO, M. L. 2002. Distinct contributions of median raphe nucleus to contextual fear conditioning and fear-potentiated startle. *Neural Plast*, 9, 233-47.
- SPROUSE, J. S. & AGHAJANIAN, G. K. 1987. Electrophysiological responses of serotoninergic dorsal raphe neurons to 5-HT1A and 5-HT1B agonists. *Synapse*, 1, 3-9.
- STAMP, J. A. & SEMBA, K. 1995. Extent of colocalization of serotonin and GABA in the neurons of the rat raphe nuclei. *Brain Res*, 677, 39-49.
- TAKAHASHI, K., WANG, Q. P., GUAN, J. L., KAYAMA, Y., SHIODA, S. & KOYAMA, Y. 2005. State-dependent effects of orexins on the serotonergic dorsal raphe neurons in the rat. *Regul Pept*, 126, 43-7.
- TAN, C. P., SANO, H., IWAASA, H., PAN, J., SAILER, A. W., HRENIUK, D. L., FEIGHNER, S. D., PALYHA, O. C., PONG, S. S., FIGUEROA, D. J., AUSTIN, C. P., JIANG, M. M., YU, H., ITO, J., ITO, M., GUAN, X. M., MACNEIL, D. J., KANATANI, A., VAN DER PLOEG, L. H. & HOWARD, A. D. 2002. Melaninconcentrating hormone receptor subtypes 1 and 2: species-specific gene expression. *Genomics*, 79, 785-92.
- TAO, R. & AUERBACH, S. B. 2003. Influence of inhibitory and excitatory inputs on serotonin efflux differs in the dorsal and median raphe nuclei. *Brain Res*, 961, 109-20.
- TAO, R., MA, Z., MCKENNA, J. T., THAKKAR, M. M., WINSTON, S., STRECKER, R. E. & MCCARLEY, R. W. 2006. Differential effect of orexins (hypocretins) on serotonin release in the dorsal and median raphe nuclei of freely behaving rats. *Neuroscience*, 141, 1101-5.
- THOMPSON, R., BJELAJAC, V. M., FUKUI, S., HUESTIS, P. W., CRINELLA, F. M. & YU, J. 1989. Failure to transfer a digging response to a detour problem in young rats with lesions to the "general learning system". *Physiol Behav*, 45, 1235-41.
- TORTEROLO P, C. S., FALCONI V, LAGOS P. 2010. Hormona concentradora de melanina (MCH): neuropéptido hipotalámico que facilita la generación de sueño. *Rev Mex de Neuroc.*, **11**, 46-51.
- TORTEROLO P, C. H. 2014a. The hypocretins (orexins) mediate the "phasic" components of REM sleep: A new hypothesis. *Sleep Science*, **1**, 19-29.
- TORTEROLO, P., LAGOS, P. & MONTI, J. M. 2011. Melanin-concentrating hormone: a new sleep factor? Front Neurol, 2, 14.
- TORTEROLO, P., LAGOS, P., SAMPOGNA, S. & CHASE, M. H. 2008. Melanin-concentrating hormone (MCH) immunoreactivity in non-neuronal cells within the raphe nuclei and subventricular region of the brainstem of the cat. *Brain Res*, 1210, 163-78.
- TORTEROLO, P., SAMPOGNA, S. & CHASE, M. H. 2009. MCHergic projections to the nucleus pontis oralis participate in the control of active (REM) sleep. *Brain Res*, 1268, 76-87.
- TORTEROLO, P., SAMPOGNA, S., MORALES, F. R. & CHASE, M. H. 2006. MCH-containing neurons in the hypothalamus of the cat: searching for a role in the control of sleep and wakefulness. *Brain Res*, 1119, 101-14.
- TORTEROLO P, S. C., URBANAVICIUS J, DEVERA A, BENEDETTO L, PASCOVICH C, LAGOS P, CHASE MH, MONTI J. 2014b. Avances en el estudio de la neurobiología de la depresión: rol de la hormona concentradora de melanina. *Rev Med Urug*, 30, 128-136.
- TRIVEDI, P., YU, H., MACNEIL, D. J., VAN DER PLOEG, L. H. & GUAN, X. M. 1998. Distribution of orexin receptor mRNA in the rat brain. *FEBS Lett*, 438, 71-5.
- TRULSON, M. E., CRISP, T. & TRULSON, V. M. 1984. Activity of serotonin-containing nucleus centralis superior (Raphe medianus) neurons in freely moving cats. *Exp Brain Res*, 54, 33-44.
- TRULSON, M. E. & FREDERICKSON, C. J. 1987. A comparison of the electrophysiological and pharmacological properties of serotonin-containing neurons in the nucleus raphe dorsalis, raphe medianus and raphe pallidus recorded from mouse brain slices in vitro: role of autoreceptors. *Brain Res Bull*, 18, 179-90.
- TRULSON, M. E. & JACOBS, B. L. 1976. Dose-response relationships between systemically administered Ltryptophan or L-5-hydroxytryptophan and raphe unit activity in the rat. *Neuropharmacology*, 15, 339-44.

- TSUNEMATSU, T., UENO, T., TABUCHI, S., INUTSUKA, A., TANAKA, K. F., HASUWA, H., KILDUFF, T. S., TERAO, A. & YAMANAKA, A. 2014. Optogenetic manipulation of activity and temporally controlled cell-specific ablation reveal a role for MCH neurons in sleep/wake regulation. J Neurosci, 34, 6896-909.
- UNGERFELD, R., ALZUGARAY, S., QUINTELA, H. G., LAGOS, P., TORTEROLO, P. & BIELLI, A. 2011. Melanin concentrating hormone (MCH) in the cerebrospinal fluid of ewes during spontaneous oestrous cycles and ram effect induced follicular phases. *Peptides*, 32, 2511-3.
- URBANAVICIUS, J., LAGOS, P., TORTEROLO, P. & SCORZA, C. 2014. Prodepressive effect induced by microinjections of MCH into the dorsal raphe: time course, dose dependence, effects on anxiety-related behaviors, and reversion by nortriptyline. *Behav Pharmacol*, 25, 316-24.
- URBANAVICIUS J, LAGOS, P., TORTEROLO P AND SCORZA C. 2015. MCHergic projections to the dorsal raphe nucleus: an immunohistochemical and in vivo microdialysis study. *In press.*
- VAN DE KAR, L. D., LORENS, S. A., MCWILLIAMS, C. R., KUNIMOTO, K., URBAN, J. H. & BETHEA, C. L. 1984. Role of midbrain raphe in stress-induced renin and prolactin secretion. *Brain Res*, 311, 333-41.
- VERRET, L., FORT, P., GERVASONI, D., LEGER, L. & LUPPI, P. H. 2006. Localization of the neurons active during paradoxical (REM) sleep and projecting to the locus coeruleus noradrenergic neurons in the rat. J Comp Neurol, 495, 573-86.
- VERRET, L., GOUTAGNY, R., FORT, P., CAGNON, L., SALVERT, D., LEGER, L., BOISSARD, R., SALIN, P., PEYRON, C. & LUPPI, P. H. 2003. A role of melanin-concentrating hormone producing neurons in the central regulation of paradoxical sleep. *BMC Neurosci*, 4, 19.
- VERTES, R. P. & CRANE, A. M. 1997. Distribution, quantification, and morphological characteristics of serotonin-immunoreactive cells of the supralemniscal nucleus (B9) and pontomesencephalic reticular formation in the rat. J Comp Neurol, 378, 411-24.
- VERTES, R. P., FORTIN, W. J. & CRANE, A. M. 1999. Projections of the median raphe nucleus in the rat. J Comp Neurol, 407, 555-82.
- VERTES, R. P. & KOCSIS, B. 1997. Brainstem-diencephalo-septohippocampal systems controlling the theta rhythm of the hippocampus. *Neuroscience*, 81, 893-926.
- VIANA DI PRISCO, G., ALBO, Z., VERTES, R. P. & KOCSIS, B. 2002. Discharge properties of neurons of the median raphe nucleus during hippocampal theta rhythm in the rat. *Exp Brain Res*, 145, 383-94.
- WANG, Q. P. & NAKAI, Y. 1994. The dorsal raphe: an important nucleus in pain modulation. Brain Res Bull, 34, 575-85.
- WIKLUND, L., LEGER, L. & PERSSON, M. 1981. Monoamine cell distribution in the cat brain stem. A fluorescence histochemical study with quantification of indolaminergic and locus coeruleus cell groups. J Comp Neurol, 203, 613-47.
- WILLIAMS, J. T., COLMERS, W. F. & PAN, Z. Z. 1988. Voltage- and ligand-activated inwardly rectifying currents in dorsal raphe neurons in vitro. *J Neurosci*, 8, 3499-506.
- WIRTSHAFTER, D. & ASIN, K. E. 1986. Discrimination learning and reversal following electrolytic lesions of the median raphe nucleus. *Physiol Behav*, 37, 213-9.
- WOGAR, M. A., BRADSHAW, C. M. & SZABADI, E. 1992. Impaired acquisition of temporal differentiation performance following lesions of the ascending 5-hydroxytryptaminergic pathways. *Psychopharmacology (Berl)*, 107, 373-8.
- YAMUY, J., FUNG, S. J., XI, M. & CHASE, M. H. 2004. Hypocretinergic control of spinal cord motoneurons. J Neurosci, 24, 5336-45.
- YOON, Y. S. & LEE, H. S. 2013. Projections from melanin-concentrating hormone (MCH) neurons to the dorsal raphe or the nuclear core of the locus coeruleus in the rat. *Brain Res*, 1490, 72-82.
- YURINO, H., TSUKAHARA, S., KORANYI, L. & YAMANOUCHI, K. 2001. Inhibitory effect of postpartum lesions or cuts in median raphe nucleus on maternal behavior in female rats. *Zoolog Sci*, 18, 1225-30.

