



Universidad de la República  
Licenciatura en Biología Humana



**Informe final de pasantía**

Diciembre, 2020

**LA HORMONA CONCENTRADORA DE MELANINA COMO DELIMITADORA DEL ÁREA  
PREÓPTICA VENTROLATERAL**

**Estudiante:** Stefany Dayana Horta Franco

**Tutora:** Annabel Ferreira

**Orientadora de pasantía:** Luciana Benedetto

**Co-orientador de pasantía:** Pablo Torterolo

**Lugar de realización:** Laboratorio de Neurobiología del Sueño,  
Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de la  
República.

## Índice

1.Introducción	6
1.1. Características del sueño y la vigilia	6
Vigilia	7
Sueño REM	7
Sueño no-REM	8
1.2. Núcleo ventrolateral del área preóptica	9
Localización del VLPO: diferentes marcadores y modelos animales	9
1.3. Hormona Concentradora de Melanina	11
2. Descripción del problema de investigación	12
3. Hipótesis	13
4. Objetivos	13
4.1. Objetivo General	13
4.2. Objetivos Específicos	13
5. Metodología	13
5.1. Instalaciones	13
5.2. Animales de experimentación	14
Ratas	14
Gatos	14
5.3. Sesiones experimentales	14
Ratas	14
Gatos	15
5.4. Análisis de los resultados	15
Análisis cualitativo de las fibras MCHérgicas	15
Cámara Lúcida	15
Análisis cualitativo	16
6. Resultados	16
6.1. Descripción general de fibras MCHérgicas en POA	16
Rata	16
6.2. VLPO en ratas	19
6.3. VLPO en gatos	22
7. Discusión	24

7.1. VLPO en ratas	24
¿Cómo representar al VLPO?	24
Técnicas para la identificación	25
7.2. VLPO en gatos	26
7.3 Importancia en la Biología Humana	27
8. Conclusión	27
9. Perspectivas	27
10. Bibliografía	29

## Resumen

El sueño es un proceso vital altamente conservado en mamíferos y otros animales, que se puede dividir en dos grandes etapas: el sueño REM y el sueño no-REM (NREM). Estas etapas están reguladas por complejos circuitos neuronales. Dentro de las áreas que regulan el sueño NREM, el área preóptica (POA) y en particular el núcleo ventrolateral del POA (VLPO) es un núcleo clave. Sin embargo, aún no hay consenso sobre su localización y delimitación precisa. A su vez, el sistema MCHérgico (MCH, de *Hormona Concentradora de Melanina*), cuyos somas se encuentran en el hipotálamo posterior y tiene gran proyección a diversas áreas del cerebro, ha sido fuertemente vinculado a la modulación del sueño, aunque su relación con el VLPO ha sido poco estudiada. Asimismo, las neuronas del POA son capaces de expresar MCH únicamente durante la lactancia. En el presente trabajo nos propusimos delimitar el VLPO a través de sus aferencias MCHérgicas en diferentes especies de mamíferos y géneros. Para cumplir con dicho objetivo, realizamos inmunohistoquímica para detectar MCH, en cortes correspondientes al área preóptica (POA) de cerebros de ratas macho y hembras lactantes. Además, analizamos cortes histológicos de cerebro de gato, en la región del área preóptica, previamente obtenidos y tratados con inmunohistoquímica para MCH.

Observamos que el VLPO de ratas (tanto machos como hembras lactantes) muestra una gran inervación MCHérgica, que lo diferencia de las regiones adyacentes. Sin embargo, se ve una distribución difusa de las fibras MCHérgicas en el área preóptica de gato. En base a esto, concluimos que es posible delimitar estructuralmente al núcleo VLPO en ratas a través de dichas fibras, tanto en hembras como machos. Sin embargo, la delimitación del VLPO utilizando las fibras MCHérgicas en gato no es clara, ya que no hay un contraste evidente entre sus áreas adyacentes, por lo que se deberá continuar investigando otras técnicas para su delimitación.

Los resultados obtenidos contribuyen al conocimiento de la neurobiología del sueño y del sistema MCHérgico, lo cual permitirá sentar las bases para lograr comprender diversos trastornos de sueño que afectan a gran parte de la sociedad, y

que están asociados a una amplia gama de condiciones médicas y psiquiátricas.

**Palabras clave:** Sueño, Hormona Concentradora de Melanina, Núcleo Ventrolateral del Área Preóptica.

## **1.Introducción**

El sueño puede definirse como un estado comportamental reversible donde la respuesta y la interacción con el medio se encuentran disminuidas. Es un proceso vital, que se encuentra altamente conservado en mamíferos y otros animales. La comprensión de los circuitos que subyacen al sueño es de vital importancia para la sociedad, ya que su incremento es uno de los mecanismos que el organismo utiliza para lidiar con diversas patologías. La privación crónica del sueño provoca lapsus de atención, inestabilidad emocional, aumento de la sensibilidad al dolor, trastornos metabólicos y cardiovasculares, disfunción inmune y, en casos extremos, la muerte (Basner y col., 2013, Irwin y Opp, 2017, Tobaldini y col., 2017, W. J. Joiner, 2016). Además, en los últimos años se ha acumulado evidencia que sugiere el rol del sueño en el inicio y la progresión del cáncer, principalmente cáncer de mama (Walker y Borniger, 2019). En humanos, tiene un fuerte impacto en la vida social, ya que un sueño adecuado es esencial para lograr una función cognitiva adecuada, estando la falta de éste implicada en los desastres industriales más importantes, así como en accidentes automovilísticos y laborales (Brown, 2012).

### ***1.1. Características del sueño y la vigilia***

Durante la vigilia existe una interacción óptima con el ambiente que nos permite desarrollar diversos comportamientos necesarios para la supervivencia. En el ser humano, la vigilia se acompaña de conciencia del medio que nos rodea y de ciertos estímulos generados internamente. En cambio, el sueño se caracteriza por una disminución de la interacción con el ambiente, un aumento del umbral de reacción a estímulos externos, una disminución de la actividad y tono muscular, así como la adopción de una posición adecuada para conservar el calor corporal (Carskadon y Dement 2011). En la mayoría de los mamíferos se distinguen dos grandes etapas en el sueño: el sueño REM, del inglés: “rapid eye movements”, y el sueño no-REM (NREM) o sueño de ondas lentas (Carskadon, 2005). La vigilia y las dos etapas del sueño están reguladas por complejos circuitos neuronales, los cuales interactúan entre sí para dar

como resultado un estado comportamental determinado. Los grupos neuronales que generan la vigilia se conocen como sistemas activadores, mientras que los que generan sueño se denominan sistemas somnogénicos. Una de las teorías de la generación de cada estado sugiere que estos grupos neuronales se inhiben entre sí, de forma tal que para generar la vigilia las neuronas activadoras inhiben a las somnogénicas, y viceversa (Saper y col., 2005).

### ***Vigilia***

En 1930, estudios realizados por Von Economo llevaron a postular la existencia de un sector del encéfalo que mantenía el cerebro en vigilia, localizado en el mesencéfalo y el hipotálamo posterior (Von Economo, 1930). Años después, Moruzzi y Magoun (1949) observaron que este efecto era mediado por una vía ascendente, relacionada con la vigilia, que comenzaba en la protuberancia rostral y transcurría a través de la formación reticulada mesencefálica (Moruzzi y Magoun, 1949). Así, el sistema reticular activador ascendente (SRAA) fue identificado y definido como un sistema neuronal localizado en el área central del tronco encefálico y que enviaba proyecciones ascendentes al cerebro anterior, necesarias y suficientes para el mantenimiento tónico de la activación cortical y el estado comportamental de la vigilia.

### ***Sueño REM***

En forma periódica, y siempre precedido del sueño no-REM (en adultos), se ingresa en el estado de sueño REM. A pesar de que el sueño es profundo, el electroencefalograma (EEG) es similar al de vigilia, por eso también se denomina “sueño activo” o “sueño paradójico”. Esta etapa, donde ocurren los ensueños, se acompaña de una atonía muscular y de cambios físicos de la actividad autonómica (Tortero y Vanini 2010).

Los circuitos de regulación del sueño REM están distribuidos por distintas zonas del tronco encefálico e hipotálamo, e involucran una variedad de neurotransmisores y neuropéptidos (Héricé et al, 2019). Existe una red neuronal fundamental para la generación de sueño REM, ubicada en la formación reticulada mesopontina (Siegel,

2011). Dentro de esta región, las neuronas colinérgicas del núcleo tegmental laterodorsal y pedúnculo-pontino (LDT-PPT), así como las neuronas glutamatérgicas del núcleo pontis oralis (NPO, que se considera el área ejecutiva para la generación del sueño REM) están activas durante el sueño REM, mientras que las neuronas noradrenérgicas del locus coeruleus (LC) y las neuronas serotoninérgicas de la RD y MR suprimen su activación (Monti, 2010 ; Siegel, 2011 ; Brown et al., 2012 ; Chase, 2013a; Boucetta et al., 2014). La red neuronal mesopontina que genera el sueño REM está fuertemente modulada por los sitios del prosencéfalo, que reciben importantes proyecciones MCHérgicas e hipocretinérgicas del hipotálamo (Tortero et al., 2009b , 2013 ).

