

Universidad de la República  
Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas  
Área Biología- Subárea Neurociencias

Tesis para acceder al Doctorado en Ciencias Biológicas,  
Subárea Neurociencias

**Estudio del papel de las hipocretinas en comportamientos operantes motivados por recompensa o aversión en diferentes fases del ciclo circadiano**

MSc. Ronald Mc Gregor

University of California, Los Angeles  
Department of Psychiatry, School of Medicine  
Center for Sleep Research, Neurobiology Research 151A3  
VA GLAHS-Sepúlveda

Orientador:

Prof. Dr. Jerome Siegel

Co-orientador:

Dra. María Cecilia Scorza

# Índice

I- Abreviaciones y términos utilizados.....	6
1- Resumen.....	11
2- Introducción.....	12
2.1- Breve perspectiva histórica.....	12
2.2- Hipocretinas: péptidos, receptores y neuronas.....	13
2.2.1- <i>Péptidos</i> .....	13
2.2.2- <i>Receptores</i> .....	15
2.2.3- <i>Distribución de los receptores para hipocretinas</i> .....	16
2.2.4- <i>Señalización celular de las hipocretinas</i> .....	17
2.2.5- <i>Neuronas hipocretinérgicas</i> .....	19
2.2.6- <i>Proyecciones ascendentes y descendentes de las neuronas hipocretinérgicas</i> .....	23
2.3- Efectos fisiológicos de las hipocretinas.....	24
2.3.1- <i>Participación en la regulación del sueño y la vigilia</i> .....	24
2.3.2- <i>Narcolepsia</i> .....	26
2.3.3- <i>Variación circadiana</i> .....	27
2.3.4- <i>Procesamiento de recompensas o aversión</i> .....	28
2.3.5- <i>Hipocretinas y alimentación</i> .....	31
3- Hipótesis general.....	34
3.1- Hipótesis específica.....	34

4- Objetivo general.....	35
4.1- Objetivos específicos.....	35
5- Metodología.....	36
5.1- Sujetos experimentales.....	36
5.2- Dispositivos experimentales.....	37
5.2.1- Cámaras operantes.....	37
5.3- Cuantificación del consumo de alimento.....	38
5.4- Cuantificación del consumo de agua.....	38
5.5- Procedimientos quirúrgicos.....	39
5.6- Registro del EEG y EMG.....	39
5.7- Entrenamiento comportamental.....	40
5.7.1- <i>Comportamientos operantes</i> .....	40
5.7.1.1- <i>Refuerzo positivo, recompensa: alimento</i> .....	40
5.7.1.2- <i>Refuerzo positivo, recompensa: agua</i> .....	42
5.7.1.3- <i>Refuerzo negativo, choque eléctrico</i> .....	42
5.7.2- <i>Comportamientos no operantes</i> .....	44
5.7.2.1- <i>Control cámara operante</i> .....	44
5.7.2.2- <i>Recompensa de alimento esperada y no esperada</i> .....	45
5.7.2.3- <i>Choque eléctrico no evitable</i> .....	45
5.8- Técnicas inmunohistoquímicas.....	46
5.8.1- <i>Procesamiento del tejido</i> .....	46
5.8.2- <i>Paradigmas comportamentales; grupos experimentales</i> .....	47
5.9- Cuantificación del número de células.....	48
5.10- Análisis de datos.....	49

6-	Resultados.....	52
6.1-	Recompensa positiva, animales WT vs KO PPH.....	52
6.1.1-	<i>Tarea operante para la obtención de una recompensa de alimento.....</i>	52
6.1.2-	<i>Registro del EEG y EMG durante diferentes tareas comportamentales.....</i>	57
6.1.3-	<i>Efecto del incremento en la motivación sobre la tarea operante para la obtención de una recompensa de alimento.....</i>	59
6.1.4-	<i>Tarea operante para la obtención de una recompensa de agua.....</i>	61
6.2-	Refuerzo negativo animales WT vs KO PPH.....	63
6.3-	Estudios histológicos utilizando Fos en los animales WT.....	65
6.3.1-	<i>Tareas operantes durante la fase diurna y nocturna.....</i>	65
6.3.2-	<i>Suministro de alimento sin contingencia con el comportamiento operante.....</i>	70
6.3.3-	<i>Contexto aversivo durante la fase diurna y nocturna.....</i>	71
6.3.4-	<i>Papel de la luz.....</i>	72
6.3.5-	<i>Expresión de Fos en las neuronas hipocretinérgicas laterales vs mediales.....</i>	72
7-	Discusión.....	75
7.1-	Consideraciones metodológicas previas.....	75
7.1.1-	<i>Anticuerpos.....</i>	75
7.1.2-	<i>Fos como marcador de actividad neuronal.....</i>	75
7.1.3-	<i>Animales KO PPH.....</i>	76
7.1.4-	<i>Expresión de Fos en neuronas hipocretinérgicas mediales y laterales.....</i>	76

7.2-	Rol comportamental de las hipocretinas.....	77
7.2.1-	<i>Emociones positivas</i> .....	77
7.2.2-	<i>Sistemas promotores de la vigilia</i> .....	79
7.2.3-	<i>Ciclo circadiano</i> .....	82
7.3-	Conclusiones.....	84
8-	Sistema Hcrtérgico, perspectivas y avances recientes.....	85
8.1-	Perspectivas.....	85
8.1.1-	<i>Sistemas promotores de la vigilia</i> .....	85
8.1.2-	<i>Registro de unidades Hcrtérgicas identificadas</i> .....	85
8.1.3-	<i>Número de neuronas Hcrtérgicas</i> .....	87
8.2 -	Avances recientes	
8.2.1-	<i>Aumento en el número de neuronas Hcrtérgicas</i> .....	90
8.3-	Morfina, hipocretinas y narcolepsia.....	97
9-	Apéndice.....	100
10-	Bibliografía .....	101

## I- Abreviaciones y términos utilizados

5HT; serotonina

5HTérgica, neurona o transmisión serotoninérgica

AA; amino ácido

ABC; complejo avidina-biotina

AC; adenilato ciclasa

ACe; núcleo central de la amígdala

Ach; acetilcolina

AHA; área hipotalámica anterior

AMPA; receptores  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-metil-4-isoxazoleopropionico acido

AmCx; corteza de la amígdala

AP; antero-posterior

Arc; núcleo arcuato

ASWS; sueño de ondas lentas con asimetría interhemisférica

BFS; solución tampón fosfato salina (0.1 M, 0.9 % NaCl).