## ANEXO

DEVERA, A., PASCOVICH, C., LAGOS, P., FALCONI, A., SAMPOGNA, S., CHASE, M. H. & TORTEROLO, P. 2015. Melanin-concentrating hormone (MCH) modulates the activity of dorsal raphe neurons. *Brain Res*, 1598, 114-28. Available online at www.sciencedirect.com ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/brainres



**Research Report** 

## Melanin-concentrating hormone (MCH) modulates the activity of dorsal raphe neurons



Brain Research

Andrea Devera<sup>a,1</sup>, Claudia Pascovich<sup>a,1</sup>, Patricia Lagos<sup>b</sup>, Atilio Falconi<sup>a</sup>, Sharon Sampogna<sup>c</sup>, Michael H. Chase<sup>c,d</sup>, Pablo Torterolo<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Neurobiología del Sueño, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

<sup>b</sup>Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

<sup>c</sup>WebSciences International, Los Angeles, CA, USA

<sup>d</sup>UCLA School of Medicine, Los Angeles, CA, USA

#### ARTICLE INFO

Article history: Accepted 13 December 2014 Available online 23 December 2014 Keywords: Serotonin Hypothalamus Peptide Sleep Depression

### ABSTRACT

Hypothalamic neurons that utilize melanin-concentrating hormone (MCH) as a neuromodulator are localized in the postero-lateral hypothalamus and incerto-hypothalamic area. These neurons send dense projections to the dorsal raphe nucleus (DRN).

Serotonergic neurons of the DRN are involved in the control of sleep and play a critical role in major depression. Previously, we demonstrated that microinjections of MCH into the DRN resulted in an increase in REM sleep and produce a depressive-like effect. In the present study we examined the mechanisms that mediate these effects by employing neuroanatomical and electrophysiological techniques.

First, we determined that rhodamine-labeled MCH (R-MCH), when microinjected into the lateral ventricle, is internalized in serotonergic and non-serotonergic DRN neurons in rats and cats. These data strongly suggest that these neurons express MCHergic receptors. Second, in rats, we demonstrated that the microinjection of MCH into the lateral ventricle results in a significant decrease in the firing rate in 59% of the neurons recorded in the DRN; the juxtacellular administration of MCH reduced the discharge in 80% of these neurons. Some of the neurons affected by MCH were likely serotonergic on the basis of their electrophysiological and pharmacological properties.

We conclude that MCH reduces the activity of serotonergic neurons of the DRN. These and previous data suggest that the MCHergic modulation of serotonergic activity within the DRN is involved in the regulation of REM sleep as well as in the pathophysiology of depressive disorders.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

E-mail address: ptortero@fmed.edu.uy (P. Torterolo).

http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2014.12.032 0006-8993/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

<sup>\*</sup>Correspondence to: Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República. General Flores 2125, 11800, Montevideo, Uruguay.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>These authors contributed equally to this work.

#### 1. Introduction

Melanin concentrating hormone (MCH) is a neuromodulator present in neurons of the lateral hypothalamus and incertohypothalamic area (Bittencourt et al., 1992; Torterolo et al., 2006; Bittencourt and Celis, 2008). Its biological function is mediated by two receptors coupled to G protein known as MCHR-1 and MCHR-2 (Saito and Nagasaki, 2008). The MCHR-2 gene is a pseudogene in rodents; however, this receptor is functional in primates and carnivores (Tan et al., 2002). Therefore, in cats as in humans, MCH acts through both receptors; consequently, the cat is an appropriate species to explore the functional characteristics of the human MCHergic system. In rodents, it has been shown that MCH has an inhibitory role at the presynaptic and postsynaptic levels, through modulation of ion channels gated by different G protein (Gi, Go or Gq) pathways (Gao, 2009). In the lateral hypothalamus, MCH depresses both the frequency and amplitude of miniature excitatory postsynaptic currents, which suggests that MCH participates in the modulation of glutamate release from presynaptic terminals and postsynaptic glutamate receptors. In addition, MCH also directly modulates the activity of hypothalamic neurons by inhibiting voltage-dependent ion channels (Gao and van den Pol, 2001; Gao, 2009).

MCHergic neurons have been involved in critical physiological processes such as energy homeostasis, mood regulation and sleep (Torterolo et al., 2011; Blouin et al., 2013; Konadhode et al., 2013; Macneil, 2013; Monti et al., 2013). These neurons send dense projections to specific areas related to sleep and mood regulation such as the dorsal (DRN) and median raphe nuclei (Bittencourt et al., 1992; Torterolo et al., 2008, 2009; Lagos et al., 2011b; Lopez Hill et al., 2013; Torterolo et al., 2013; Yoon and Lee, 2013). High densities of MCHR-1 are also present within these areas (Hervieu et al., 2000; Saito et al., 2001); however, it is still unknown which neuronal phenotypes express these receptors. Interestingly, in the cat, MCH is also present in tanycytes, which line the fourth ventricle, and whose basal processes are intermingled with serotonergic neurons of the DRN (Torterolo et al., 2008). Among other possible functions, tanycytes play a role in the transport of substances to and from the cerebrospinal fluid (CSF) (Rodriguez et al., 2005). This fact, and the presence of MCH in the CSF (Peyron et al., 2011; Ungerfeld et al., 2011; Schmidt et al., 2013), suggest that MCH is absorbed from the CSF and subsequently produces biological effects on DRN neurons (Torterolo et al., 2008).

MCH is considered to have hypnogenic functions (Peyron et al., 2009; Torterolo et al., 2011; Benedetto et al., 2012; Lagos et al., 2012; Jego et al., 2013; Konadhode et al., 2013; Monti et al., 2013; Tsunematsu et al., 2014). In this regard, we have found that microinjections of MCH into the DRN increases rapid eye movement (REM) sleep, whereas immunoneutralization (microinjection of anti-MCH antibodies) induces the opposite effect (Lagos et al., 2009, 2011a). In addition, MCH, when applied to the DRN, produces a pro-depressive behavior evaluated in the forced swimming test, which is prevented by the antidepressant fluoxetine, a selective serotonin reuptake inhibitor, as well as by nortriptyline, a noradrenergic antidepressant (Lagos et al., 2011b; Urbanavicius et al., 2014). In contrast, the immunoneutralization of MCH within the DRN induced an antidepressive effect, while the microinjection of a specific MCHR-1 antagonist into this nucleus prevents the pro-depressive response elicited by MCH (Lagos et al., 2011b; Urbanavicius et al., 2014).

In order to determine the cellular localization of MCH receptors in the DRN and to explore the effects of MCH on DRN neurons, we conducted the following experiments. First, the phenotype of DRN neurons that express MCH receptors was explored by microinjections of rhodamine-labeled MCH (R-MCH) into the lateral ventricle of rats and cats. This study was designed to verify the hypothesis that neurons expressing this receptor internalize R-MCH. Second, extracellular recordings in urethane-anesthetized rats were obtained in order to explore the electrophysiological effects of the intracerebroventricular (i.c.v.) and juxtacellular administration of MCH on DRN neurons.

#### 2. Results

## 2.1. MCH conjugated with rhodamine was internalized by DRN neurons

Following i.c.v. administration in rats and cats R-MCH was detected within the soma of DRN neurons throughout the extent of the nucleus. Fig. 1A and B show R-MCH labeled neurons in the DRN of the rat. An irregular grainy pattern of R-MCH labeling was localized in the soma cytoplasm (Fig. 1A, inset). No clear differences were observed between the rats perfused one or four hours following i.c.v. microinjections, neither with respect of the quantity of DRN neurons that incorporated R-MCH, nor the degree of the fluorescence density.