Las estructuras clave que generan la atonía muscular del sueño REM son el núcleo subcoeruleus en el tegmento mesopontino y la formación reticular de la médula medial ventral. Utilizando entradas glutamatérgicas, GABAérgicas y glicinérgicas, las proyecciones directas e indirectas de estas dos áreas inhiben las motoneuronas de la médula espinal, lo que resulta en la atonía muscular característica en el sueño REM. (Iranzo, 2018)

### ***Sueño no-REM***

El sueño no-REM (NREM), también llamado “sueño de ondas lentas” o “sueño lento”, se caracteriza por presentar un EEG con ondas de baja frecuencia y alta amplitud, así como husos de sueño, ambos generados por una actividad sincronizada de neuronas talámicas y corticales. Este estado se acompaña, además, de un aumento tónico de la actividad parasimpática que determina cambios característicos de la actividad visceral (Tortero y Vanini, 2010).

Von Economo (1930), además de postular la existencia de un sector del encéfalo que mantenía la vigilia, detectó un sector anterior del hipotálamo relacionado con el sueño. Posteriormente, dicha área fue denominada área preóptica (POA; Swanson y col., 1987) y una gran diversidad de trabajos han mostrado la importancia de esta área en la regulación y generación de sueño (Gaus y col., 2002; Gong y col., 2004; Gvilia y col., 2006a; Gvilia y col., 2006b; Suntsova y col., 2007; Benedetto y col.,



2012,2013). A pesar que en la mayoría de las áreas del cerebro estudiadas el sueño NREM está asociado a un decremento de la descarga neuronal y de la actividad metabólica (Shiromani y col., 1999), el POA es uno de las pocas áreas donde la actividad de algunos grupos neuronales está incrementada en esta etapa (Eguchi y Satoh, 1980).

### **1.2. Núcleo ventrolateral del área preóptica**

Un progreso significativo en la caracterización de la neuroanatomía y la neuroquímica de las neuronas hipotalámicas involucradas en la regulación de sueño, se ha logrado mediante el uso de métodos de inmunohistoquímica para factores de transcripción como el c-fos y c-jun, que permiten el mapeo de neuronas activas a una escala mayor que la que es posible con electrofisiología de registro unitario de neuronas (Cirelli et al., 1995; Cirelli y Tononi, 2000; Gong et al., 2004). En este sentido, Sherin y col. (1996), utilizando la detección inmunohistoquímica de la proteína *Fos* como índice de actividad neuronal, identificaron por primera vez un grupo de neuronas activas durante el sueño en el núcleo ventrolateral del área preóptica (VLPO). Específicamente, identificaron una población de neuronas en el VLPO que su actividad aumenta directamente proporcional al tiempo de sueño durante la hora previa a la eutanasia del animal (Sherin y col., 1996). Esto concuerda con estudios electrofisiológicos que muestran que las neuronas activas en el sueño, con tasas de disparo de dos a tres veces más rápido durante el sueño que durante la vigilia, son particularmente numerosas en el VLPO (Alam y col., 1995; Szymusiak y col., 1998). Además, se ha observado que las lesiones específicas de somas neuronales en esta área generan insomnio duradero y profundo (Lu y col., 2000) y la reducción de su tamaño con la edad puede explicar los déficits de sueño en los humanos ancianos (Gaus y col., 2002).

#### ***Localización del VLPO: diferentes marcadores y modelos animales***

Como se mencionó anteriormente, la primera identificación del VLPO en ratas fue a partir de una detección inmunohistoquímica de la proteína *Fos* (Sherin y col.,

1996). Posteriormente, Gaus y col (2002) vieron que un alto porcentaje de las neuronas del VLPO activas durante el sueño colocalizan con el neuropéptido galanina en roedores y gatos. Por esta razón, Gaus y col. (2002) plantearon un método para identificar el área preóptica ventrolateral del cerebro de mamíferos, a partir de la expresión de galanina. Sin embargo, en ambas investigaciones se trabaja a partir de actividad neuronal, y la delimitación del núcleo se ha realizado a través del conteo de estas neuronas activas. La falta de un marcador específico de dicha área ha generado que existan diferencias con respecto a la localización, el tamaño y la forma del VLPO (ver Tabla 1) y por lo tanto su función aún no está del todo esclarecida.

**Tabla 1-** Diferencias en la forma y tamaño del núcleo VLPO de rata, según distintos grupos de investigación.

<b>Artículo</b>	<b>Forma</b>	<b>Tamaño (µm)</b>
<b>Sherin y col. (1996)</b>	Rectángulo	300x600
<b>Gong y col. (2000)</b>	Rectángulo	300x700
<b>Gaus y col. (2002)</b>	Triángulo equilátero	300x300
<b>Chou y col. (2002)</b>	Círculo	100-300
<b>Lu y col. (2002)</b>	Cuadrado	300x300
<b>Deurveilher y col (2002; 2006)</b>	Triángulo	400x300
<b>Modirruosta y col. (2004)</b>	Cuadrado	125x125
<b>Gallopín y col. (2004)</b>	Triángulo	400x300
<b>Peterfi y col. (2010)</b>	Cuadrado	300x300

El uso de la proteína *Fos* como un marcador efectivo de la activación neuronal requiere periodos de entre 60 y 90 minutos previos a la eutanasia del animal, lo que equivale a períodos prolongados y consolidados de sueño y vigilia. Sin embargo, una de las especies más utilizada para estudios de sueño en la actualidad es la rata, aunque

presenta ciclos cortos de sueño (Cerri y col., 2005). Por esta razón, para estudiar las áreas de sueño utilizando esta proteína, es necesario diseñar experimentos con privación y rebote de sueño, y así lograr períodos de sueño requeridos. A diferencia de la rata, en el gato sí se encuentran estos períodos prolongados y consolidados de sueño y vigilia espontáneamente, razón por la que puede considerarse una especie ideal para estudiar estos estados utilizando dicha tecnología (Dragunow y Faull, 1989; Morgan y Curran, 1991; Yamuy y col., 1993; Torterolo y col., 2003; Torterolo y col., 2009). Sin embargo, desde el punto de vista técnico, es importante tener en cuenta que su principal limitación es que no todas las neuronas que se activan expresan *Fos*, por lo tanto, algunos grupos neuronales activos podrían no evidenciarse.

De manera interesante, la mayoría de los estudios de sueño son realizados en machos. Sin embargo, la hembra tiene diferencias anatomofuncionales en diversas áreas del cerebro, específicamente durante una etapa particular como lo es la lactancia. Durante este período existen múltiples cambios fisiológicos en la madre, tanto centrales como periféricos, que la hacen única en su fisiología (Pereira y Morrell, 2009; Bridges, 2008). En particular, existen cambios en varios circuitos de áreas críticas para la generación de sueño, como es el POA (Pereira y Morrell, 2009; Rondini y col., 2010; Benedetto y col., 2018). Por esta razón, podrían existir variaciones en cuanto a la delimitación de un núcleo localizado dentro de esta área.

### **1.3. Hormona Concentradora de Melanina**

La Hormona Concentradora de Melanina (MCH) es un péptido de 19 aminoácidos que fue inicialmente caracterizado como una hormona que mediaba cambios de color en los peces teleósteos (Kawauchi y col., 1983), y posteriormente identificado como neuromodulador en mamíferos (Skofitsch y col., 1985; Bittencourt y col., 1992; Forray, 2003; Shi, 2004). La función biológica de la MCH es mediada por dos receptores conocidos como MCH-R1 y MCH-R2, aunque el MCH-R2 es expresado únicamente en carnívoros, monos y seres humanos (Forray, 2003; Shi, 2004; Tan y col., 2002).

La MCH se sintetiza en neuronas cuyos somas están localizados en el

hipotálamo posterolateral y la zona inserto-hipotalámica, las cuales proyectan a diversas regiones del sistema nervioso central (Torterolo y col., 2006, 2009; Monti y col., 2013). De particular interés para el presente trabajo, este sistema proyecta densamente a regiones activadoras y somnogénicas (Monti y col., 2013; Torterolo y col., 2014); como ser el núcleo tuberomamilar del hipotálamo, el área tegmental ventral (VTA), la sustancia gris periacueductal, el locus coeruleus (LC), el núcleo pontis oralis (NPO), el núcleo tegmental laterodorsal y pedúnculo pontino (LDT-PPT), el núcleo dorsal del rafe (DR) y área preóptica del hipotálamo (Bittencourt, 1992; Bittencourt y col., 2002; McGregor y col., 2005; Torterolo y col., 2009; Torterolo y col., 2010) .

La conservación de la estructura de la MCH entre distintas especies sugiere que está involucrada en procesos fisiológicos importantes (Torterolo y col., 2010). Las principales funciones que se atribuyen a la MCH son la regulación de la ingesta y balance energético, de los estados emocionales, y el control del ciclo sueño-vigilia (Monti, 2013; Torterolo, 2010). Vinculado a lo último, existen evidencias que el dicho sistema estaría involucrado en la fisiopatología de la depresión (Torterolo y col., 2015). Por otro lado, se ha visto que la expresión de ARNm de MCH y su síntesis peptídica se inducen transitoriamente durante la lactancia en neuronas del área preóptica medial (mPOA), una región que no expresa MCH en ratas macho o hembras no lactantes (Rondini y col., 2010; Knollema y col., 1992).