BFST; solución tampón fosfato salina con 0.3 % Tritón-X

BFST; 0.5%; solución tampón fosfato salina con 0.5 % Tritón-X

BNST; núcleo basal de la estría terminal

BSA; albumina de suero bovino.

Ca<sup>++</sup>; ion de calcio

[Ca<sup>++</sup>]<sub>i</sub>; concentración de calcio intracelular

CB1; receptores para canabinoides tipo 1

cDNA; ácido desoxirribonucleico complementario

CPSE; Corriente post sináptica excitatoria

d; día

DAérgica; neurona productora de dopamina

DAB; tetrahydrocloridrato de diaminobencidina

DMH; hipotálamo dorsomedial

DOX; doxiciclina

DR; núcleo dorsal del rafe

EC<sub>50</sub>; concentración efectiva máxima media

EDS; excesiva somnolencia diurna

EEG; electroencefalograma

EMG; electromiograma

ERK; quinasas activadas por señal extracelular

Fos<sup>+</sup>/Hcrt<sup>+</sup>; neuronas doble inmunopositivas para Hcrt y Fos

GAR; anticuerpo secundario anti conejo generado en cabra

GPCR; receptores acoplados a proteína G

Hcrt<sub>s</sub>; hipocretinas

Hcrt<sup>+</sup>; neurona inmunopositiva para hipocretina

Hcrt-1; hipocretina-1

Hcrt-2; hipocretina-2

HDC; enzima histidina decarboxylasa

Hcrtérgicas; neuronas hipocretinérgicas

HcrtRs; receptores para Hcrts

HcrtR-1; receptor para hipocretina tipo 1

HcrtR-2; receptor para hipocretina tipo 2

His; histamina

Hcrt-tTA; ratones que expresan la proteína tetraciclina transactivadora (tTA) bajo el control del promotor PPH.

IC<sub>50</sub>; concentración inhibitoria máxima mínima

icv; intra cerebro ventricular

IF; intervalo fijo

IHQ, inmunohistoquímica

i.p.; administración intraperitoneal

IV; intervalo variable

KO; animales knock out, animales con delección de uno o varios genes específicos

KO HDC; animal genéticamente modificado en el cual se eliminó la expresión de enzima HDC

KO PPH; animal genéticamente modificado en el cual se eliminó la expresión de prepro-hipocretina

LC; *locus coeruleus*

LCR; líquido cefalorraquídeo

LDT; núcleo tegmental laterodorsal



LH; hipotálamo lateral

MAPK; proteína quinasa activada por mitógenos

MCH; hormona concentradora de melanina.

MPO; área preóptica mediana

mRNA PPH; mRNA que codifica para el péptido preprohipocretina

mRNA HcrtR-1; mRNA que codifica para el HcrtR-1

mRNA HcrtR-2; mRNA que codifica para el HcrtR-2

Na<sup>+</sup>; ión sodio

NA; noradrenalina

NAérgica; neurona productora de noradrenalina, señalización noradrenérgica

NAcc; núcleo accumbens

NGS; suero normal de cabra

NMDAR; receptores N-metil-D-aspartato

PF; Paraformaldehído

PFA; área perifornical

PKC; proteína quinasa C

PLA2; fosfolipasa A2

PLC; fosfolipasa C

PLD; fosfolipasa D

POA; área preóptica

PPH; péptido prepro-hipocretina

PPT; núcleo tegmental pedúnculo pontino

PQ; punto de quiebre

PR; Razón Progresiva

PVN; núcleo paraventricular del hipotálamo

SAPK; proteína quinasa activada por stress

s.c. sub cutáneo

SNC; sistema nervioso central

SQN; núcleo supra quiasmático

SSRI; Inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina

Sueño NREM; etapa del sueño sin movimientos oculares rápidos

Sueño REM; etapa del sueño de movimientos oculares rápidos

TMN; núcleo tuberomamilar

tTA; proteína tetraciclina transactivadora

VLPO; región preóptica ventrolateral

VMH; hipotálamo ventromedial

VTA; área tegmental ventral

WT; animal de cepa salvaje

## 1- Resumen

Las hipocretinas (hipocretina-1 e hipocretina-2) son neuropéptidos hipotalámicos formados por el clivaje selectivo de un único precursor, la preprohipocretina. Los cuerpos celulares de las neuronas productoras de hipocretinas se localizan exclusivamente en el hipotálamo y desde allí proyectan en forma difusa al resto del Sistema Nervioso Central. Fueron originalmente asociadas con la alimentación, aunque trabajos posteriores demostraron su vinculación a la regulación del ciclo sueño-vigilia y la narcolepsia, estableciéndolas como un sistema promotor de la vigilia. Sin embargo, el rol de las hipocretinas en el comportamiento normal de los animales permanece aún poco claro. Consecuentemente, nos propusimos examinar el papel de este sistema neuropeptidérgico en la modulación de diferentes comportamientos motivados. Conjeturamos que las neuronas hipocretinérgicas serían reclutadas para la ejecución de tareas que involucren la obtención de una recompensa positiva. Además, la activación de estas células estaría condicionada a la fase del ciclo circadiano en la cual se realice la tarea. Para realizar este estudio, utilizamos una selección de tareas comportamentales para comparar el rendimiento de animales salvajes y animales con falta de hipocretinas. Utilizamos además la detección de la proteína Fos para evaluar la activación de las neuronas hipocretinérgicas durante las diferentes tareas en animales salvajes.

Nuestros resultados muestran que los animales con ausencia de hipocretinas son incapaces de realizar una tarea comportamental para obtener una recompensa positiva (alimento o agua) durante la fase diurna. En cambio, durante la fase nocturna su rendimiento en la misma tarea comportamental es indistinguible de los animales salvajes. En éstos últimos el incremento en la expresión de la proteína Fos en las neuronas hipocretinérgicas se observó solamente durante la fase diurna mientras los animales trabajaban para obtener una recompensa positiva. La administración de un choque eléctrico o la expectativa de obtener una recompensa positiva, ambas situaciones que suponen un alto grado de vigilia, no provocaron un aumento significativo en la expresión de Fos en las neuronas hipocretinérgicas. Estos resultados muestran por primera vez un alto grado de especificidad en la función de un sistema promotor de la vigilia y aporta conocimientos originales acerca de la fisiología del sistema hipocretinérgico.