R-MCH was also incorporated into DRN neurons of the cat. In Fig. 1C-F tanycytes are shown in green (arrows) and R-MCH labeled neurons in red (arrowheads); the neurons that internalized R-MCH were located in close relationship with the basal processes of tanycytes.

R-MCH was also internalized by serotonergic neurons in the cat. Fig. 2A presents a photomicrograph of a representative DRN section showing rhodamine fluorescence (A1, red), serotonin immunoreactivity (A2, green); a composite of both photomicrographs is presented in A3. The superposition of R-MCH (red) and serotonin (green) labeling within the DRN is also shown in another section for the cat (Fig. 2B) and the rat (Fig. 2C and D). It is interesting to note that some serotonergic neurons incorporated R-MCH (small arrows in Fig. 2A3, B, C and D) and others did not (arrowheads in Figs. 2A and B). Furthermore, small-sized non-serotonergic neurons within the DRN also internalized R-MCH in both cats and rats (large arrows in Fig. 2A3, B, C and D).

Immunohistochemical studies for GAD-67 were also carried out in cats. Because GAD accumulates principally in axon terminals, the administration of a substance that blocks axonal transport (i.e., colchicine) is required to reveal the entire population of GAD immunoreactive neurons (McGregor et al., 2005). However, even without this treatment, we were able to observe clusters of GABAergic neurons in the postero-lateral region of the DRN and GABAergic fibers and terminals throughout the DRN. As can be readily observed, some GABAergic neurons within the DRN also incorporated R-MCH (Fig. 3C, arrows).

In control physiological conditions, MCH immunoreactivity in the soma and dendrites was detected only in neurons within the



Fig. 1 – MCH-rhodamine is internalized by DRN neurons in the rat and cat. A and B. Photomicrographs of the DRN in the rat illustrating rhodamine fluorescence within DRN neurons (examples indicated by arrowheads). These neurons are located in the rostro-medial region of the nucleus. Calibration bars, 50 μm; inset 25 μm. C to F. DRN of the cat. These sections were immunolabeled to detect vimentin, a marker of tanycytes in the adult cat. C. Topographic photomicrograph of the DRN that shows rhodamine fluorescence within DRN neurons, located in the dorsal area of the medial region the nucleus (in red). The labeled neurons are located in close relationship to tanycytes (in green). 4V, fourth ventricle. D to F. Higher magnification photomicrographs that show MCH-rhodamine fluorescence (examples indicated by arrowheads) inside DRN neurons and their relationship with tanycytes (arrows). Neurons in D and F are located in dorso-lateral regions of the nucleus while neurons in E are located more medial. Calibration bars: C, 100 μm; D to F, 50 μm.

hypothalamus and incerto-hypothalamic area of the cat; it was not detected in neurons of the DRN or the reticular formation (Torterolo et al., 2006, 2008, 2009). Fig. 4A1-A2 consists of photomicrographs of a DRN section processed to detect MCH by immunofluorescence in a cat in which R-MCH had previously been administrated. As expected, MCHergic axons (supposedly originating from hypothalamic and/or incerto-hypothalamic neurons) were observed within the DRN (Fig. 4A2, large arrows). However, MCH immunoreactivity was also present in the soma and dendrites of DRN neurons after R-MCH administration. There was tenuous, diffuse MCH labeling in the somata of DRN neurons as well as grainy MCH-immunoreactivity that was correlated with the presence of rhodamine fluorescent labeling (Fig. 4A1 and A2). This particular type of distribution of



Fig. 2 – MCH-rhodamine is internalized in serotonergic neurons of cat and rats. In A1, the photomicrograph shows that R-MCH (red) was internalized by DRN neurons in the cat. Photomicrograph in A2 (FITC-green labeling) depicts neurons with serotonin immunoreactivity. Superimposition of both photomicrographs is shown in A3. It is readily observed that R-MCH is present in serotonergic (small arrows) and non-serotonergic neurons (large arrows). Interestingly, R-MCH was not present in some serotonergic neurons (arrowheads). B. Another example of a merged photomicrograph shows R-MCH (in red) and serotonin immunoreactivity (FITC-green) in the DRN of the cat. Arrows and arrowheads as in A. C and D. Superposition of photomicrographs from the DRN of the rat. R-MCH (in red) and serotonin (FITC-green) labeling are shown. As shown, R-MCH is present in serotonergic (small arrows) and non-serotonergic neurons (large arrows). All the neurons were located in the lateral areas of the DRN. Calibration bars: A to D, 50 μm.

MCH-immunoreactivity and rhodamine fluorescent labeling was more clearly observed in larger neurons, for example, in neurons of the gigantocellular tegmental field (Figs. 4B).

R-MCH was also present in several brain regions other than the DRN. Although we did not conduct a quantitative analysis of the distribution of R-MCH labeled neurons throughout the brain, the density of neurons that internalized R-MCH in the DRN appeared to be greater compared to other areas. In fact, there were sites with very low or negligible incorporation of R-MCH. Fig. 4C-D are photomicrographs of a section from the cerebellum; although R-MCH was present in the Purkinje layer, it was almost absent in neurons of the granular and molecular layers.

As a control experiment we administered i. c.v. rhodamine alone (not tagged with MCH) into the lateral ventricle. The pattern



Fig. 3 – MCH-rhodamine is internalized in GABAergic neurons in the lateral region of the DRN. In A, the photomicrograph shows immunoreactivity for GAD67 (green) in the postero-lateral region of the DRN of the cat. B. This photomicrograph reveals that R-MCH (red) was internalized by DRN neurons. Both upper photomicrographs are merged in C. R-MCH is readily apparent in GABAergic neurons (examples are indicated by arrows). Calibration bars:  $50 \,\mu$ m.

of distribution of rhodamine was totally different when compared with R-MCH; as described previously by Ionescu et al. (2012), we found that rhodamine dispersed homogenously in the intercellular space throughout the entire brain, forming aggregates that do not correspond to neuronal structures, as well as bordering the ventricular surface and vascular structures (data shown as Supplementary Data).

#### 2.2. Unit recordings in the DRN

Unit recordings were obtained from neurons that were confirmed to be located within the limits of the DRN of the rat. Fig. 5 shows the reconstruction of the location of the recorded neurons (n=52, Fig. 5A, B), an example of a representative microelectrode track (Fig. 5C) and a Nb-labeled neuron (Fig. 5D).

The entire population of recorded neurons (n=52) displayed the following electrophysiological characteristics. The action potential (AP) had an average duration of  $2.5\pm0.2$  ms, the basal firing rate was  $5.06\pm0.88$  Hz and the coefficient of variation (CV) was  $0.16\pm0.02$ . Ninety percent of these neurons exhibited unimodal interval histogram (IH) and 40.4% had a rhythmic pattern or a predominant interval in the autocorrelation histogram (ACH). A burst firing pattern, that is, doublet or triplets with < 20 ms intervals with a prominent diminution in the amplitude of higher order spikes, was observed in eight neurons (15.4%).

Of the 52 neurons recorded, 37 were treated with MCH (i.c.v. or juxtacellular) and 15 with saline (i.c.v. or juxtacellular). No statistical differences in AP duration, basal firing rate or CV were observed between MCH and saline-treated groups (unpaired Student t test).

# 2.3. Effects of the intracerebroventricular microinjections of MCH

The microinjection of MCH into the lateral ventricle induced a significant decrease in the firing rate in 10 out of 17 (59%) DRN neurons (p < 0.05, Mann Whitney test). On average, MCH administration resulted in a decrease in the firing rate of this group of neurons from  $3.52\pm0.7$  Hz to  $1.79\pm0.39$  Hz (p < 0.05, paired Student t test, n=10), with a latency of  $102.5\pm29.3$  sec; the diminution in the rate of firing lasted  $480.3\pm319.1$  sec. In four neurons, the reduction in the firing rate was followed by a clear rebound (higher firing rate compared to the rate in the basal recordings) that lasted up to eight minutes. A significant increment in the firing rate was observed in only one neuron. In contrast, the i.c.v. administration of saline did not modify the rate or pattern of discharge of the recorded neurons ( $3.4\pm0.97$  Hz before vs.  $3.9\pm0.95$  Hz after saline administration, n=12).