Son varios y sustantivos los datos que sugieren que el sistema MCHérgico juega un papel en el control del sueño. En este sentido, la MCH promueve tanto el sueño REM como el NREM (Torterolo y col, 2003a; Verret y col, 2003; Lagos y col., 2009, Hassani y col., 2009; Peyron y col, 2009; Torterolo y col, 2011). Se ha observado que microinyecciones de MCH en el cerebro anterior, en la formación reticular pontina dorsal y el rafe dorsal aumentan específicamente las cantidades de sueño REM (Monti y col. 2016, 2015; Luppi y col., 2013; Lagos y col., 2012). Sin embargo, el tratamiento local de MCH en el VLPO, promueve específicamente el sueño NREM (Benedetto y col., 2013). Esto evidencia la especificidad del área y de la función de la MCH en la misma.

## **2. Descripción del problema de investigación**

A pesar de que el VLPO es un área clave en el control del sueño, su delimitación aún no es clara y varía según los diferentes estudios. A su vez, el sistema MCHérgico ha sido fuertemente vinculado a la modulación del sueño, pero su relación con el VLPO ha sido poco estudiada. Profundizar sobre dicha relación, puede ser un punto de partida para generar más conocimientos en relación a este núcleo hipotalámico y su rol en comportamientos vitales, como lo es el ciclo de sueño-vigilia.

## **3. Hipótesis**

La presencia de fibras MCHérgicas detectadas por inmunohistoquímica sería un marcador adecuado para delimitar el área del núcleo VLPO en rata y gato.

## **4. Objetivos**

### ***4.1. Objetivo General***

Delimitar el área del VLPO en cortes coronales de cerebro de rata y gato, mediante la presencia de fibras MCHérgicas detectadas por inmunohistoquímica anti-MCH.

### ***4.2. Objetivos Específicos***

- a. Delimitar el VLPO mediante la inervación de las fibras MCHérgicas en ratas machos adultos (*Rattus norvegicus*).
- b. Delimitar el VLPO mediante la inervación de las fibras MCHérgicas en ratas hembras lactantes (*Rattus norvegicus*).
- c. Delimitar el VLPO mediante la inervación de fibras MCHérgicas en gatos (*Felis domesticus*).

## **5. Metodología**

### **5.1. Instalaciones**

Los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Neurobiología del Sueño y Laboratorio de Neurotransmisión Peptídica, ambos del Departamento de Fisiología, de la Facultad de Medicina, UdelaR.

### **5.2. Animales de experimentación**

#### ***Ratas***

Se utilizaron ratas (*Rattus norvegicus*) macho y hembras lactantes (día postparto 14) de la cepa Wistar de aproximadamente 3 meses de edad, de 250-300 gr de peso.

Los protocolos experimentales realizados (N° 071140-000178-12) han sido aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal de la Universidad de la República de Uruguay y fueron realizados de acuerdo con la “Guía para el uso y cuidado de animales de laboratorio” (8th edition, National Academy Press, Washington, DC, 2011).

#### ***Gatos***

Los cortes histológicos que se utilizaron para el análisis en gatos fueron obtenidos a partir de cerebros de gatos machos adultos (*Felis domesticus*) previamente procesados en el laboratorio. Los protocolos experimentales fueron realizados de acuerdo con la “Guía para el uso y cuidado de animales de laboratorio” (8th edition, National Academy Press, Washington, DC, 2011).

### **5.3. Sesiones experimentales**

#### ***Ratas***

Se utilizaron cuatro ratas macho y cuatro hembras lactantes de la cepa Wistar. Luego de una sobredosis anestésica, los animales fueron perfundidos con solución salina heparinizada y posteriormente con paraformaldehído al 4 %. Finalizada la

perfusión, los cerebros fueron removidos, congelados y posteriormente se realizaron cortes coronales seriados a 30  $\mu\text{m}$  en un criostato.

Con el fin de detectar las fibras MCHérgicas en el POA, las secciones que contenían esta región fueron seleccionadas y procesadas mediante inmunohistoquímica. Para ello, los cortes fueron incubados en libre flotación durante la noche, con el anticuerpo primario (1:10000) de conejo anti-MCH (Solución madre 1: 10) en buffer fosfato salina (PBS), Tritón (PBS/T) y suero normal de burro (NDS; 3%). Luego, las secciones fueron lavadas e incubadas durante 90 minutos con anticuerpos de burro biotinilado anti-conejo (1: 600) en PBS/T 0,3%, además de NDS (3%; 1:2). Después de otro lavado, los cortes se incubaron en el complejo avidina-biotina (ABC; 1: 300) durante 60 min. Seguido de un nuevo lavado, fueron expuestos a diaminobencidina (DAB; 0,02%) y peróxido de hidrógeno (0,003%). Luego de tres minutos se cortó la reacción con agua destilada. Por último, se montaron los cortes y se dejaron secar durante 48 hs.

### **Gatos**

Se utilizaron cortes histológicos a partir de 3 gatos machos adultos previamente procesados en el laboratorio.

Todos los animales fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital sódico (60 mg / kg) y perfundidos para el procedimiento inmunohistoquímico posterior. Los cerebros fueron extraídos, congelados y posteriormente cortados serialmente en criostato en sentido coronal a 20 $\mu\text{m}$ .

Con el fin de identificar inmunorreactividad para la MCH, las secciones se incubaron durante la noche con el anticuerpo primario de conejo anti-MCH (Phoenix Pharmaceuticals, 1: 4000) y NDS(3%). Luego, las secciones se enjuagaron y se incubaron durante 90 min con el anticuerpo de burro biotinilado anti-conejo (1: 300) y NDS. Luego de otro enjuague, el tejido se incubó en el complejo ABC (1: 200) durante 60 min y luego se expuso a (0,02%) y peróxido de hidrógeno (0,0015%; Torterolo y col., 2006).

#### **5.4. Análisis de los resultados**

##### **Análisis cualitativo de las fibras MCHérgicas**

###### **Cámara Lúcida**

Los cortes histológicos fueron examinados por microscopía óptica. A partir de éstas, se tomaron microfotografías con una cámara digital SPOT montada en un microscopio Olympus BH-2. Las imágenes fueron analizadas utilizando los softwares Adobe Photoshop e Illustrator®. Mediante el uso del software Adobe Photoshop CC se obtuvieron las imágenes compuestas de microfotografías de las secciones histológicas, con un rango de 200 a 350 microfotografías por imagen. Utilizando el software Adobe Illustrator, y en base a las imágenes compuestas, que representan cortes histológicos, se realizaron las cámaras lúcidas. Para esto, se utilizan herramientas de dibujo que permiten delinear cada fibra o elemento que se observa en las imágenes. A partir de esta herramienta se puede mapear las estructuras detectadas en base a la inmunohistoquímica, en este caso, las fibras MCHérgicas presentes en los cortes de POA.

###### **Análisis cualitativo**

Para determinar la cantidad relativa de fibras MCHérgicas, adecuamos la metodología utilizada por Bittencourt (1992). Se realizó una escala de 6 puntos, donde asignó el signo “-” a la completa ausencia de tinción, “+” a los elementos muy dispersos, y “++++” a la mayor densidad de fibras observadas; con los correspondientes valores intermedios.

#### **6. Resultados**

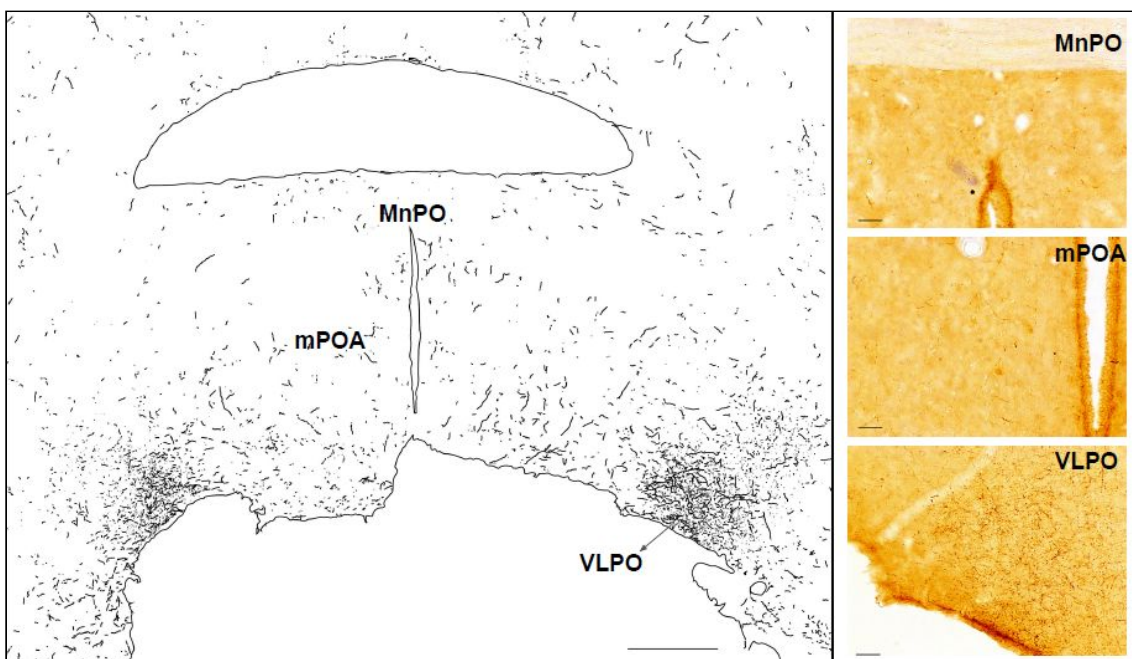
##### **6.1. Descripción general de fibras MCHérgicas en POA**

Como se muestra en la Figura 1 y 2, tanto en gatos como en ratas, existen fibras MCHérgicas a lo largo del POA, con diferencias de acuerdo a sus distintos núcleos vinculados al sueño: el núcleo mediano del área preóptica (MnPO), mPOA y el VLPO.