## 2- Introducción

### 2.1- Breve perspectiva histórica

Las hipocretinas (hipocertina-1 e hipocretina-2), fueron descritas simultáneamente por dos grupos de investigadores en 1998 (de Lecea et al., 1998; Sakurai et al., 1998). Basados en los resultados de sus propios trabajos cada grupo denominó a los nuevos péptidos con un nombre particular, a saber hipocretinas (de Lecea et al., 1998) y orexinas (Sakurai et al., 1998). La descripción simultánea de los péptidos con dos nombres distintos generó cierto grado de confusión en la literatura que aún persiste. En el presente trabajo se utilizarán los siguientes términos: hipocretinas (Hcrts) para referirse a los péptidos hipocretina-1 (Hcrt-1) e hipocretina-2 (Hcrt-2); receptor para hipocretinas (HcrtRs) tipo 1 (HcrtR-1) y tipo 2 (HcrtR-2); y prepro-hipocretina (PPH) para referirse al péptido precursor. Otros autores utilizan el término orexinas para referirse a los péptidos.

Los trabajos iniciales sugirieron que estos péptidos estaban vinculados a los procesos alimenticios (Sakurai et al., 1998). Sin embargo, trabajos subsecuentes demostrarían la estrecha relación entre estos péptidos, la regulación del ciclo sueño-vigilia y la narcolepsia (Chemelli et al., 1999; Gerashchenko et al., 2001; Beuckmann et al., 2004; Mieda et al., 2004; Fujiki et al., 2006; Hondo et al., 2010; Kalogiannis et al., 2011; Mieda et al., 2011). Las hipocretinas han sido además implicadas en una variedad de otros procesos fisiológicos entre los que se destacan el procesamiento de recompensas y el consumo de drogas de abuso (Harris et al., 2005; Narita et al., 2006; Hollander et al., 2008; Espana et al., 2010; Jupp et al., 2011b).

## 2.2- Hipocretinas: péptidos, receptores y neuronas

### 2.2.1- Péptidos

El gen prepro-hipocretina genera en el hipotálamo una molécula de mRNA prepro-hipocretina que se traduce en un péptido precursor denominado PPH. El clivaje selectivo de una molécula de PPH genera una molécula de Hcrt-1 y una molécula de Hcrt-2. La Hcrt-1 está compuesta de 33 AAs, presenta dos puentes disulfúricos, amidación en el extremo C-terminal y un residuo pyroglutamil en el extremo N-terminal (Fig. 1a) (Sakurai et al., 1998). Su estructura primaria pronosticada a partir de las secuencias de DNA complementario (cDNA) se halla completamente conservada entre varias especies de mamíferos (humanos, ratas, ratones, perros, bovinos, ovinos y suninos) (Fig. 1a) indicando permanencia evolutiva. La Hcrt-2 está compuesta por 28 AAs con amidación en el extremo C-terminal y presenta 46 % de homología en su secuencia (13/28 AAs) con la Hcrt-1 (Fig. 1a). La secuencia de la Hcrt-2 también se halla conservada entre diferentes especies, aunque en menor grado que la Hcrt-1 (Fig. 1a) (Sakurai et al., 1998; Shibahara et al., 1999; Alvarez and Sutcliffe, 2002; Sakurai et al., 2005). Los péptidos son producto de diferentes sectores de la molécula precursora (PPH) (Fig. 1b), a pesar de lo cual ha sido propuesto que el origen de la Hcrt-1 y la Hcrt-2 es el resultado de la duplicación de una misma secuencia (Alvarez and Sutcliffe, 2002).

La Hcrt-1 es más lipofílica y presenta mayor estabilidad tanto en sangre como en el líquido cefalorraquídeo (LCR) comparada con la Hcrt-2 (Kastin and Akerstrom, 1999). Sin embargo, han sido reportados mayores niveles de Hcrt-2 (2 a 5 veces) en diferentes regiones del Sistema Nervioso Central (SNC) (Mondal et al., 1999b; Mondal et al., 1999a; Date et al., 2000a; Date et al., 2000b). El pasaje de estos péptidos a través de la barrera hematoencefálica es aún tema de controversia en la literatura (Kastin and Akerstrom, 1999; Bingham et al., 2001; Fujiki et al., 2003).