Examples of the effect produced by the i.c.v. administrations of MCH are shown in Figs. 6–8. The neuron shown in Fig. 6 had a short duration AP (0.7 ms), a basal firing rate of  $8.27\pm0.9$  Hz, a unimodal IH, a predominant interval in the ACH, and a CV of 0.1. The i.c.v. administration of MCH produced a marked decrease in the firing rate, with a latency of  $\approx$  80 seconds and a duration of  $\approx$  130 seconds. Note the rebound in the firing rate approximately 2.5 minutes after the microinjection of MCH. Fig. 7 consists of a recording from a neuron with a clock-like or regular pattern of discharge; MCH produced a subtle, but significant decrease in its firing rate. The discharge of the neuron in Fig. 8A was suppressed following the systemic (i.p.) administration of the selective 5HT1<sub>A</sub> agonist 8-OH-DPAT (which is a characteristic response of serotonergic neurons) as well as by MCH. In contrast, Fig. 8B shows a neuron with high and irregular firing rate; this neuron



Fig. 4 – MCH immunoreactivity is present in DRN and reticular neurons. A1 shows that R-MCH (red, small arrows) is internalized by DRN neurons. The photomicrograph in A2 (FITC-green labeling) depicts the same neurons presenting MCH immunoreactivity (small arrows). Note that MCH immunoreactivity is present in the same region where R-MCH is located. B1. This photomicrograph reveals that R-MCH (red, small arrows) was internalized by a large reticular neuron in the gigantocellular tegmental field. The neuron in the photomicrograph in B2 exhibits MCH immunoreactivity (FITC-green labeling, small arrows). Large arrows in A2 and B2 indicate MCHergic axons. Calibration bars: A and B, 50 μm. C and D. Specificity in the internalization of R-MCH. C. Topographic view of the cerebellum of the cat. R-MCH is present in neurons within the Purkinje layer. Note that there is scarce R-MCH labeling in the molecular layer (M) and that the fluorescent signal is almost totally absent within the granular layer (G). A dashed-line indicates the external limit of the cerebellar cortex. D. Photomicrograph at higher magnification showing the inset delimited in C. Calibration bars: C, 100 μm; D, 50 μm.

was likely non-serotonergic; raw recordings from this neuron demonstrated that MCH increased its firing rate.

#### 2.4. Effects of juxtacellular administration of MCH

The juxtacellular pressure injection of MCH was carried out in 20 neurons. In 16 neurons (80%), MCH produced a significant decrease in their firing rate, while none of them responded with

an increase in the rate of discharge. On average, MCH decreased the firing rate from  $8.2\pm2.6$  Hz to  $3.2\pm0.97$  Hz (paired Student t test, p < 0.05, n = 16), with an average latency of  $32.6\pm14.3$  sec; the diminution in the rate of firing lasted  $252\pm58.8$  sec. A significant rebound in firing rate was observed in four neurons. In contrast, the juxtacellular administration of saline in three neurons did not modify their firing rate ( $7.14\pm5.3$  Hz before vs  $7.52\pm5.6$  Hz after saline administration).



Fig. 5 – Localization of the recorded neurons in the DRN. A. The sites of the recorded neurons during i.c.v. microinjection experiments were reconstructed based on the electrode track. The coordinates are according to Paxinos and Watson (2005). The position of the recorded neurons during the juxtacellular administration experiments based in the location of Nb-labeled neurons is shown in B. The photomicrograph in C is a representative example of the track left by an electrode (arrow). Aq, aqueduct; DRN, dorsal raphe nucleus; mlf, medial longitudinal fascicle. Calibration bar, 1 mm. A representative Nb-labeled neuron (arrow) is presented in D. Calibration bar, 40 μm.

Fig. 9 presents a recording of a representative neuron with a clock-like pattern of discharge, according to its rhythmic ACH. The juxtacellular application of MCH produced a significant decrease in its firing rate.

#### 2.5. Effects of MCH on serotonergic neurons

Juxtacellular microinjections of MCH decreased the activity of 80% of DRN neurons. Due to the high density of serotonergic neurons within this nucleus, it was expected that an important percentage of these neurons were serotonergic.

DRN serotonergic neurons fire in a slow (< 4.0 Hz) regular fashion and individual AP durations >1.4 ms; serotonergic neurons are also inhibited by 5HT1<sub>A</sub> agonists (Aghajanian et al., 1978; Hajos et al., 1995; Hajos et al., 2007). Of the 37 neurons that were challenged with MCH (applied either i.c.v. or juxtacellularly), 25 had AP durations>1.4 ms and 14 exhibited a firing rate <4 Hz. On average, the CV of these neurons was  $0.16\pm0.04$ , compatible with a regular pattern of activity, and five neurons discharged rhythmically in the ACH. Table 1 shows the effects of MCH

administration on DRN neurons according to their electrophysiological characteristics.

Three neurons were treated with 8-OH-DPAT i.p., which suppressed the discharge of two neurons; the firing of these neurons was also suppressed by MCH (Table 1). In contrast, MCH did not produce any effect on the neuron that did not respond to 8-OH-DPAT. Interestingly, MCH reduced the firing rate of all neurons that had burst firing (n=5, Table 1); Hajos et al. (2007) consider that this type of neurons is serotonergic.

Ten neurons treated with MCH presented at least three of these attributes: long AP durations, slow firing, burst discharge, rhythmic activity in the ACH and firing suppression by 8-OH-DPAT; MCH decreased the firing rate of eight these neurons (Table 1).

Within the whole population of neurons that were treated with MCH, there was no statistical significant difference in the AP durations, basal frequency or CV between the neurons that were (n = 26) or were not (n = 11) inhibited by MCH (unpaired Student t test). Note that because of the absence of R-MCH internalization in some serotonergic neurons, it was expected that a group of serotonergic neurons would not respond to MCH.



Fig. 6 – Intracerebroventricular administration of MCH reduces the activity of DRN neurons. The action potential average, interval histogram and the autocorrelation histogram of a representative neuron are shown in A. The raw recording from this neuron is presented in B. Following i.c.v. administration of MCH there is a decrease in the firing rate. In a, b and c, the recordings are shown at a higher time magnification. In C, the inhibitory effect of MCH and a subtle post-inhibitory rebound are noticeable in the frequency histogram.

### 3. Discussion

By administrating R-MCH into the lateral ventricle, we were able to demonstrate in rats and cats that neurons of the DRN internalize MCH. These DRN neurons were both serotonergic and non-serotonergic. Some of the non-serotonergic neurons were identified as GABAergic. These results strongly suggest that MCH receptors are expressed in serotonergic neurons of the DRN in cats and rats. Furthermore, the i.c.v. and juxtacellular administration of MCH produced a decrease of the firing rate in the majority of DRN neurons. Some of these neurons, based upon their electrophysiological and/or pharmacological characteristics, were serotonergic.

#### 3.1. Technical considerations

To the best of our knowledge, this is the first report in which R-MCH has been used, in vivo, to study the internalization of

MCH in neurons. Because of the lack of previous experience in this methodology, we used doses which were similar to those used previously for intracerebral microinjections of MCH (Lagos et al., 2009; Torterolo et al., 2009; Lagos et al., 2011b) or were employed in i.c.v. microinjection studies (Rossi et al., 1997; Verret et al., 2003).

Ionescu et al. (2012) demonstrated that intra-nasal or i.c.v. administration of Neuropeptide-S tagged either with rhodamine or Cy3, is internalized into specific groups of neurons; however, as we demonstrated in the present report, rhodamine alone did not internalize into neurons. This result supports the concept that R-MCH was internalized into the neurons by their specific interaction with MCH receptors. In the rat, this effect is mediated by the only functional MCH receptor, MCHR-1. New studies are needed in order to determine the role of MCHR-2 in DRN neurons of the cat.

The latency from the onset of the microinjections of R-MCH to euthanasia of the animals was one to four hour. We chose



Fig. 7 – Intracerebroventricular administration of MCH reduces the activity of a clock-like, presumed serotonergic DRN neuron. A. The action potential average, the interval histogram and the autocorrelation histogram of a clock-like firing neuron are presented. Note the rhythmic pattern of activity in the autocorrelation histogram. B. Raw recordings before and after the administration of MCH. The changes in firing rate are difficult to observe; however, they are readily apparent in the instant frequency histogram (C).

this time window because our previous studies demonstrated that the behavioral effects induced by microinjections of MCH into the DRN appear five minutes after its microinjection and last for at least six hours (Lagos et al., 2009, 2011b). Therefore, we considered that the most representative results would be obtained within this time window.

#### 3.2. MCH receptors are present in serotonergic and nonserotonergic neurons

Although both MCHR-1 mRNA and protein were detected within the DRN by *in situ* hybridization and immunohistochemistry respectively (Hervieu et al., 2000; Saito et al., 2001), the phenotype of DRN neurons that express MCHR-1 remains to be determined. The present data strongly suggest that MCHR-1 is present in serotonergic and in a subpopulation of small-sized non-serotonergic neurons within the DRN of rats and cats. We also demonstrated in cats, that GAD+ neurons also internalized R-MCH.