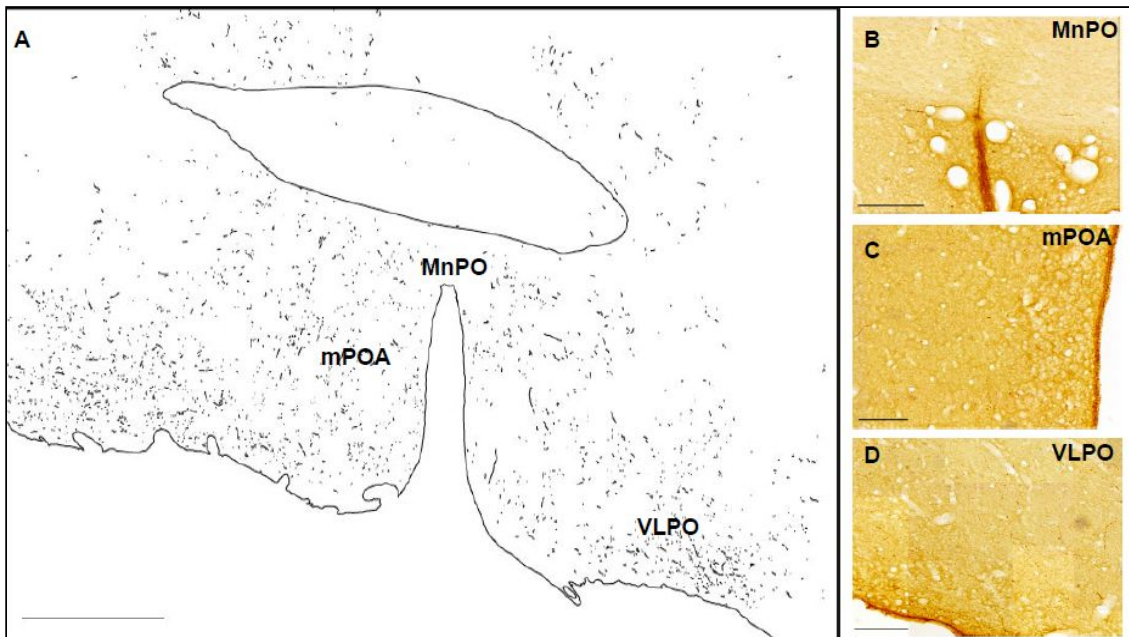


## **Rata**

Como se muestra en la Tabla 2 y la Figura 1, no se observó ausencia total de marcado inmunohistoquímico para MCH en ninguno de los núcleos. Se observa como zona de mayor dispersión (menos densidad de fibras) al MnPO (+), y un leve aumento de las fibras (++) en el mPOA; tanto en rata como en gato. Sin embargo, los resultados muestran diferencias en el VLPO de ambas especies. En el VLPO de rata se observa un notorio aumento de la densidad de fibras MCHérgicas con respecto a sus zonas adyacentes (++++).



**Figura 1- Distribución de las fibras MCHérgicas en el POA de rata.** A- Cámara lúcida de un corte coronal a 30µm de cerebro de rata, en la zona correspondiente al área preóptica, que muestra la distribución de las fibras MCHérgicas en dicha área. B- Detalles de la distribución de las fibras MCHérgicas en el núcleo MnPO; C- Detalles de la distribución de las fibras MCHérgicas en el mPOA; D- Detalles de la distribución de las fibras MCHérgicas en el núcleo VLPO. Barra de calibración de A: 200µm; B, C y D: 50µm.



**Figura 2-** Distribución de las fibras MCHérgicas en el área preóptica de gato. A-Cámara lúcida de un corte coronal del área preóptica de gato, que muestra la distribución de las fibras MCHérgicas en dicha área. B- Microfotografía del núcleo MnPO. C- Microfotografía del mPOA. D- Microfotografía del VLPO. Calibración de A: 500µm; B, C y D: 50µm.

**Tabla 2-** Densidad de fibras MCHérgicas en el POA de rata y gato, en distintos núcleos vinculados al sueño

Núcleo del POA vinculados al sueño	Densidad de fibras MCHérgicas	
	Rata	Gato
MnPO	+	+
mPOA	++	++
VLPO	+++++	+++

## **6.2. VLPO en ratas**

La cámara lúcida obtenida a partir de las microfotografías de los cortes seriados de cerebro de rata, en la zona correspondiente al POA, muestra la distribución de las fibras MCHérgicas en dicha zona. Tanto en las microfotografías como en la cámara lúcida, el VLPO muestra una gran inervación MCHérgica, que lo diferencia de las regiones adyacentes, las cuales presentan una escasa inervación de dichas fibras (Figura 1). Estas diferencias entre el VLPO y las zonas adyacentes permitirían trazar una línea entre ambas zonas (Figura 3). Estas características se observan tanto en machos como en hembras lactantes.