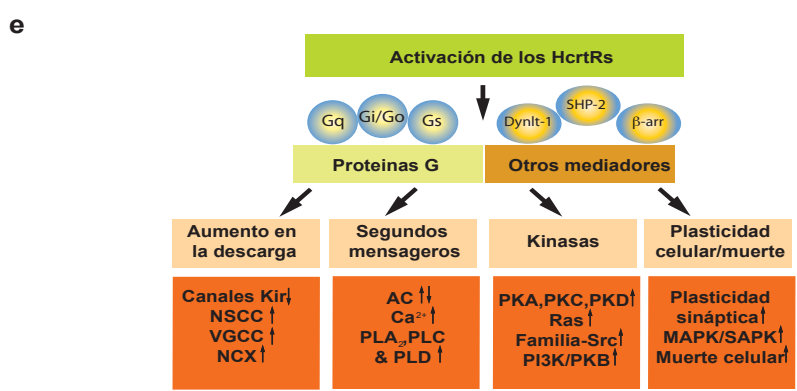
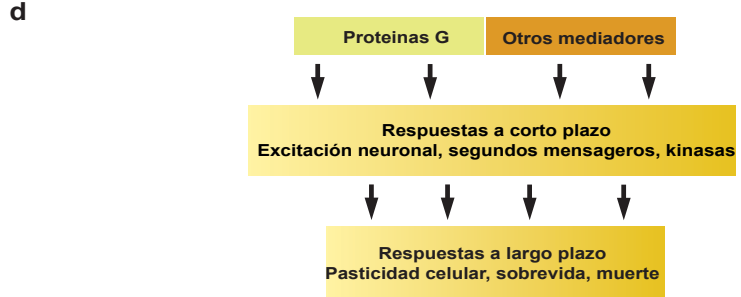
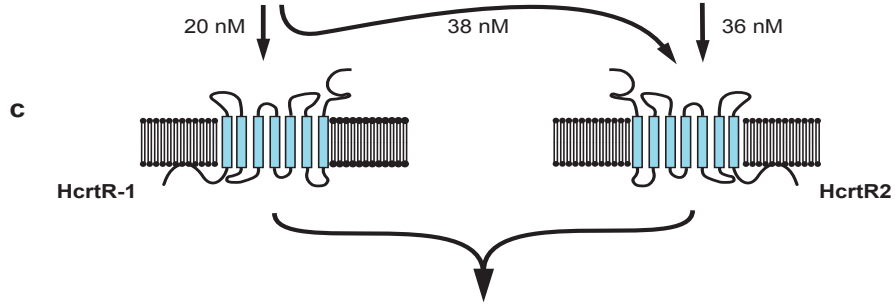
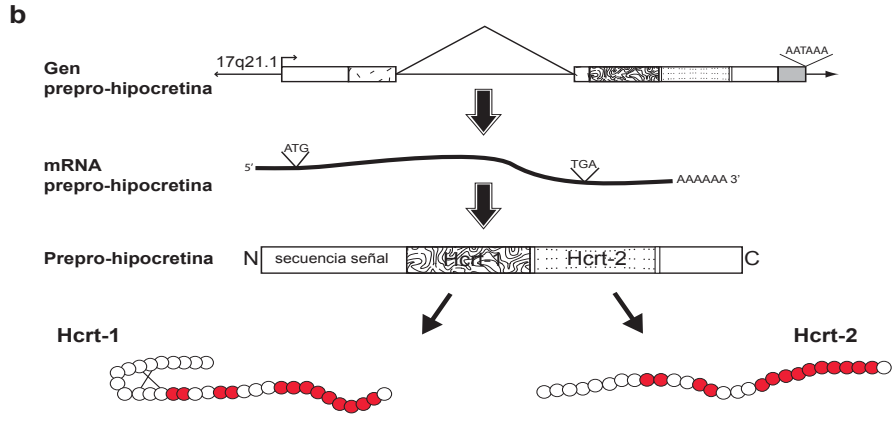
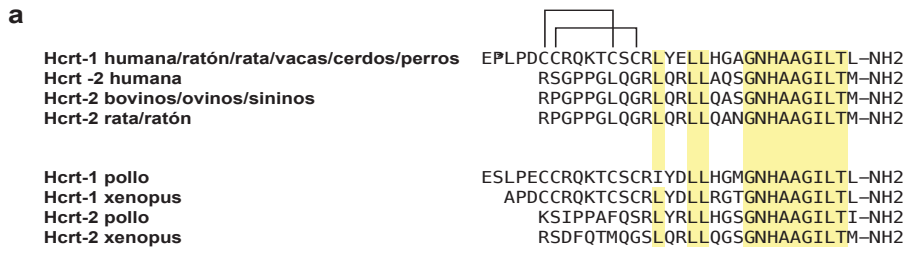


Figura 1. Representación esquemática del sistema Hcrtérgico desde su secuencia génica hasta sus efectos intracelulares. **a**, Secuencia de AAs de los péptidos Hcrt-1 y Hcrt-2. Se ilustran los puentes disulfúricos por encima de la secuencia de la Hcrt-1. Los AAs idénticos se indican con rectángulos sombreados. **b**, La Hcrt-1 y Hcrt-2 son codificadas por el gen para Hcrts. Los círculos rojos indican AAs homólogos. **c**, Los efectos de las Hcrts son mediados por dos receptores (HcrtR-1/HcrtR-2) acoplados a proteína G. Se muestran los valores  $IC_{50}$  de unión al radioigando para Hcrt-1 y Hcrt-2 con la excepción de la afinidad de Hcrt-2 por HcrtR-1. Se describen los sitios con expresión de mRNA particularmente elevado para cada receptor. Abreviaciones LC, *locus coeruleus*; DR, rafe dorsal; TMN, núcleo tuberomamilar; CBCC, células colinérgicas del cerebro basal; LDT/PPT, núcleos tegmentales laterodorsal y pedúnculo pontino. **d**, Ejemplos de las respuestas generales a la activación de los HcrtRs. **e**, Algunos mecanismos moleculares. Las flechas indican incremento o decremento en la actividad de los diferentes blancos intracelulares. Abreviaciones AC, adenilato ciclasa;  $\beta$ -arr,  $\beta$ -arrestina; canales Kir, canales rectificadores de entrada de  $K^+$ ; Dynlt-1, dineína de cadena liviana Tctex tipo 1 y 3; PI3K, fosfoinositol 3 quinasa; PKA, proteína quinasa A; PKB, proteína quinasa B; PKC, proteína quinasa C; PKD, proteína quinasa D;  $PLA_2$ , fosfolipasa  $A_2$ ; PLC, fosfolipasa C; PLD, fosfolipasa D; NCX, intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$ ; NSCC, canal catiónico no selectivo; MAPK, quinasa activada por mitógenos; SAPK, quinasa activada por estrés; SHP-2, tirosina fosfatasa; VGCC, canal de  $Ca^{2+}$  voltaje selectivo. Tomado y modificado de (Kukkonen, 2013) (Kukkonen et al., 2002) (Sakurai and Mieda, 2011)

### 2.2.2- Receptores

Hasta el momento han sido identificados dos receptores para las Hcrts, HcrtR-1 y HcrtR-2. Ambos pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteína G (*G protein-coupled receptors*, GPCR) y forman parte de un subgrupo de receptores peptidérgicos con baja homología (~30%) a otros GPCRs (Kukkonen et al., 2002). Presentan siete dominios transmembrana de longitud media con los extremos  $NH_2$  y  $COOH$  de longitud modesta (Fig. 1c) (Kukkonen et al., 2002). La falta de estudios cristalográficos para estos receptores condujo al empleo de modelos computacionales para poder establecer algunas de las características estructurales como los sitios de interacción ligando-receptor (Malherbe et al., 2010; Heifetz et al., 2012).