We consider that the rhodamine fluorescent signal detected in the cytoplasm of DRN neurons corresponds to ligand-receptor complexes that were internalized after the i.c.v. administration of R-MCH. Saito et al. (2004), in an *in vitro* approach (with HEK293 cells that expressed MCHR-1 with a fluorescent tag attached), found a 44% decrease in the cell membrane signal of MCHR-1 following stimulation with MCH. The internalization of MCH with its receptor progressed during the first 30 minutes and was consistent 60 minutes after the application of MCH. Due to the fact that the animals were euthanized at least 60 minutes after R-MCH administration, we believe that within this timeperiod, R-MCH was transported through the CSF to DRN neurons that express MCHR-1 in their membranes, and was then internalized by these neurons. Hence, the interactions of R-MCH with MCHR-1 at the cells' membrane would determine the internalization of R-MCH-MCHR-1 complexes. Ligandinduced receptor internalization, described for G proteincoupled receptors (GPCR) as MCHR-1, results in desensitization through down-regulation (Ferguson, 2001).

In the cat, DRN neurons that internalize R-MCH were observed in close relationship with the basal processes of tanycytes (Fig. 1). The presence of MCH in the tanycytes of the DRN have led to the hypothesis of a neurohumoral flow of MCH through the CSF to the DRN (volume transmission) (Torterolo et al., 2008). The presence of MCH in the tanycytes, the presence of MCH in the CSF (Peyron et al., 2011; Ungerfeld et al., 2011; Schmidt et al., 2013), as well as the fact that MCH administered into the lateral ventricle modulates DRN neuronal activity, suggest the presence of a neurohumoral MCH pathway to the DRN. This hypothesis should be examined in conjunction with recent studies that reveal an increase in the convective exchange of CSF with interstitial fluid during sleep (Xie et al., 2013), when MCHergic neurons are most active (Hassani et al., 2009).

#### 3.3. MCH modulates the activity of DRN neurons

In accord with the present R-MCH experiments, we observed that when MCH was applied into the lateral ventricle of the



Fig. 8 – MCH (i.c.v.) effects on DRN neurons. A. Presumed serotonergic neuron, which is inhibited by systemic 8-OH-DPAT. 1. Raw recording of the unit before and after the systemic (i.p.) administration of the 5HT1<sub>A</sub> agonist 8-OH-DPAT. 2. The effect of the i.c.v. administration of MCH is shown in the raw recordings and the frequency histogram. B. The effect of MCH administration on a presumed non-serotonergic DRN neuron. The action potential average, the interval histogram and the autocorrelation histogram of this neuron are presented. Raw recordings of the neuron before and after the i.c.v. administration of MCH are shown. Note the presence of a small but significant increase in the firing rate of this neuron.

rat, reached DRN neurons after a latency of several seconds. MCH produced a clear decrease in the firing rate of DRN neurons that lasted for several minutes. In addition to a direct effect of MCH on DRN neurons, extra-DRN circuits could also mediate the suppression of discharge. However, the juxtacellular application of MCH demonstrated the presence of a local inhibitory (pre and/or postsynaptic) response in 80% of the recorded neurons. The lack of effect on several neurons accords with the fact that some neurons within the DRN did not internalize R-MCH, and is likely that these neurons do not express MCHR-1 receptors.

In some neurons, MCH induced-suppression of the discharge was frequently followed by a subtle increase in the firing rate (rebound). This effect could be produced by inwardly rectifying currents (that are present in serotonergic neurons) that resulted in a post-inhibitory rebound (Williams et al., 1988).

# 3.4. Effects of MCH on serotonergic and non-serotonergic neurons

MCH decreased the firing rate of putative serotonergic neurons within the DRN. This fact is supported by the expression

of MCH receptors and the electrophysiological and pharmacological characteristics of these neurons (see Results). In accordance with these results, *in vivo* microdialysis studies demonstrated that MCH perfusion into the DRN decreased the release of serotonin within this nucleus (Urbanavicius et al., 2013). Recordings of identified serotonergic neurons are needed in order to confirm this hypothesis.

In rats and cats, R-MCH was also internalized in smallsized non-serotonergic neurons. Furthermore, in cats R-MCH was internalized by GABAergic neurons. Neurons that generate short duration (< 1.4 ms) AP in a fast (7–30 Hz) irregular fashion are likely GABAergic (Aghajanian et al., 1978; Hajos et al., 1995). Since MCH is an inhibitory neuromodulator, we expected a direct (postsynaptic) inhibitory action of MCH on cells of the DRN, however, an excitatory effect was observed in one neuron with GABAergic electrophysiological features. Because there is a strong presynaptic effect of MCH, decreasing the release of GABA in the hypothalamus (Gao and van den Pol, 2001), a presynaptic disinhibitory effect produced by MCH could explain this result. In fact, in addition to the presence of R-MCH on the soma of DRN neurons, punctuate marks of R-MCH were observed throughout the DRN (not



Fig. 9 – Juxtacellular administration of MCH reduces the activity of DRN neurons. A. The action potential average, the interval histogram and the autocorrelation histogram (ACH) of a representative neuron are shown. Note the rhythmic pattern of discharge in the ACH. B. The raw recordings with two different time calibrations are shown. Note that MCH decreases the firing rate of this neuron. C. The decrease in the firing rate was also reflected in the frequency histogram.

Table 1 – Neurons inhibited by MCH administration (intraventricular and juxtacellular) according to their electrophysio- logical and pharmacological characteristics.			
Electrophysiological characteristics	Number of neurons	Number of neurons inhibited by MCH	% of neurons inhibited by MCH
All neurons	37	26	70.3
Action potential>1.4 ms	35	25	71.4
Firing rate <4 Hz	23	14	60.9
Rhythmical pattern in the ACH	6	5	83.3
Burst discharge	5	5	100
Inhibited by 8-OH-DPAT	2	2	100
Three or more features	10	8	80

Thirty-seven neurons were treated with MCH. In 17 neurons MCH was administered in the lateral ventricle, while in 20 neurons the administration of MCH was juxtacellular. The statistical significance of the MCH effect was evaluated by the Mann-Whitney U test. ACH, autocorrelation histogram.

shown), suggesting the presence of internalization of R-MCH into presynaptic structures. Further experiments are needed to understand the fine-tuning of MCH regulatory actions with respect to neuronal networks within the DRN.

#### 3.5. Biological significance of the effects of MCH in the DRN

Serotonergic neurons of the DRN exhibit a tonic pattern of discharge during wakefulness, a decrease in activity during non-REM

(NREM) sleep and are almost inactive during REM sleep (McGinty and Harper, 1976). Putative GABAergic neurons of the DRN have been involved in the inhibition of the serotonergic neurons (Portas et al., 1996; Nitz and Siegel, 1997; Maloney et al., 1999; Torterolo et al., 2000). However, because MCHergic neurons project to the DRN and are active during REM sleep (Torterolo et al., 2008; Hassani et al., 2009; Yoon and Lee, 2013), as well as the fact that microinjections of MCH within this nucleus promotes REM sleep (Lagos et al., 2009), we hypothesize that MCH inhibits serotonergic neurons and by this action contributes to the generation of REM sleep.

There is also a strong relation between REM sleep and depression (Palagini et al., 2013), and serotonergic neurons of the DRN seem to be involved in this association. A dysfunction of serotonergic neurons in the DRN underlies major depression and suicide (Underwood et al., 1999; Arango et al., 2001, 2002; Boldrini et al., 2005; Bach-Mizrachi et al., 2006). As previously discussed, when MCH is applied into the DRN, not only is REM sleep promoted, but there are also pro-depressive effects which are prevented by the microinjection of a selective MCHR-1 antagonist into the DRN, while immunoneutralization of MCH within this nucleus produced an antidepressive effect (Lagos et al., 2009, 2011a, 2011b; Urbanavicius et al., 2014). Therefore, the inhibitory actions of MCH with respect to the discharge of serotonergic neurons are likely involved not only in the generation of REM sleep but also in the depressive-like behaviors that are produced by this neuropeptide.

#### 3.6. Conclusions

We conclude that MCH receptors are expressed in serotonergic neurons of the DRN. Acting through these receptors, MCH inhibits putative serotonergic activity within the DRN. We also propose that this inhibitory effect is responsible for the promotion of REM sleep and the depressive-like effects that are induced by MCH.

#### 4. Experimental procedures

Two adult cats ( $\approx$  3,5 Kg) and 35 Wistar rats (250–310 g) were used in this study. The animals were maintained with food and water available *ad libitum* and kept under controlled conditions (temperature 22±2 °C, 12-h day–night cycle, lights on at 7:00 A.M.). All of the experimental procedures were conducted in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (8th edition, National Academy Press, Washington DC, 2010) and approved by the Institutional Animal Care Commission. Adequate measures were taken to minimize pain, discomfort or stress of the animals, and all efforts were made to use the minimal number of animals necessary to produce reliable scientific data.