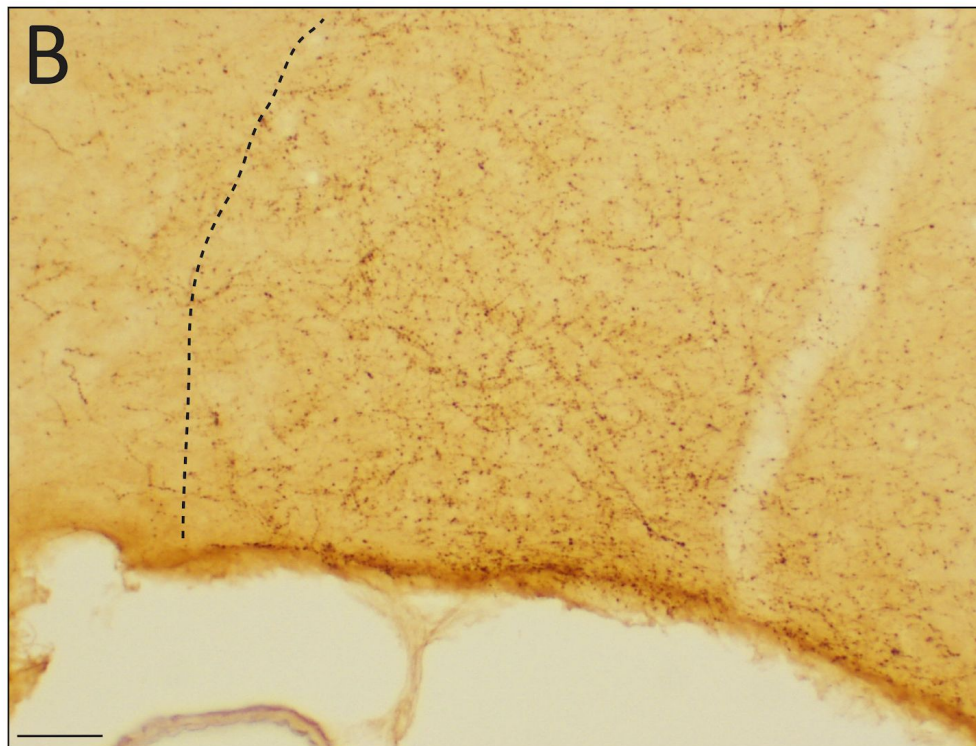
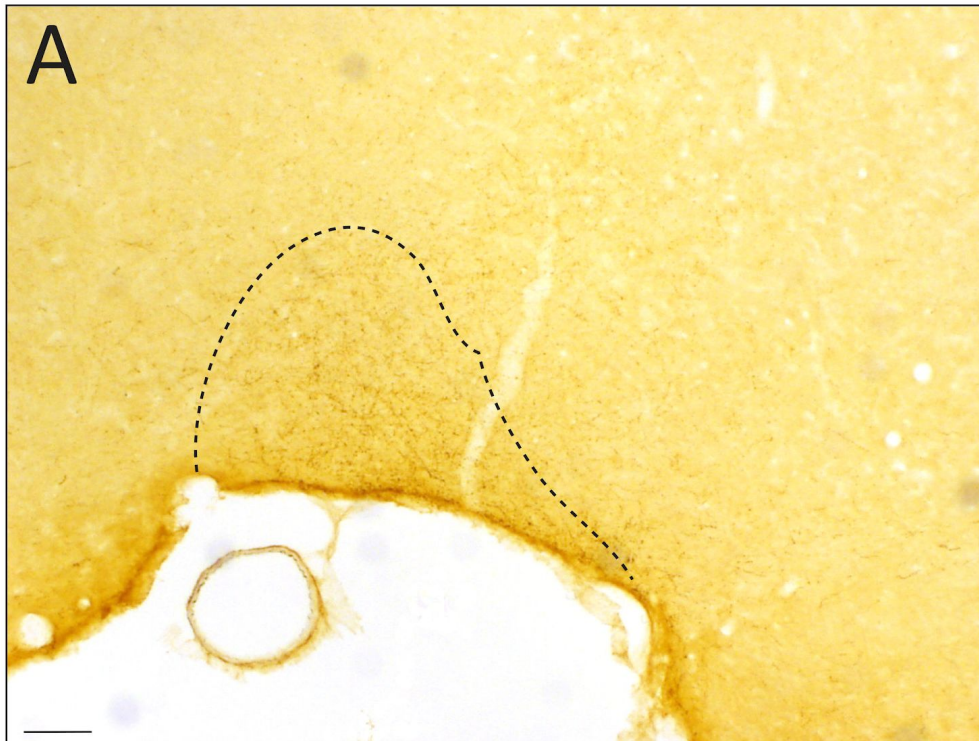
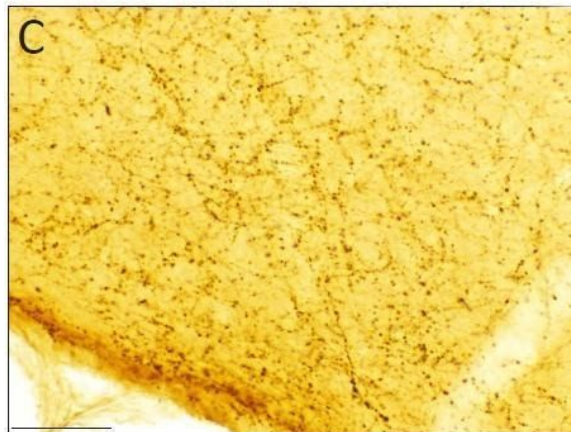
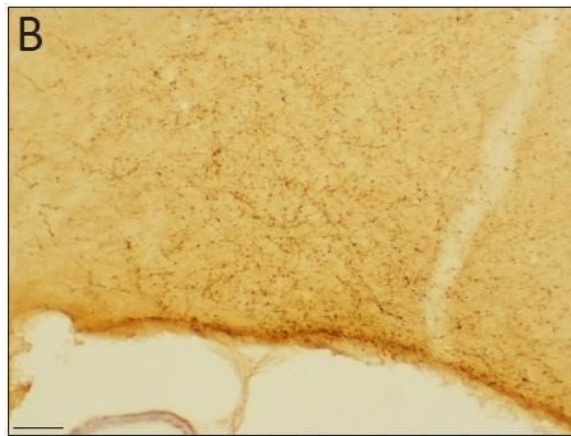
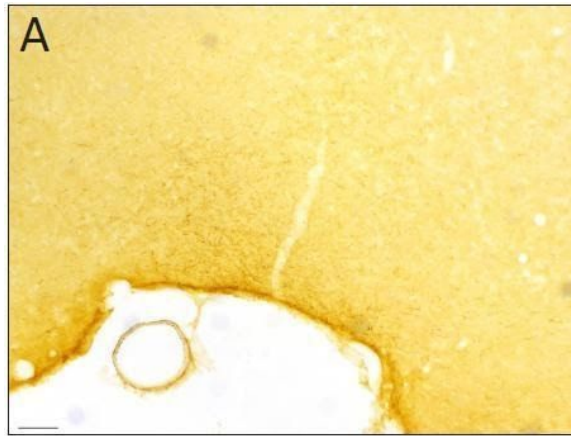
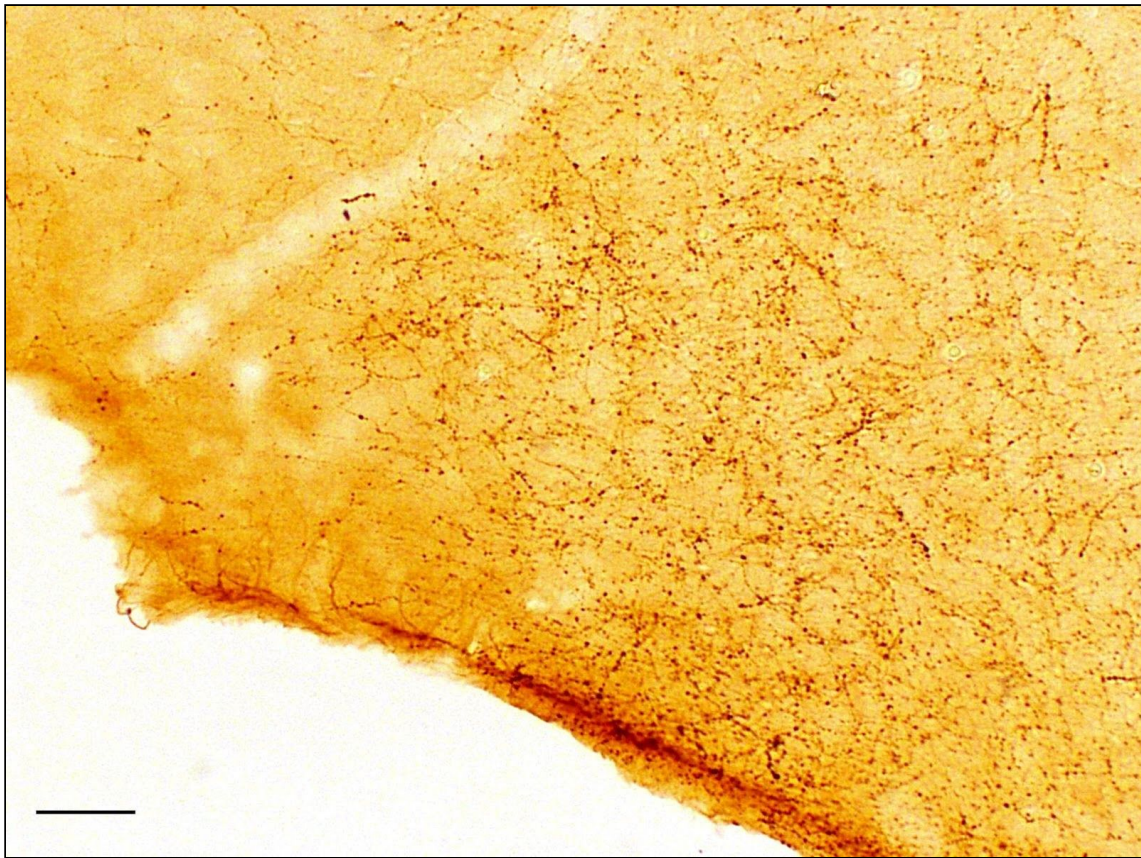


Figura 3. **Detalle de las fibras MChérgicas en el VLPO de rata hembra lactante con delimitación:** Microfotografías representativas del área ventrolateral del preóptica de ratas hembras lactantes. Barras de calibración: A: 100  $\mu\text{m}$  B: 50  $\mu\text{m}$ .





**Fig 4-Detalle de las fibras MCHérgicas en el VLPO de rata hembra lactante:** Microfotografías representativas del área ventrolateral del preóptica de ratas hembras lactantes. En A y B se puede observar una mayor densidad de fibras MCHérgicas del VLPO, en relación a sus zonas adyacentes. C: Detalles de las fibras MCHérgicas del VLPO. Barras de calibración: A: 100  $\mu\text{m}$  B, C: 50  $\mu\text{m}$ .