Los estudios filogenéticos en diferentes especies de mamíferos (humanos, cerdos, perros, ratas y ratones) muestran un alto grado de homología (91-98 %) interespecie indicando la conservación evolutiva del sistema (Ammoun et al., 2003). No se han

reportado diferencias farmacológicas entre los receptores de diferentes especies (Kukkonen, 2013) y hasta el momento las Hcrts constituyen sus ligandos exclusivos (Smart et al., 1999; Holmqvist et al., 2001).

En ratones, el *splicing* alternativo del transcripto para el HcrtR-2 produce dos isoformas,  $\alpha$  y  $\beta$  (Chen and Randeva, 2004). Aún no se han descrito diferencias farmacológicas entre ambas isoformas, aunque su expresión se halla sujeta a regulación específica en diferentes regiones del SNC (Chen et al., 2006). En los humanos también se observan variantes en la secuencia de los HcrtRs, algunas de las cuales han sido correlacionadas con patologías humanas como los ataques de pánico, la depresión o ciertos tipos de cefaleas (Meerabux et al., 2005; Rainero et al., 2008; Annerbrink et al., 2011; Rainero et al., 2011).

Los HcrtRs presentan afinidad diferencial por sus ligandos endógenos (Fig. 1c). Ambos receptores responden a la Hcrt-1 con afinidad de unión al ligando similar ( $IC_{50}$  20 nM y 38 nM para el HcrtR-1 y HcrtR-2 respectivamente) y una  $EC_{50}$  con valor de 30 y 34 nM en los ensayos de movilización del ión calcio ( $Ca^{++}$ ) intracelular ( $[Ca^{++}]_i$ ) (Sakurai et al., 1998). En cambio, la Hcrt-2 tiene menos afinidad por el HcrtR-1 con un valor de  $IC_{50}$  de 420 nM y una  $EC_{50}$  para la movilización de  $[Ca^{++}]_i$  de 2500 nM, mientras que para el HcrtR-2 presenta una  $IC_{50}$  de 36 nM y una  $EC_{50}$  de 60 nM (Ammoun et al., 2003).

### 2.2.3- Distribución de los receptores para hipocretinas

La distribución anatómica de los HcrtRs ha sido estudiada mayormente en los roedores y en general su localización es consecuente con el patrón de proyecciones de las neuronas Hcrtérgicas en estos animales. Los mRNA para cada subtipo de receptor (mRNA HcrtR-1 y mRNA HcrtR-2) se distribuyen en forma diferencial a través del SNC, aunque hay cierto grado de solapamiento. El área hipotalámica anterior (AHA) y el hipotálamo ventromedial (VMH) expresan altos niveles de mRNA HcrtR-1 mientras que el mRNA HcrtR-2 se expresa en el hipotálamo lateral (LH), núcleo Arcuato (Arc), hipotálamo dorsomedial (DMH), núcleo tuberomamilar (TMN) núcleo paraventricular (PVN). Regiones extra hipotalámicas como el hipocampo, *locus coeruleus* (LC) y los



grupos noradrenérgicos (NAérgicos) A4, A5 y A7 presentan niveles particularmente elevados de mRNA HcrtR-1, en tanto la corteza, núcleo accumbens (NAcc), corteza de la amígdala (AmCx) y núcleos septales, de la banda diagonal y subtalámico expresan el mRNA HcrtR-2 (Marcus et al., 2001). Por su parte el núcleo dorsal del rafe (DR) expresa ambos tipos de receptores (ibid).

El mRNA para los HcrtRs también ha sido detectado fuera del SNC en los tejidos endócrino, muscular y Sistema Nervioso Periférico (Mazzocchi et al., 2001). Por ejemplo la glándula pituitaria de la rata expresa altos niveles de mRNA para ambos receptores (Blanco et al., 2001), mientras que la glándula adrenal, glándula pineal y los testículos expresan el mRNA para uno o ambos HcrtRs (Lopez et al., 1999; Johren et al., 2001; Mikkelsen et al., 2001).

### *2.2.3- Señalización celular de las hipocretinas*

Los HcrtRs se acoplan a diferentes tipos de proteínas G: los HcrtR-1 a los subtipos  $G_q$ ,  $G_i$  y  $G_s$ , mientras que los HcrtR-2 a los subtipos  $G_q$  y  $G_{i/o}$ . Su activación genera respuestas a corto plazo como la despolarización y el aumento en la descarga neuronal, y respuestas a largo plazo que pueden modular aspectos de la plasticidad neuronal y sobrevivencia celular (Fig. 1d) (Sakurai et al., 1998; Smart et al., 1999; Eriksson et al., 2001).

Los mecanismos despolarizantes en respuesta a las Hcrts dependen de la población neuronal blanco. Entre ellos se incluyen el cierre de los canales que utilizan  $K^+$  (canales  $K^+$ ) y la reducción en la resistencia de entrada producto del aumento en el influjo catiónico a través de la activación de canales catiónicos no selectivos, entre ellos el intercambiador  $Na^+/Ca^{++}$  y los canales receptores con potenciales transitorios catiónicos (TRPC) (Yang and Ferguson, 2002, 2003; Huang et al., 2006). Los canales rectificadores de entrada de  $K^+$  (IRK) también podrían ser blanco de las Hcrts. Particularmente los IRK de la subfamilia 3 (IRK3, también conocidos como canales rectificadores de entrada de  $K^+$  acoplados a proteína G, GIRK) son blanco de las vías de señalización mediadas por GPCRs (Sadja et al., 2003; Luscher and Slesinger, 2010). Por otro lado la activación de

los HcrtRs provoca un incremento en la  $[[Ca^{++}]_i]$  a través de canales de  $Ca^{++}$  activados por la proteína quinasa C (PKC) (Fig. 1e) (van den Pol et al., 1998; Lund et al., 2000; Holmqvist et al., 2001; Van Den Pol et al., 2001). Este aumento en los niveles de  $[Ca^{++}]_i$  puede traducirse en diferentes cascadas intracelulares y ejercer efectos moduladores sobre la actividad de la adenilato ciclasa (AC), y las fosfolipasas C (PLC), D (PLD) y A2 (PLA2), enzimas cuyos productos de síntesis constituyen diversos mensajeros intracelulares (Fig. 1e) (Lund et al., 2000; Johansson et al., 2007; Turunen et al., 2010; Jantti et al., 2012; Turunen et al., 2012). Para una revisión extensa de los mecanismos de señalización Hcrtérgica mediada por  $Ca^{++}$  ver (Kukkonen et al., 2002).