#### 4.1. Microinjection of rhodamine-labeled MCH

Cats. The surgical procedures that were employed were comparable to those used in previous studies (Torterolo et al., 2009, 2013). Briefly, prior to being anesthetized, each cat was pre-medicated with xylazine (2.2 mg/kg, i.m.) and atropine (0.04 mg/ kg, i.m.). Anesthesia was induced with ketamine (15 mg/kg, i.m.) and maintained with a gas mixture of isofluorane in oxygen (1– 3%). The animal's head was positioned in a stereotaxic frame (David Kopf Instruments, USA) and the skull was exposed. A hole, 5 mm in diameter, was drilled in the skull overlying the right lateral ventricle to provide access for drug administration (AP: 13.7; L: 3.0; H: +7 mm) according to Berman and Jones, (1982). Rhodamine conjugated with MCH by a covalent bond (Phoenix Pharmaceuticals Inc., FR-070–47; 1.2  $\mu$ g/ $\mu$ l) was diluted in DMSO 20% and distilled water 80%. In these animals, i.c.v. microinjections of R-MCH (20  $\mu$ l) were performed for a period of three minutes with a Hamilton syringe; the needle was left in position for 20 minutes in order to avoid leakage during the withdrawal procedure (Torterolo et al., 2009, 2013). The body temperature of the cats (and rats, see below) was maintained at 37 °C throughout the experiment by means of a homeothermic heating pad.

Four hours after microinjection, the animals were euthanized with an overdose of sodium pentobarbital (60 mg/Kg). Thereafter, the animals were perfused with one liter of heparinized saline followed by 1.5 liter of 4% paraformaldehyde (PFA) in phosphate buffer (PB, 0.1 M, pH 7.4). Subsequently, they were perfused with 500 ml of 4% PFA containing 10% sucrose. The brain was removed and immersed in a post-fixative solution of 2% PFA and 10% sucrose in PB for 24 h. Following post-fixation, the tissue was kept for three days in a solution of sucrose (25%) and sodium azide (0.1%) in PB. Thereafter, the brain was frozen and serially sectioned in the coronal plane at 14  $\mu$ m using a Reichert-Jung cryostat. The sections were stored in a solution of 0.1% sodium azide in PB-saline (PBS, 0.1 M) at 4 °C.

Rats. Two animals were anesthetized with urethane (1.5 g/kg, i.p.) and then mounted in a stereotaxic frame. Following a scalp incision, skull landmarks were visualized and coordinates were determined according to (Paxinos and Watson, 2005). A small hole was drilled in the skull in order to place a Hamilton syringe in the left lateral ventricle (AP: 0.8; L: 0.5; H: -3.3). The microinjection of R-MCH (10  $\mu$ l, i.c.v.) was performed for a period of 3 min; the syringe needle was left in position for 20 minutes. In two additional rats, we also microinjected rhodamine-B (0.1mg/ml i.c.v., Sigma-Aldrich), with the same procedure as described before.

One or four hours after the microinjection, the rats were perfused with 300 ml of 0.9% NaCl and 500 ml of 4% PFA in PB, followed by 200 ml of the same solution containing 10% sucrose. The brain was removed and immersed for 24 h in a post-fixative solution, which consisted of 2% PFA and 10% sucrose in PB. Following post-fixation, the tissue was kept for three days in a solution of sucrose (25%) and sodium azide (0.1%) in PB. Thereafter, the brain was frozen and serially sectioned in a coronal plane at 14  $\mu$ m using a Reichert-Jung cryostat. The sections were stored in a solution of 0.1% sodium azide in PB-saline (PBS, 0.1 M) at 4 °C.

#### 4.2. Immunohistochemistry

Single immunostaining procedures were performed in brain sections from the rats and cats. All the antibodies and procedures were utilized in previous studies of our group (see below), in these reports the specificity of these antibodies were assessed by omission and/or absorption tests. Briefly, in order to recognize serotonergic neurons, the sections were incubated with goat polyclonal anti-serotonin antibody (Incstar, Stillwater, MN; 1:10.000) overnight. Thereafter, they were incubated with a donkey anti-goat antibody conjugated with fluorescein isothiocianate (FITC, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., 1:200) for one hour (Torterolo et al., 2008; Lagos et al., 2011b). Vimentin immunoreactivity, a marker of DRN tanycytes in adult cats, was also analyzed (Torterolo et al., 2008). Mouse monoclonal antivimentin antibody (Sigma-Aldrich, V6389; 1:500) and secondary donkey anti-mouse antibody conjugated with FITC (1:200) were employed. MCH immunoreactivity was also examined; rabbit polyclonal anti-MCH antibody (Phoenix Pharmaceuticals; 1:2000) and donkey anti-rabbit IgG conjugated with FITC were employed (Torterolo et al., 2006, 2008, 2009). Glutamate decarboxylase (GAD-67) antibodies were used to detect GABAergic cells (McGregor et al., 2005; Pose et al., 2010). Sections were incubated in 0.5% sodium borohydride; thereafter, they were incubated in PBS, 50mM glycine, 0.1% BSA, followed by 6% BSA in PBST. Subsequently, they were exposed to mouse anti-GAD67 serum (Chemicon International) 1:1000, PBST, 4% BSA. Thereafter, the sections were incubated in donkey anti-mouse IgG conjugated with FITC. The sections were mounted onto superfrost plus slides or subbed slides with ProLong Gold antifade reagent, coverslipped and stored at dark at -20 °C until observation and analysis.

Selected forebrain and brainstem sections were examined using fluorescent light microscopy. Photomicrographs were obtained using a SPOT digital camera. Images were analyzed with Adobe PhotoShop software and a Power Macintosh G4 computer.

#### 4.3. Unit recordings

Rats (n= 31) were anesthetized with urethane (1.5 g/kg, i.p.) and positioned in a stereotaxic frame (David Kopf Instruments, USA). Following a scalp incision, skull landmarks were visualized and coordinates were determined from Paxinos and Watson (2005). A small hole was drilled in the skull in order to place a recording electrode in the DRN (AP -7.8 mm, L 0 mm, H 5.5-7; from Bregma). Double micropipettes were lowered at an angle of 26° to avoid the sagittal vein (AP -7.8 mm, L 2.6 mm, H 5.5-7). A guide cannula was implanted into the lateral ventricle (AP 1.0; L 2.0; H 3.4) for drugs microinjections.

Extracellular recordings were carried out using standard procedures with glass micropipette of 5–20 M $\Omega$ , filled with 2 M NaCl (Torterolo et al., 1998, 2002, 2013) or with 2% Neurobiotin (Nb, Vector Laboratories) in 0.5 M NaCl solution (Boucetta et al., 2014). Double micropipettes were also fabricated for recording and the juxtacellular application of MCH. The MCH-filled micropipette tip had a diameter of 5–20  $\mu$ m and was separated from the recording electrode by 50–150  $\mu$ m.

Neuronal signals were amplified by an AC-coupled amplifier (Dagan 2400A), filtered between 0.3 Hz-10 kHz and digitized at 20 kHz. Single unit activity in the DRN was acquired and processed by Spike 2 software (Cambridge Electronic Design, UK). Once a unit had been isolated, its activity was recorded for 10–90 min. In selected experiments, the selective 5-HT1<sub>A</sub> receptor agonist 8-OH-DPAT (200 µg/kg, i.p., Sigma-Aldrich) was administered during the recording of spontaneously active neurons.

The baseline discharge of DRN neurons was recorded for at least 3 min before drug application. Then,  $10 \,\mu$ l of MCH (0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l, Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Burlingame, CA; #070–47) or saline (NaCl 0.9%) was microinjected into the lateral ventricle with a Hamilton microsyringe, which was connected to the injection cannula. Juxtacellular MCH (0.25  $\mu$ g/ $\mu$ l) or saline was also applied by pressure pulses of 5 to 20 PSI for 200 to 300 ms. Two procedures were utilized to localize the recording sites. When recordings were performed with a single-barreled micropipette, at the end of each experiment the tip of the electrode was cut and left in the brain. The animals were perfused with 4% PFA,

the brain was removed and the brainstem was cut in coronal sections of 150  $\mu$ m with a vibratome in order to localize the tip of the recording micropipette. Nb was applied when the recordings were performed with double-barreled electrodes. In order to identify Nb-labeled cells, 30  $\mu$ m serial sections were cut through the pontomesencephalic tegmentum with a cryostat, incubated with Alexa fluor 555-conjugated streptavidin (1:5000, Molecular Probes) and mounted on slides (using 70% glycerol for coverslipping) to analyze with fluorescence microscopy.