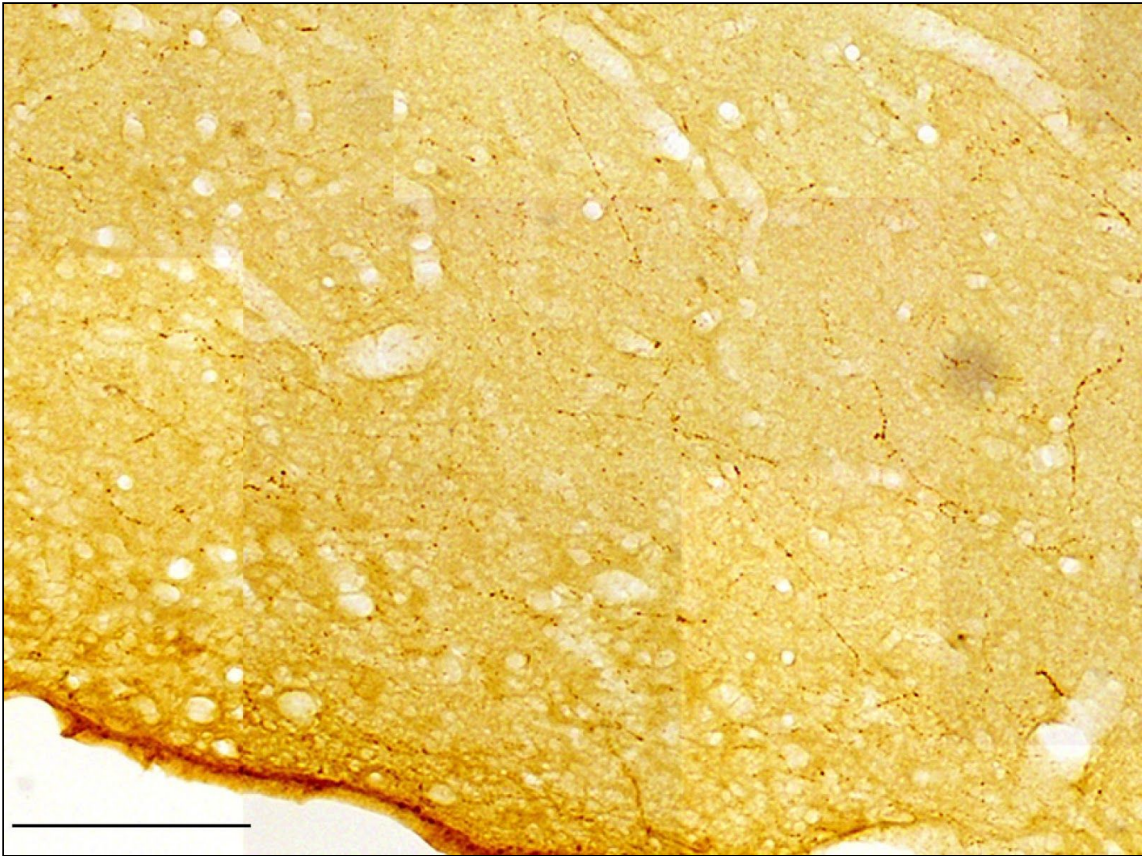


**Figura 5- Detalle de las fibras MCHérgicas en el núcleo ventrolateral del área preóptica de rata macho.**  
Microfotografía representativa del VLPO de rata macho. Barra de calibración: 50  $\mu$ m.

### **6.3. VLPO en gatos**

Las diferencias en la distribución de las fibras MCHérgicas en el POA de cerebro de gato es menos clara que en la rata (Tabla 2). Se ve una distribución difusa de estas fibras, con leve aumento de su densidad en algunas regiones, sin que la inervación MCHérgica ponga en evidencia la diferencia entre distintos núcleos ( Figura 2).





**Figura 6-** Detalle de las fibras MCHérgicas de la región correspondiente al VLPO de gato. Microfotografía representativa del VLPO de gato. Barra de calibración: 50  $\mu$ m.

Tanto en la cámara lúcida como en las microfotografías correspondientes al VLPO de gato, puede observarse que las fibras MCHérgicas se encuentran dispersas, que no delimitan un área o núcleo en particular, como sí sucede en la rata (Figura 2 y 6).

## 7. Discusión

### 7.1. VLPO en ratas

Logramos evidenciar cualitativamente la densidad de las fibras MCHérgicas presentes en el VLPO de la rata, tanto en machos como en hembras lactantes. En relación a esto, Bittencourt y col (1992), realizaron una caracterización inmunohistoquímica de la hormona MCH en el cerebro de rata (Bittencourt y col., 1992), donde se evaluó la abundancia relativa de las fibras MCHérgicas en las distintas regiones del cerebro de este animal. Sin embargo, con respecto al POA evaluaron al MnPO (+), mPOA (++) y al área preóptica lateral (+++), y no al VLPO, ya que dicho núcleo fue caracterizado posteriormente (1996) a los experimentos de Bittencourt (1992).

Nuestros resultados no evidencian una completa ausencia de tinción en ninguno de los núcleos estudiados. Estos datos coinciden con los de Bittencourt (1992) en el MnPO, ya que se muestran como zona de mayor dispersión (menos densidad de fibras; representado como “+” en ambas investigaciones), y en el mPOA, que muestra un leve aumento de las fibras (++)). Sin embargo, se observa un notorio aumento de la densidad de fibras MCHérgicas en el VLPO con respecto a sus zonas adyacentes (+++++).

Existe una investigación previa (Murray y col., 2006) que muestra en sus resultados una imagen del POA con inmunofluorescencia para MCH, donde se observa claramente el VLPO, de una manera muy similar a lo encontrado en nuestros resultados. Aparece un núcleo claro, con una densidad de fibras MCHérgicas diferencial con respecto a las áreas adyacentes. Sin embargo, dicho resultado no es discutido ni mencionado por los investigadores, ni en trabajos posteriores. Es por lo que este trabajo sería el primero en proponer una delimitación precisa del VLPO.

#### ***¿Cómo representar al VLPO?***

Distintos investigadores han utilizado cuadros de conteo para la cuantificación de neuronas en el VLPO (Sherin y col., 1996; Gong y col., 2000; Gaus y col., 2002; Chou



y col., 2002; Lu y col., 2002; Deurveilher y col., 2002; 2006; Modirruosta y col., 2004; Gallopin y col., 2004; Peterfi y col., 2010; Scammell y col., 2001). Esto ha hecho que las representaciones de esta área sean muy variables de un grupo de investigación a otro (Tabla 1), con diferencias en forma, tamaño, y en consecuencia algunas diferencias en su localización, inclusive dentro de una misma especie.

Sin embargo, en este trabajo proponemos una delimitación estructural, tanto para ratas machos como para hembras lactantes. La elección de las hembras lactantes se debió a las diferencias anatomofuncionales que las hembras experimentan en este período. Tanto el sueño como la maternidad son comportamientos fundamentales para la supervivencia del individuo y la especie, por lo que es de sumo interés el estudio de áreas cerebrales involucradas en estos comportamientos. Con la evidencia de que existen cambios en varios circuitos de áreas críticas para la generación de sueño, como es el POA (Pereira y Morrell, 2009; Rondini y col., 2010; Benedetto y col., 2018), pensamos que podrían existir variaciones en relación al presente estudio, en cuanto a la delimitación de un núcleo localizado dentro de esta área. Sin embargo, no encontramos diferencias estructurales con respecto a los cerebros de rata macho.

### ***Técnicas para la identificación***

Como se ha mencionado antes, el VLPO fue originalmente descrito como una zona que se activaba durante las horas de luz de la rata (noche subjetiva), utilizando la proteína *Fos* como índice de actividad neuronal (Sherin y col., 1996). Algunos años después, con el fin de ampliar la identificación del VLPO en otras especies de mamíferos, incluido los humanos, Gaus propone al neuropéptido galanina como un marcador químico útil para células activas durante el sueño en el VLPO (Gaus y col., 2002). Sin embargo, la inmunolocalización de la galanina por inmunohistoquímica requiere un tratamiento previo con colchicina para para bloquear el transporte axonal (Sherin y col., 1998), el cual puede, por sí mismo, activar la expresión de galanina (Ceccatelli y col., 1989; Cortes y col., 1990; Pu y col., 1999), y alterar el sueño normal.

Tanto la proteína *Fos* como del neuropéptido galanina, utilizados como delimitadores de un núcleo, implican finalmente la realización de un cuadro de conteo

de las neuronas activas en el área a identificar. Como se comentó previamente, esta delimitación artificial a partir de los cuadros de conteo no parece ser la más adecuada, ya que en la diversidad de trabajos que se ha realizado en el VLPO, la mayoría tiene resultados distintos, dando formas, tamaños y hasta posiciones diferentes. Así, este trabajo propone una delimitación histológica, dada por un marcador neuroquímico que evidencia un entramado de fibras, que sólo por su organización estructural parecen delimitar el núcleo. Debido a esto, y a las evidencias que vinculan a la MCH y el sueño, se propone que la presencia de las fibras MCHérgicas son un buen y preciso marcador para la delimitación del VLPO, núcleo clave en el sueño NREM.

## **7.2. VLPO en gatos**

En el caso del gato, se ve una distribución difusa de las fibras MCHérgicas en el área preóptica. Puede observarse una distribución levemente diferencial de las fibras en los diferentes núcleos estudiados (MnPO, mPOA, VLPO), pero sin evidenciar núcleos estructurales claros. Con respecto al VLPO, parece existir un leve aumento de la densidad de las fibras con respecto al núcleo mPOA, pero no existe una distinción clara con sus zonas adyacentes, lo que impide su delimitación a partir de esta metodología.

Nuestros resultados muestran diferencias entre las especies estudiadas. Las fibras MCHérgicas para la delimitación del VLPO utilizando en gato no parece ser la herramienta adecuada, ya que no evidencia un núcleo claro y preciso. Los límites del VLPO en el gato podrían ser más difusos en comparación con la rata. En este sentido, existen evidencias previas de que las neuronas de sueño y vigilia en dicho animal estarían organizadas de manera difusa y los núcleos estarían menos delimitados (Szymusiak y col., 1998, 1989). Torterolo y col. (2009) trabajando con neuronas Fos positivas en el área correspondiente al VLPO en gato, vieron que éstas se encontraban dispersas, sin formar un grupo, como sí sucede en la rata (Sherin y col., 1996; Szymusiak y col., 1998, Torterolo y col., 2009). Esto no sería único del POA, sino que iría en concordancia con la situación que vieron Jones y Beaudet (1987) en otras áreas del cerebro, como en el área mesopontina del tronco cerebral, donde las neuronas colinérgicas, que son críticas para la generación de sueño REM, están anatómicamente

separadas de las neuronas noradrenérgicas que promueven la vigilia en rata, y relativamente entremezclados en el gato.