La activación del HcrtR-1 resulta en la translocación de  $\beta$ -arrestina, la que contribuye a la señalización mediada por las quinasas activadas por señalización extracelular (ERK) (Evans et al., 2001; Milasta et al., 2005; Rajagopal et al., 2010). El papel de esta familia de quinasas en el SNC adulto está íntimamente ligado a la plasticidad sináptica, y ha sido asociadas con el tráfico de receptores  $\alpha$ -amino-3-hidroxy-5-metil-4-isoxazoleopropionico ácido (AMPA) [(Zhu et al., 2002a; Shin et al., 2009) y revisado por (Thomas and Huganir, 2004)]. Otra familia de quinasas sensibles a la estimulación con Hcrts incluye la proteína quinasa activada por mitógenos/proteína quinasa activada por stress (MAPK/SAPK) cuya subfamilia p 38 ha sido relacionada con un amplio rango de funciones celulares como crecimiento, diferenciación, ciclo y muerte [(Brewster et al., 1993; Han et al., 1994; Nebreda and Porras, 2000) y revisado por (Bulavin and Fornace, 2004; Zarubin and Han, 2005)]. A través de estos y otros mecanismos, las Hcrts participan en la modulación de liberación presináptica de neurotransmisor y la respuesta postsináptica a otros transmisores (van den Pol et al., 1998; Liu et al., 2002; Borgland et al., 2006; Borgland et al., 2008) [para una revisión extensiva de la señalización intracelular por activación de los HcrtRs y los mecanismos de regulación postsináptica ver (Kukkonen, 2013)].

Los HcrtRs pueden heterodimerizar con otros tipos de receptores y presentar selectividad funcional (la activación de una cascada intracelular depende del tipo de ligando que active al complejo) (Ammoun et al., 2003). Por ejemplo los HcrtRs pueden formar heterómeros (dímeros u oligómeros) con los receptores para endocannabinoides

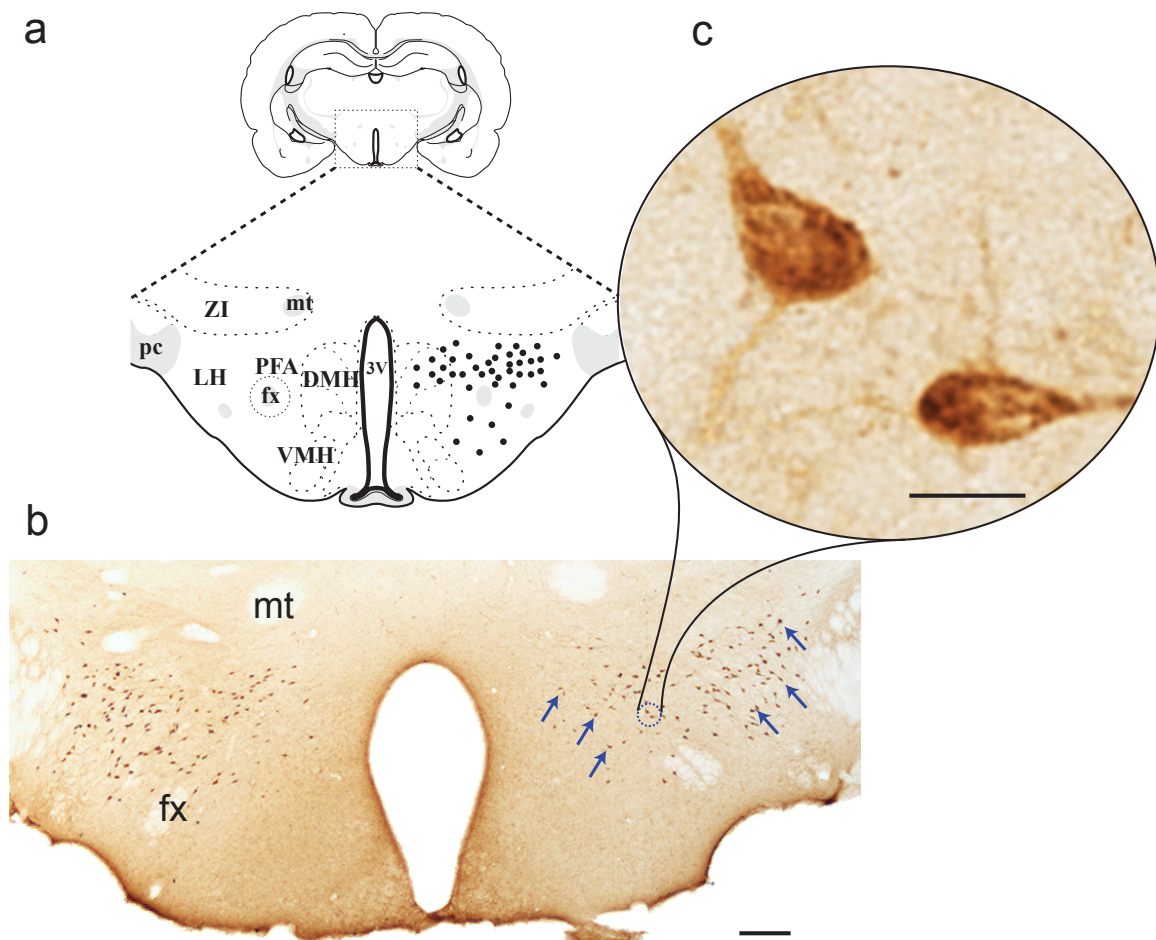
tipo 1 (CB1) lo que incrementa la actividad señalizadora de la Hcrt-1 sobre ERK en dos órdenes de magnitud sin afectar la activación de ERK por los CB1 o de la PLC por Hcrt-1 (Hilairt et al., 2003; Ellis et al., 2006; Ward et al., 2011). Ha sido propuesto que ligandos sin afinidad inherente por un tipo de receptor, pueden aún modular su actividad a través de la interacción con el heterodímero, aumentando de esta manera el papel de las Hcrts en la señalización celular (Ellis et al., 2006).