The averaged waveforms of the action potentials were analyzed. The APs were mostly biphasic, and the duration of both phases was considered as the AP duration (Hajos et al., 2007). The basal pattern of discharge was analyzed off-line by frequency, interval and autocorrelation histograms. The coefficient of variation was used as a measure of the regularity of neuronal discharge (Werner and Mountcastle, 1963).

The mean firing rate is presented as the mean $\pm$ SEM. The effect of MCH was evaluated by comparing the firing rate pre and post MCH administration (windows of 1 to 5 minutes depending on the firing rate of the analyzed neurons) in each neuron by means of Mann–Whitney U test (Torterolo et al., 2002; Cabrera et al., 2013). Mean populations were analyzed by the paired or unpaired two-tailed Student t test. The criterion chose to discard the null hypothesis was P < 0.05.

#### Acknowledgments

This study was supported by ANII-FCE-1-2011-1-5997, CSIC and PEDECIBA, Uruguay. We thank Dr. Cecilia Scorza for critical comments of the manuscript and Vicente Ruiz-Viroga for technical assistance in rhodamine microinjections.

#### Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres. 2014.12.032.

#### REFERENCES

- Aghajanian, G.K., Wang, R.Y., Baraban, J., 1978. Serotonergic and nonserotonergic neurons of the dorsal raphe: reciprocal changes in firing induced by peripheral nerve stimulation. Brain Res. 153, 169–175.
- Arango, V., Underwood, M.D., Boldrini, M., Tamir, H., Kassir, S.A., Hsiung, S., Chen, J.J., Mann, J.J., 2001. Serotonin 1A receptors, serotonin transporter binding and serotonin transporter mRNA expression in the brainstem of depressed suicide victims. Neuropsychopharmacology 25, 892–903.
- Arango, V., Underwood, M.D., Mann, J.J., 2002. Serotonin brain circuits involved in major depression and suicide. Prog. Brain Res. 136, 443–453.
- Bach-Mizrachi, H., Underwood, M.D., Kassir, S.A., Bakalian, M.J., Sibille, E., Tamir, H., Mann, J.J., Arango, V., 2006. Neuronal tryptophan hydroxylase mRNA expression in the human dorsal and median raphe nuclei: major depression and suicide. Neuropsychopharmacology 31, 814–824.
- Benedetto, L., Rodriguez-Servetti, Z., Lagos, P., D'Almeida, V., Monti, J.M., Torterolo, P., 2012. Microinjection of melanin

concentrating hormone into the lateral preoptic area promotes non-REM sleep in the rat. Peptides 39C, 11–15.

- Berman, A.L., Jones, E.G., 1982. The Thalamus and Basal Telencephalum of the Cat. A Citoarchitectonic Atlas with Stereotaxic Coordinates. University of Wisconsin, Madison.
- Bittencourt, J., Celis, M.E., 2008. Anatomy, function and regulation of neuropeptide EI (NEI). Peptides 29, 1441–1450.
- Bittencourt, J.C., Presse, F., Arias, C., Peto, C., Vaughan, J., Nahon, J.L., Vale, W., Sawchenko, P.E., 1992. The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. J. Comp. Neurol. 319, 218–245.
- Blouin, A.M., Fried, I., Wilson, C.L., Staba, R.J., Behnke, E.J., Lam, H. A., Maidment, N.T., Karlsson, K.A.E., Lapierre, J.L., Siegel, J.M., 2013. Human hypocretin and melanin-concentrating hormone levels are linked to emotion and social interaction. Nat. Commun. 4, 1547.
- Boldrini, M., Underwood, M.D., Mann, J.J., Arango, V., 2005. More tryptophan hydroxylase in the brainstem dorsal raphe nucleus in depressed suicides. Brain Res. 1041, 19–28.
- Boucetta, S., Cisse, Y., Mainville, L., Morales, M., Jones, B.E., 2014. Discharge profiles across the sleep-waking cycle of identified cholinergic, GABAergic, and glutamatergic neurons in the pontomesencephalic tegmentum of the rat. J. Neurosci. 34, 4708–4727.
- Cabrera, G., Cavelli, M., Lopez, C., Rodriguez-Servetti, Z., Vanini, G., Chase, M., Falconi, A., Torterolo, P., 2013. Wakefulnesspromoting role of the inferior colliculus. Behav. Brain Res. 256, 82–94.
- Ferguson, S.S., 2001. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. Pharmacol. Rev. 53, 1–24.
- Gao, X.B., 2009. Electrophysiological effects of MCH on neurons in the hypothalamus. Peptides 30, 2025–2030.
- Gao, X.B., van den Pol, A.N., 2001. Melanin concentrating hormone depresses synaptic activity of glutamate and GABA neurons from rat lateral hypothalamus. J. Physiol. 533, 237–252.
- Hajos, M., Allers, K.A., Jennings, K., Sharp, T., Charette, G., Sik, A., Kocsis, B., 2007. Neurochemical identification of stereotypic burst-firing neurons in the rat dorsal raphe nucleus using juxtacellular labelling methods. Eur. J. Neurosci. 25, 119–126.
- Hajos, M., Gartside, S.E., Villa, A.E., Sharp, T., 1995. Evidence for a repetitive (burst) firing pattern in a sub-population of 5hydroxytryptamine neurons in the dorsal and median raphe nuclei of the rat. Neuroscience 69, 189–197.
- Hassani, O.K., Lee, M.G., Jones, B.E., 2009. Melanin-concentrating hormone neurons discharge in a reciprocal manner to orexin neurons across the sleep-wake cycle. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106, 2418–2422.
- Hervieu, G.J., Cluderay, J.E., Harrison, D., Meakin, J., Maycox, P., Nasir, S., Leslie, R.A., 2000. The distribution of the mRNA and protein products of the melanin- concentrating hormone (MCH) receptor gene, slc-1, in the central nervous system of the rat. Eur. J. Neurosci. 12, 1194–1216.
- Ionescu, I.A., Dine, J., Yen, Y.C., Buell, D.R., Herrmann, L., Holsboer, F., Eder, M., Landgraf, R., Schmidt, U., 2012. Intranasally administered neuropeptide S (NPS) exerts anxiolytic effects following internalization into NPS receptorexpressing neurons. Neuropsychopharmacology 37, 1323–1337.
- Jego, S., Glasgow, S.D., Herrera, C.G., Ekstrand, M., Reed, S.J., Boyce, R., Friedman, J., Burdakov, D., Adamantidis, A.R., 2013. Optogenetic identification of a rapid eye movement sleep modulatory circuit in the hypothalamus. Nat. Neurosci. 16, 1637–1643.
- Konadhode, R.R., Pelluru, D., Blanco-Centurion, C., Zayachkivsky, A., Liu, M., Uhde, T., Glen Jr., W.B., van den Pol, A.N., Mulholland,

P.J., Shiromani, P.J., 2013. Optogenetic stimulation of MCH neurons increases sleep. J. Neurosci. 33, 10257–10263.