### **7.3 Importancia en la Biología Humana**

Los resultados obtenidos contribuyen a ampliar el conocimiento de la neurobiología del sueño y del sistema MCHérgico. Creemos que es sumamente importante poder fortalecer las investigaciones que permitan estudiar en forma rigurosa y detallada las bases neurobiológicas del sueño, incluyendo las áreas cerebrales comprometidas. Este conocimiento es base para el estudio de las alteraciones de sueño, así como los efectos de distintos tratamientos farmacológicos.

A su vez, el sistema MCHérgico está vinculado no sólo al ciclo sueño-vigilia, sino también a la ingesta, el balance energético, la lactancia, los estado de ánimo, la depresión. Conocer las bases de este sistema, es crítico para profundizar en el conocimiento de muchos estados y comportamientos que hacen a la biología humana y aportan al estudio de patologías de gran prevalencia en nuestra sociedad.

## **8. Conclusión**

A partir de las fibras MCHérgicas se logra delimitar estructuralmente al núcleo VLPO en ratas, tanto en hembras lactantes como machos. Para lograr delimitar dicho núcleo en el gato se deberá continuar investigando otras técnicas.

## **9. Perspectivas**

A futuro, sería interesante fortalecer los resultados de esta investigación, por ejemplo, aumentando el número de experimentos realizados, y homogeneizando la cantidad de animales de experimentación en cada grupo (especie y género). Además, podría ampliarse el estudio a otras cepas de ratas, estudiando la cepa Sprague Dawley.

A su vez, nos parece interesante realizar experimentos inmunohistoquímicos de Fos-MCH, para evaluar la co-localización de estos marcadores, y así evaluar en una

misma muestra ambos modos de delimitación del VLPO.

Otra perspectiva a futuro, es la indagación de posibles nuevas técnicas que permitan la delimitación precisa del núcleo VLPO en gatos.

## 10. Bibliografía

-Alam MN, McGinty D, Szymusiak R (1995) Neuronal discharge of preoptic/anterior hypothalamic thermosensitive neurons: relation to NREM sleep. *Am J Physiol* 269:R1240–R1249.

-Basner, M., Rao, H., Goel, N., & Dinges, D. F. (2013). Sleep deprivation and neurobehavioral dynamics. *Current opinion in neurobiology*, 23(5), 854-863.

-Benedetto, L., Chase, M. H., & Torterolo, P. (2012). GABAergic processes within the median preoptic nucleus promote NREM sleep. *Behavioural brain research*, 232(1), 60-65.

-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, 11-15.

-Benedetto, L., Torterolo, P., & Ferreira, A. (2018). Melanin-concentrating hormone: Role in nursing and sleep in mother rats. In *Melanin-Concentrating Hormone and Sleep* (pp. 149-170). Springer, Cham.

-Bittencourt, J. C., Presse, F., Arias, C., Peto, C., Vaughan, J., Nahon, J. L., ...& Sawchenko, P. E. (1992). The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. *Journal of Comparative Neurology*, 319(2), 218-245.

-Boucetta, S., Cissé, 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. *Journal of Neuroscience*, 34(13), 4708-4727.

- Bridges, R. S. (2008). *Neurobiology of the parental brain*. Elsevier
- Brown, L. K. (2012). Can sleep deprivation studies explain why human adults sleep?. *Current opinion in pulmonary medicine*, 18(6), 541-545.
- Carskadon, M. A. (2005). Sleep and circadian rhythms in children and adolescents: relevance for athletic performance of young people. *Clinics in sports medicine*, 24(2), 319-328.
- Carskadon, M.A., & Dement, W.C. (2011). Monitoring and staging human sleep. In M.H. Kryger, T. Roth, & W.C. Dement (Eds.), *Principles and practice of sleep medicine*, 5th edition, (pp 16-26). St. Louis: Elsevier Saunders.
- Chase, M. H. (2013). Motor control during sleep and wakefulness: clarifying controversies and resolving paradoxes. *Sleep Medicine Reviews*, 17(4), 299-312.
- Ceccatelli, S., Eriksson, M., & Hökfelt, T. (1989). Distribution and coexistence of corticotropin-releasing factor-, neurotensin-, enkephalin-, cholecystokinin-, galanin- and vasoactive intestinal polypeptide/peptide histidine isoleucine-like peptides in the parvocellular part of the paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology*, 49(3), 309-323.
- Cerri, M., Ocampo-Garces, A., Amici, R., Baracchi, F., Capitani, P., Jones, C. A., ... & Zamboni, G. (2005). Cold exposure and sleep in the rat: effects on sleep architecture and the electroencephalogram. *Sleep*, 28(6), 694-705.
- Cirelli, C., Pompeiano, M. and Tononi, G. (1995), Sleep deprivation and c-fos expression in the rat brain. *Journal of Sleep Research*, 4: 92-106.

-Cirelli, C., & Tononi, G. (2000). Gene expression in the brain across the sleep–waking cycle. *Brain research*, 885(2), 303-321.

-Cortes, R., Villar, M. J., Verhofstad, A., & Hökfelt, T. (1990). Effects of central nervous system lesions on the expression of galanin: a comparative in situ hybridization and immunohistochemical study. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(19), 7742-7746.

-Deurveilher, S., Burns, J., & Semba, K. (2002). Indirect projections from the suprachiasmatic nucleus to the ventrolateral preoptic nucleus: a dual tract-tracing study in rat. *European Journal of Neuroscience*, 16(7), 1195-1213.

-Deurveilher, S., & Semba, K. (2006). Mapping sleep-wake control with the transcription factor c-Fos. In *Immediate early genes in sensory processing, cognitive performance and neurological disorders* (pp. 113-136). Springer, Boston, MA.

- Dragunow, M., Faull, R., (1989). The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. *J. Neurosci. Methods* 29, 261–265.

-Economo, C. V. (1930). Sleep as a problem of localization. *The Journal of Nervous and Mental Disease*, 71(3), 249-259.

-Eguchi, K., & Satoh, T. (1980). Convergence of sleep–wakefulness subsystems onto single neurons in the region of cat's solitary tract nucleus. *Archives Italiennes de biologie*.

-Forray, C. (2003). The MCH receptor family: feeding brain disorders? *Current opinion in pharmacology*, 3(1), 85-89.

-Gallopín, T., Luppi, P. H., Rambert, F. A., Frydman, A., & Fort, P. (2004). Effect of the wake-promoting agent modafinil on sleep-promoting neurons from the

ventrolateral preoptic nucleus: an in vitro pharmacologic study. *Sleep*, 27(1), 19-25.

-Gaus, S. E., Strecker, R. E., Tate, B. A., Parker, R. A., & Saper, C. B. (2002). Ventrolateral preoptic nucleus contains sleep-active, galaninergic neurons in multiple mammalian species. *Neuroscience*, 115(1), 285-294.

-Gong, H., McGinty, D., Guzman-Marin, R., Chew, K. T., Stewart, D., & Szymusiak, R. (2004). Activation of c-fos in GABAergic neurones in the preoptic area during sleep and in response to sleep deprivation. *The Journal of physiology*, 556(3), 935-946.

-Gvilia, I., Turner, A., McGinty, D., & Szymusiak, R. (2006). Preoptic area neurons and the homeostatic regulation of rapid eye movement sleep. *The Journal of neuroscience*, 26(11), 3037-3044.

-Gvilia, I., Xu, F., McGinty, D., & Szymusiak, R. (2006). Homeostatic regulation of sleep: a role for preoptic area neurons. *The Journal of neuroscience*, 26(37), 9426-9433.

- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(7), 2418-2422.

-Héricé, C., Patel, A. A., & Sakata, S. (2019). Circuit mechanisms and computational models of REM sleep. *Neuroscience research*, 140, 77-92.

-Iranzo, A. (2018). The REM sleep circuit and how its impairment leads to REM sleep behavior disorder. *Cell and tissue research*, 373(1), 245-266.



-Irwin, M. R., & Opp, M. R. (2017). Sleep health: reciprocal regulation of sleep and innate immunity. *Neuropsychopharmacology*, 42(1), 129-155.

-Joiner, W. J. (2016). Unraveling the evolutionary determinants of sleep. *Current biology*, 26(20), R1073-R1087.

-Jones, B.E., Beaudet, A., (1987). Distribution of acetylcholine and catecholamine neurons in the cat brainstem: a choline acetyltransferase and tyrosine hydroxylase immunohistochemical study. *J. Comp. Neurol.* 261, 15–32.

-Knollema, S., Brown, E. R., Vale, W., & Sawchenko, P. E. (1992). Novel hypothalamic and preoptic sites of prepro-melanin-concentrating hormone messenger ribonucleic acid and peptide expression in lactating rats. *Journal of neuroendocrinology*, 4(6), 709-717.

-Kawauchi, H., Kawazoe, I., Tsubokawa, M., Kishida, M., & Baker, B. I. (1983). Characterization of melanin-concentrating hormone in chum salmon pituitaries.

-Lagos, P., Torterolo, P., Jantos, H., Chase, M. H., & Monti, J. M. (2009). Effects on sleep of melanin-concentrating hormone (MCH) microinjections into the dorsal raphe nucleus. *Brain research*, 1265, 103-110.

-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 sciences*, 90(23-24), 895-899.