#### *2.2.5- Neuronas hipocretinérgicas*

La localización hipotalámica de los cuerpos neuronales hipocretinérgicos fue descrita en estudios originales y confirmada luego por trabajos subsecuentes. Sin embargo, han sido reportadas poblaciones Hcrtérgicas adicionales localizadas fuera del hipotálamo en varias especies incluyendo cobayo, ratas, ratones, vacas, ovejas, cerdos y humanos (Kirchgessner and Liu, 1999; Savaskan et al., 2004; Dall'Aglio et al., 2010; Liu et al., 2011). No obstante, la validez de estos resultados ha sido cuestionada por un extenso estudio en roedores y humanos (Baumann et al., 2008). En acuerdo con este último trabajo, nuestros ensayos para la detección de Hcrts (por IHQ) en tejidos periféricos de ratones y ratas incluyendo el yeyuno, el bulbo olfatorio y la retina resultaron negativos (McGregor, datos no publicados). Por lo tanto, en el presente trabajo se asume que los cuerpos celulares productores de Hcrts se localizan exclusivamente en el hipotálamo. Dentro de esta estructura, las neuronas Hcrtérgicas se distribuyen con simetría bilateral y sin formar un núcleo definido, hallándose entremezcladas con otras poblaciones celulares como las neuronas productoras de la hormona concentradora de melanina (MCH). Su extensión abarca la zona tuberal en sus regiones medial y lateral, a través del DMH, el área perifornical (PFA), LH y el VMH (Fig. 2a,b). En el eje rostro caudal se observan desde el extremo posterior del PVN hasta el límite anterior del TMN y en el plano coronal desde el sector medial del DMH hasta los límites laterales del LH. La mayoría de las neuronas Hcrtérgicas se localizan dorsal al fornix aunque también se observan algunos cuerpos neuronales ventrales al mismo (Fig. 2b) (Peyron et al., 1998). Ha sido reportado que las neuronas Hcrtérgicas varían en tamaño y forma (esférica, fusiforme y multipolar), aunque dicha clasificación puede ser el resultado del plano de

sección (Chen et al., 1999; Cutler et al., 1999; Date et al., 1999)). Estas neuronas también han sido clasificadas en dos grupos, H y D, en base a criterios electrofisiológicos obtenidos en preparaciones *in vitro* (Schone et al., 2011), aunque la validez de éstos criterios clasificatorios en preparaciones *in vivo* queda aún por demostrarse.

El número de neuronas Hcrtergicas en humanos se estima en el rango de 53.000 a 83.000 (Thannickal et al., 2000; Fronczek et al., 2005), mientras que para la rata los números reportados son entre 1.100 y 3.400 neuronas Hcrtergicas (Peyron et al., 1998; Harrison et al., 1999). La discrepancia en el número de células dentro de la misma especie puede ser explicada por una serie de factores que incluyen la técnica de fijación, el anticuerpo utilizado, la variedad genética de los animales, método de eutanasia, causa de muerte o los hábitos de vida.



d

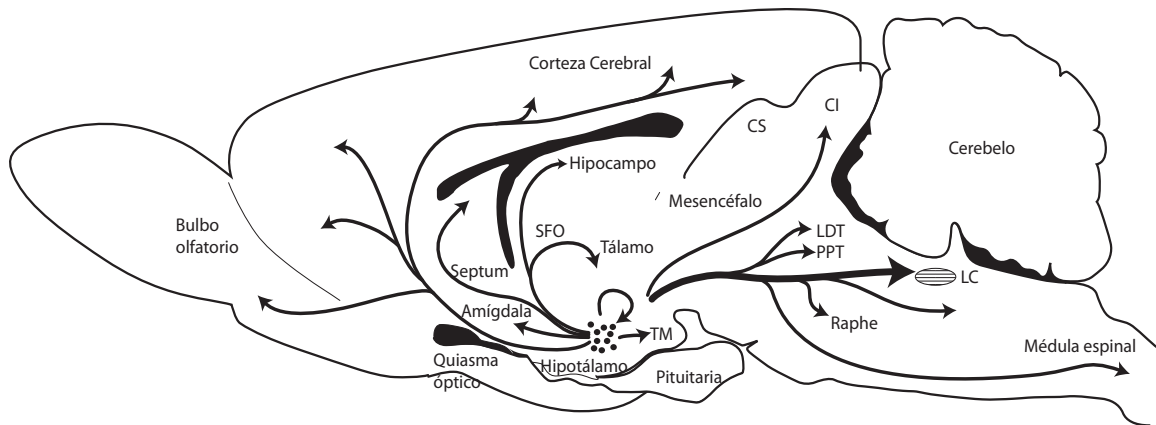


Figura 2. Esquema de la localización de las neuronas Hcrtergicas y sus proyecciones en el cerebro del ratón **a**, Diagrama de un corte coronal de la región tuberal del hipotálamo ilustrando la localización hipotalámica de las neuronas Hcrtergicas (círculos negros) en los sectores laterales, mediales y ventrales al fornix **b**, Fotomicrografía de una sección hipotalámica del cerebro de ratón procesada para la detección de Hcr2 donde se observa la distribución de las neuronas inmunopositivas (flechas azules). **c**, Fotomicrografía a mayor aumento de la región PFA donde se observan ejemplos de dos neuronas Hcrtergicas. **d**, Diagrama de un corte sagital de cerebro de ratón indicando las estructuras blanco de las neuronas Hcrtergicas. Abreviaciones; CI, colículo inferior; CS, colículo superior; LDT, núcleo tegmental laterodorsal; LC, *locus coeruleus*; LH, hipotálamo lateral; DMH, hipotálamo dorsomedial; PFA, área perifornical; PPT, núcleo tegmental pedunculopontino; TMN, núcleo tuberomamilar; VMH, hipotálamo ventromedial; SFO, órgano subfornical; ZI, zona inserta; mt, tracto mamilotalámico; fx, fornix; pc, pedúnculo 3V; tercer ventrículo. Barra de calibración, **b** 250  $\mu\text{m}$ ; **c** 20  $\mu\text{m}$ . Tomado y modificado de (Sakurai and Mieda, 2011)

Las neuronas Hcrtergicas contienen Hcr1 e Hcr2 dentro de sus vesículas secretoras lo que implica que ambos péptidos son co-liberados. Estas neuronas expresan además otra serie de moléculas señalizadoras como dinorfina, pentraxina neuronal regulada por actividad (Narp), neurotensina y nociceptina/orfanina FQ (Chou et al., 2001; Blouin et al., 2005; Maaloud and Meister, 2010; Furutani et al., 2013), aunque a diferencia de las Hcrs, éstas moléculas señalizadoras son expresadas además en otras regiones del cerebro. Galanina y glutamato son también empleados como neurotransmisores por subpoblaciones particulares de neuronas Hcrtergicas (Hakansson et al., 1999; Abrahamson et al., 2001; Torrealba et al., 2003). La co-expresión de varias

moléculas señalizadoras implica que el resultado neto de la transmisión en las sinapsis Hcrtérgicas refleja la interacción entre estas moléculas (Li and van den Pol, 2006; Schone et al., 2012).