- Lagos, P., Monti, J.M., Jantos, H., Torterolo, P., 2012. Microinjection of the melanin-concentrating hormone into the lateral basal forebrain increases REM sleep and reduces wakefulness in the rat. Life Sci. 90, 895–899.
- Lagos, P., Torterolo, P., Jantos, H., Chase, M.H., Monti, J.M., 2009. Effects on sleep of melanin-concentrating hormone microinjections into the dorsal raphe nucleus. Brain Res. 1265, 103–110.
- Lagos, P., Torterolo, P., Jantos, H., Chase, M.H., Monti, J.M., 2011a. Immunoneutralization of melanin-concentrating hormone (MCH) in the dorsal raphe nucleus: effects on sleep and wakefulness. Brain Res. 1369, 112–118.
- Lagos, P., Urbanavicius, J., Scorza, C., Miraballes, R., Torterolo, P., 2011b. Depressive-like profile induced by MCH microinjections into the dorsal raphe nucleus evaluated in the forced swim test. Behav. Brain Res. 218, 259–266.
- Lopez Hill, X., Pascovich, C., Urbanavicius, J., Torterolo, P., Scorza, C., 2013. The median raphe nucleus participates in the depressive-like behavior induced by MCH:differences with the dorsal raphe nucleus. Peptides 50C, 96–99.
- Macneil, D.J., 2013. The role of melanin-concentrating hormone and its receptors in energy homeostasis. Front. Endocrinol. (Lausanne) 4, 49.
- Maloney, K.J., Mainville, L., Jones, B.E., 1999. Differential c-Fos expression in cholinergic, monoaminergic, and GABAergic cell groups of the pontomesencephalic tegmentum after paradoxical sleep deprivation and recovery. J. Neurosci. 19, 3057–3072.
- McGinty, D.J., Harper, R.M., 1976. Dorsal raphe neurons: depression of firing during sleep in cats. Brain Res. 101, 569–575.
- McGregor, R., Damian, A., Fabbiani, G., Torterolo, P., Pose, I., Chase, M., Morales, F.R., 2005. Direct hypothalamic innervation of the trigeminal motor nucleus: a retrograde tracer study. Neuroscience 136, 1073–1081.
- Monti, J.M., Torterolo, P., Lagos, P., 2013. Melanin-concentrating hormone control of sleep-wake behavior. Sleep Med. Rev. 17, 293–298.
- Nitz, D., Siegel, J., 1997. GABA release in the dorsal raphe nucleus: role in the control of REM sleep. Am. J. Physiol. 273, R451–455.
- Palagini, L., Baglioni, C., Ciapparelli, A., Gemignani, A., Riemann, D., 2013. REM sleep dysregulation in depression: state of the art. Sleep Med. Rev.
- Paxinos, G., Watson, C., 2005. The Rat Brain. Academic Press, New York.
- Peyron, C., Sapin, E., Leger, L., Luppi, P.H., Fort, P., 2009. Role of the melanin-concentrating hormone neuropeptide in sleep regulation. Peptides 30, 2052–2059.
- Peyron, C., Valentin, F., Bayard, S., Hanriot, L., Bedetti, C., Rousset, B., Luppi, P.H., Dauvilliers, Y., 2011. Melanin concentrating hormone in central hypersomnia. Sleep Med. 12, 768–772.
- Portas, C.M., Thakkar, M., Rainnie, D., McCarley, R.W., 1996. Microdialysis perfusion of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin (8-OH- DPAT) in the dorsal raphe nucleus decreases serotonin release and increases rapid eye movement sleep in the freely moving cat. J. Neurosci. 16, 2820–2828.
- Pose, I., Sampogna, S., Chase, M.H., Morales, F.R., 2010. Nitrergic ventro-medial medullary neurons activated during cholinergically induced active (rapid eye movement) sleep in the cat. Neuroscience 172, 246–255.
- Rodriguez, E.M., Blazquez, J.L., Pastor, F.E., Pelaez, B., Pena, P., Peruzzo, B., Amat, P., 2005. Hypothalamic tanycytes: a key component of brain-endocrine interaction. Int. Rev. Cytol. 247, 89–164.
- Rossi, M., Choi, S.J., O'Shea, D., Miyoshi, T., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., 1997. Melanin-concentrating hormone acutely stimulates

feeding, but chronic administration has no effect on body weight. Endocrinology 138, 351–355.

- Saito, Y., Cheng, M., Leslie, F.M., Civelli, O., 2001. Expression of the melanin-concentrating hormone (MCH) receptor mRNA in the rat brain. J. Comp. Neurol. 435, 26–40.
- Saito, Y., Nagasaki, H., 2008. The melanin-concentrating hormone system and its physiological functions. Results Probl. Cell Differ. 46, 159–179.
- Saito, Y., Tetsuka, M., Li, Y., Kurose, H., Maruyama, K., 2004. Properties of rat melanin-concentrating hormone receptor 1 internalization. Peptides 25, 1597–1604.
- Schmidt, F.M., Kratzsch, J., Gertz, H.J., Tittmann, M., Jahn, I., Pietsch, U.C., Kaisers, U.X., Thiery, J., Hegerl, U., Schonknecht, P., 2013. Cerebrospinal fluid melanin-concentrating hormone (MCH) and hypocretin-1 (HCRT-1, orexin-A) in Alzheimer's disease. PLoS One 8, e63136.
- Tan, C.P., Sano, H., Iwaasa, H., Pan, J., Sailer, A.W., Hreniuk, D.L., Feighner, S.D., Palyha, O.C., Pong, S.S., Figueroa, D.J., Austin, C.P., Jiang, M.M., Yu, H., Ito, J., Ito, M., Guan, X.M., MacNeil, D.J., Kanatani, A., Van der Ploeg, L.H., Howard, A.D., 2002. Melaninconcentrating hormone receptor subtypes 1 and 2: speciesspecific gene expression. Genomics 79, 785–792.
- Torterolo, P., Falconi, A., Morales-Cobas, G., Velluti, R.A., 2002. Inferior colliculus unitary activity in wakefulness, sleep and under barbiturates. Brain Res. 935, 9–15.
- Torterolo, P., Lagos, P., Monti, J.M., 2011. Melanin-concentrating hormone (MCH): a new sleep factor? Front. Neurol. 2, 1–12.
- Torterolo, P., Lagos, P., Sampogna, S., Chase, M.H., 2008. Melaninconcentrating hormone (MCH) immunoreactivity in nonneuronal cells within the raphe nuclei and subventricular region of the brainstem of the cat. Brain Res. 1210, 163–178.
- Torterolo, P., Sampogna, S., Chase, M.H., 2009. MCHergic projections to the nucleus pontis oralis participate in the control of active (REM) sleep. Brain Res. 1268, 76–87.
- Torterolo, P., Sampogna, S., Chase, M.H., 2013. Hypocretinergic and non-hypocretinergic projections from the hypothalamus to the REM sleep executive area of the pons. Brain Res. 1491, 68–77.
- Torterolo, P., Sampogna, S., Morales, F.R., Chase, M.H., 2006. MCHcontaining neurons in the hypothalamus of the cat: Searching for a role in the control of sleep and wakefulness. Brain Res. 1119, 101–114.
- Torterolo, P., Yamuy, J., Sampogna, S., Morales, F.R., Chase, M.H., 2000. GABAergic neurons of the cat dorsal raphe nucleus express c-fos during carbachol-induced active sleep. Brain Res. 884, 68–76.

- Torterolo, P., Zurita, P., Pedemonte, M., Velluti, R.A., 1998. Auditory cortical efferent actions upon inferior colliculus unitary activity in the guinea pig. Neurosci. Lett. 249, 172–176.
- Tsunematsu, T., Ueno, T., Tabuchi, S., Inutsuka, A., Tanaka, K.F., Hasuwa, H., Kilduff, T.S., Terao, A., Yamanaka, A., 2014. Optogenetic manipulation of activity and temporally controlled cell-specific ablation reveal a role for MCH neurons in sleep/wake regulation. J. Neurosci. 34, 6896–6909.
- Underwood, M.D., Khaibulina, A.A., Ellis, S.P., Moran, A., Rice, P.M., Mann, J.J., Arango, V., 1999. Morphometry of the dorsal raphe nucleus serotonergic neurons in suicide victims. Biol. Psychiatry 46, 473–483.
- Ungerfeld, R., Alzugaray, S., Quintela, H.G., Lagos, P., Torterolo, P., Bielli, A., 2011. Melanin concentrating hormone (MCH) in the cerebrospinal fluid of ewes during spontaneous oestrous cycles and ram effect induced follicular phases. Peptides 32, 2511–2513.
- Urbanavicius, J., Lagos, P., Torterolo, P., Scorza, C., 2013. Role of melanin concentrating hormone (MCH) on the dorsal raphe nucleus (DRN): its relevance for depression. J. Neurochem. 125, 265.
- Urbanavicius, J., Lagos, P., Torterolo, P., Scorza, C., 2014. Prodepressive effect induced by microinjections of MCH into the dorsal raphe: time-course, dose-dependence, effects on anxiety-related behaviors and reversion by nortriptyline. Behav. Pharmacol. 4, 316–324.
- Verret, L., Goutagny, R., Fort, P., Cagnon, L., Salvert, D., Leger, L., Boissard, R., Salin, P., Peyron, C., Luppi, P.H., 2003. A role of melanin-concentrating hormone producing neurons in the central regulation of paradoxical sleep. BMC Neurosci. 4, 19.
- Werner, G., Mountcastle, V.B., 1963. The variability of central neural activity in a sensory system, and its implications for the central reflection of sensory events. J. Neurophysiol. 26, 958–977.
- Williams, J.T., Colmers, W.F., Pan, Z.Z., 1988. Voltage- and ligandactivated inwardly rectifying currents in dorsal raphe neurons in vitro. J. Neurosci. 8, 3499–3506.
- Xie, L., Kang, H., Xu, Q., Chen, M.J., Liao, Y., Thiyagarajan, M.,
  O'Donnell, J., Christensen, D.J., Nicholson, C., Iliff, J.J., Takano,
  T., Deane, R., Nedergaard, M., 2013. Sleep drives metabolite
  clearance from the adult brain. Science 342, 373–377.
- Yoon, Y.S., Lee, H.S., 2013. Projections from melanin-concentrating hormone (MCH) neurons to the dorsal raphe or the nuclear core of the locus coeruleus in the rat. Brain Res. 1490, 72–82.