-Lu, J., Greco, M. A., Shiromani, P., & Saper, C. B. (2000). Effect of lesions of the ventrolateral preoptic nucleus on NREM and REM sleep. *Journal of Neuroscience*, 20(10), 3830-3842.

-Luppi PH; Peyron C; Fort P. Role of MCH neurons in paradoxical (REM) sleep control. *SLEEP* 2013;36(12):1775-1776.

-McGregor R, Damian A, Fabbiani G, Torterolo P, Pose I, Chase M, et al. Direct hypothalamic innervation of the trigeminal motor nucleus: a retrograde tracer study. *Neuroscience* 2005; 136: 1073-81.

-Modirrousta, M., Mainville, L., & Jones, B. E. (2004). Gabaergic neurons with  $\alpha 2$ -adrenergic receptors in basal forebrain and preoptic area express c-Fos during sleep. *Neuroscience*, 129(3), 803-810.

-Monti, J. M. (2010). The structure of the dorsal raphe nucleus and its relevance to the regulation of sleep and wakefulness. *Sleep medicine reviews*, 14(5), 307-317.

-Monti, J. M., Torterolo, P., & Lagos, P. (2013). Melanin-concentrating hormone control of sleep–wake behavior. *Sleep medicine reviews*, 17(4), 293-298.

-Monti, J. M., Lagos, P., Jantos, H., & Torterolo, P. (2015). Increased REM sleep after intra-locus coeruleus nucleus microinjection of melanin-concentrating hormone (MCH) in the rat. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 56, 185-188.

-Monti, J. M., Torterolo, P., Jantos, H., & Lagos, P. (2016). Microinjection of the melanin-concentrating hormone into the sublaterodorsal tegmental nucleus inhibits REM sleep in the rat. *Neuroscience letters*, 630, 66-69.

-Morgan, J.I., Curran, T., (1991). Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible protooncogenes fos and jun. *Annu. Rev. Neurosci.* 14, 421–451.

-Moruzzi, G., & Magoun, H. W. (1949). Brain stem reticular formation and activation of the EEG. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*, 1(1-4), 455-473.

-Murray, J. F., Hahn, J. D., Kennedy, A. R., Small, C. J., Bloom, S. R., Haskell-Luevano, C., ... & Wilson, C. A. (2006). Evidence for a Stimulatory Action of Melanin-Concentrating Hormone on Luteinising Hormone Release Involving MCH1 and Melanocortin-5 Receptors. *Journal of neuroendocrinology*, 18(3), 157-167.

-Peever, J., & Fuller, P. M. (2017). The biology of REM sleep. *Current biology*, 27(22), R1237-R1248.

-Pereira, M., & Morrell, J. I. (2009). The changing role of the medial preoptic area in the regulation of maternal behavior across the postpartum period: facilitation followed by inhibition. *Behavioural brain research*, 205(1), 238-248.

-Peterfi, Z., McGinty, D., Sarai, E., & Szymusiak, R. (2010). Growth hormone-releasing hormone activates sleep regulatory neurons of the rat preoptic hypothalamus. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 298(1), R147-R156.

-Peyron, C., Sapin, E., Leger, L., Luppi, P. H., & Fort, P. (2009). Role of the melanin-concentrating hormone neuropeptide in sleep regulation. *Peptides*, 30(11), 2052-2059.

-Pu, S., Dube, M. G., Edwards, T. G., Kalra, S. P., & Kalra, P. S. (1999). Disruption of neural signaling within the hypothalamic ventromedial nucleus upregulates galanin gene expression in association with hyperphagia: an in situ hybridization analysis. *Molecular brain research*, 64(1), 85-91.

-Rondini, T. A., Donato Jr, J., de Crudis Rodrigues, B., Bittencourt, J. C., & Elias, C. F. (2010). Chemical identity and connections of medial preoptic area neurons expressing melanin-concentrating hormone during lactation. *Journal of chemical neuroanatomy*, 39(1), 51-62.

-Saper, C. B., Scammell, T. E., & Lu, J. (2005). Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature*, 437(7063), 1257-1263.

-Scammell, T. E., Gerashchenko, D. Y., Mochizuki, T., McCarthy, M. T., Estabrooke, I. V., Sears, C. A., ... & Hayaishi, O. (2001). An adenosine A2a agonist increases sleep and induces Fos in ventrolateral preoptic neurons. *Neuroscience*, 107(4), 653-663.

-Sherin, J. E., Shiromani, P. J., McCarley, R. W., & Saper, C. B. (1996). Activation of ventrolateral preoptic neurons during sleep. *Science*, 271(5246), 216-219.

-Sherin, J. E., Elmquist, J. K., Torrealba, F., & Saper, C. B. (1998). Innervation of histaminergic tuberomammillary neurons by GABAergic and galaninergic neurons in the ventrolateral preoptic nucleus of the rat. *Journal of Neuroscience*, 18(12), 4705-4721.

-Shi, Y. (2004). Beyond skin color: emerging roles of melanin-concentrating hormone in energy homeostasis and other physiological functions. *Peptides*, 25(10), 1605-1611.

- Shiromani, P. J., Scammell, T., Sherin, J. E., & Saper, C. B. (1999). Hypothalamic regulation of sleep. *Handbook of Behavioral State Control: Cellular and Molecular Mechanisms*. CRC Press, Boca Raton, FL, 311-325.

-Siegel J. M. (2011). REM sleep, in *Principles and Practices of Sleep Medicine*,

eds Kryger M. H., Roth T., Dement W. C. (Philadelphia: Elsevier-Saunders; ), 92–111.

- Skofitsch, G., Jacobowitz, D. M., & Zamir, N. (1985). Immunohistochemical localization of a melanin concentrating hormone-like peptide in the rat brain. *Brain research bulletin*, 15(6), 635-649.

-Suntsova, N., Guzman-Marin, R., Kumar, S., Alam, M. N., Szymusiak, R., & McGinty, D. (2007). The median preoptic nucleus reciprocally modulates activity of arousal-related and sleep-related neurons in the perifornical lateral hypothalamus. *The Journal of neuroscience*, 27(7), 1616-1630.

-Swanson, L. W., 1987. The hypothalamus, in: H. T. Bjorklund A, Swanson L (Ed.), *Handbook of Chemical Neuroanatomy*. Elsevier, Amsterdam, pp. 1-124.

-Szymusiak, R., & McGinty, D. (1989). Effects of basal forebrain stimulation on the waking discharge of neurons in the midbrain reticular formation of cats. *Brain research*, 498(2), 355-359.

-Szymusiak, R., Alam, N., Steininger, T. L., & McGinty, D. (1998). Sleep–waking discharge patterns of ventrolateral preoptic/anterior hypothalamic neurons in rats. *Brain research*, 803(1), 178-188.

-Tan, C. P., Sano, H., Iwaasa, H., Pan, J., Sailer, A. W., Hreniuk, D. L., ... & Austin, C. P. (2002). Melanin-concentrating hormone receptor subtypes 1 and 2: species-specific gene expression. *Genomics*, 79(6), 785-792.

-Tobaldini, E., Costantino, G., Solbiati, M., Cogliati, C., Kara, T., Nobili, L., & Montano, N. (2017). Sleep, sleep deprivation, autonomic nervous system and cardiovascular diseases. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 74, 321-329.

-Torterolo, P., Rojas, M., Sampogna, S., Morales, F. R., & Chase, M. H. (2003). MCH-containing neurons and the control of sleep and wakefulness. *Sleep* 26, A20.

-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 research*, 1119(1), 101-114.

-Torterolo, P., Benedetto, L., Lagos, P., Sampogna, S., & Chase, M. H. (2009). State-dependent pattern of Fos protein expression in regionally-specific sites within the preoptic area of the cat. *Brain research*, 1267, 44-56.

-Torterolo, P., Sampogna, S., & Chase, M. H. (2009b). MCHergic projections to the nucleus pontis oralis participate in the control of active (REM) sleep. *Brain research*, 1268, 76-87.

-Torterolo, P., & Vanini, G. (2010). New concepts in relation to generating and maintaining arousal. *Revista de neurologia*, 50(12), 747-758.

-Torterolo, P., Lagos, P., & Monti, J. M. (2011). Melanin-concentrating hormone: a new sleep factor? *Frontiers in neurology*, 2.

-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 research*, 1491, 68-77.

-Torterolo, P., Scorza, C., Lagos, P., Urbanavicius, J., Benedetto, L., Pascovich, C., ... & Monti, J. M. (2015). Melanin-concentrating hormone (MCH): role in REM sleep and depression. *Frontiers in neuroscience*, 9, 475.

- Verret, L., Goutagny, R., Fort, P., Cagnon, L., Salvert, D., Léger, L., ...&Luppi, P.

H. (2003). A role of melanin-concentrating hormone producing neurons in the central regulation of paradoxical sleep. *BMC neuroscience*, 4(1), 19.

-Walker, WH , Borniger, J. C. (2019). Molecular Mechanisms of Cancer-Induced Sleep Disruption. *International journal of molecular sciences*, 20(11)

-Yamuy, J., Mancillas, J.R., Morales, F.R., Chase, M.H., 1993. C-fos expression in the pons and medulla of the cat during carbachol-induced active sleep. *J. Neurosci.* 13, 2703–2718.