Las neuronas Hcrtérgicas pueden ser inhibidas directamente por una variedad de neurotransmisores como la noradrenalina (NA), la serotonina (5HT), y los agonistas GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub>, (Li et al., 2002; Yamanaka et al., 2003b; Yamanaka et al., 2003a; Muraki et al., 2004; Xie et al., 2006). El carbacol (agonista colinérgico), la colecistoquinina, la neurotensina, la oxitocina, la vasopresina y el glutamato tienen por su parte efectos excitatorios (Yamanaka et al., 2003a; Sakurai et al., 2005; Tsujino et al., 2005). Otras moléculas pueden modular indirectamente la actividad de las neuronas Hcrtérgicas tales como los endocannabinoides y la MCH, a través de la inhibición del flujo glutamatérgico sobre estas neuronas (Huang et al., 2007) (Rao et al., 2008). Por su parte la dinorfina también modula la actividad de estas neuronas ya sea mediante efectos postsinápticos directos o indirectamente a través de la reducción del tono de entrada excitatorio (Li and van den Pol, 2006),

La actividad de las neuronas Hcrtérgicas se halla también modulada por componentes de la sangre y AAs de la dieta (Burdakov et al., 2006; Guyon et al., 2009; Karnani et al., 2011; Venner et al., 2011). Por ejemplo, una alta concentración de glucosa o leptina provocan su hiperpolarización, mientras que un descenso en la concentración de glucosa, ghrelina o ciertos AAs resulta en su despolarización (Yamanaka et al., 2003b; Burdakov et al., 2005; Gonzalez et al., 2009; Schone et al., 2012). De forma interesante, este mecanismo es lo suficientemente sensible como para detectar y codificar las variaciones en los niveles de glucosa que ocurren fisiológicamente entre los períodos de alimentación indicando la participación de estos péptidos en el metabolismo (Burdakov et al., 2005).

Por último, las neuronas Hcrtérgicas presentan un mecanismo de auto-regulación a través de los efectos excitatorios directos en respuesta a la Hcrt-2 (mediante el HcrtR-2) o indirectos a la Hcrt-1 (mediante el HcrtR-1 a través de glutamato) (Li et al., 2002; Yamanaka et al., 2010). Sumado a ello, el hecho de que las neuronas Hcrtérgicas co-

expresan y responden a la dinorfina agrega un nuevo nivel de control a los circuitos de retroalimentación del sistema.

#### *2.2.6- Proyecciones ascendentes y descendentes de las neuronas hipocretinérgicas*

Desde el descubrimiento del sistema Hcrtérgico, sus proyecciones han sido estudiadas con técnicas IHQs utilizando diferentes anticuerpos para reconocer el PPH, Hcrt-1 e Hcrt-2 (Nambu et al., 1999) (Peyron et al., 1998; Fung et al., 2001) así como mediante la detección del mRNA para los HcrtRs (Trivedi et al., 1998) (Marcus et al., 2001). La tinción con anticuerpos anti-Hcrt-1 y anti-Hcrt-2 resulta en el mismo patrón de inmunoreactividad a nivel de los cuerpos celulares (Cutler et al., 1999) (Date et al., 1999). A nivel de las fibras, la tinción con ambos anticuerpos (Hcrt-1 o Hcrt-2) resulta en un patrón de inmunoreactividad extensamente solapado, aunque se han descrito algunas diferencias sutiles en el patrón de distribución de las mismas (Cutler et al., 1999). Morfológicamente las fibras se observan con y sin varicosidades, siendo las primeras más prevalentes (Cutler et al., 1999). Las fibras pueden establecer conexiones con las dendritas de sus neuronas blanco como se observa las poblaciones neuronales de la VTA (Balcita-Pedicino and Sesack, 2007) así como también directamente sobre cuerpos celulares y axones como en ciertas neuronas en el núcleo Arcuato (Horvath et al., 1999a).

A pesar del bajo número de neuronas Hcrtérgicas, el patrón de fibras revela un extenso conexionado dentro y fuera del hipotálamo (van den Pol, 1999). Los estudios con trazadores retrógrados y anterógrados sugieren conexiones recíprocas con sus estructuras blanco que incluyen entre otras la corteza prefrontal, cerebro basal, la amígdala, núcleos septales mediales y laterales, corteza del NAcc, LC, DR y médula espinal (Chen et al., 1999; Date et al., 1999; Horvath et al., 1999b; Date et al., 2000a). El conexionado intrahipotalámico, que incluye conexiones entre neuronas Hcrtérgicas, presenta un patrón similar de proyecciones recíprocas con el área preóptica mediana (MPO) y vertrolateral (VLPO), AHA, Arc, DMH y VMH (Fig. 2d) (Peyron et al., 1998; Trivedi et al., 1998; Li and van den Pol, 2006; Yoshida et al., 2006; Yamanaka et al., 2010).

## 2.3- Efectos fisiológicos de las hipocretinas

### 2.3.1- Participación en la regulación del sueño y la vigilia

El sueño es un estado comportamental rápidamente reversible cuyas características incluyen una reducción en la actividad motora, el metabolismo general y la respuesta a estímulos externos. En mamíferos y pájaros el sueño puede ser dividido en dos estados: sueño con movimientos oculares rápidos (sueño REM) y sueño sin movimientos oculares rápidos (sueño NREM) según características del electroencefalograma (EEG), electromiograma (EMG) y electrooculográficas (Fig. 3) [(para una definición comprensiva de los diferentes estados ver: Principles and Practice of Sleep Medicine, Elsevier, 2011)].

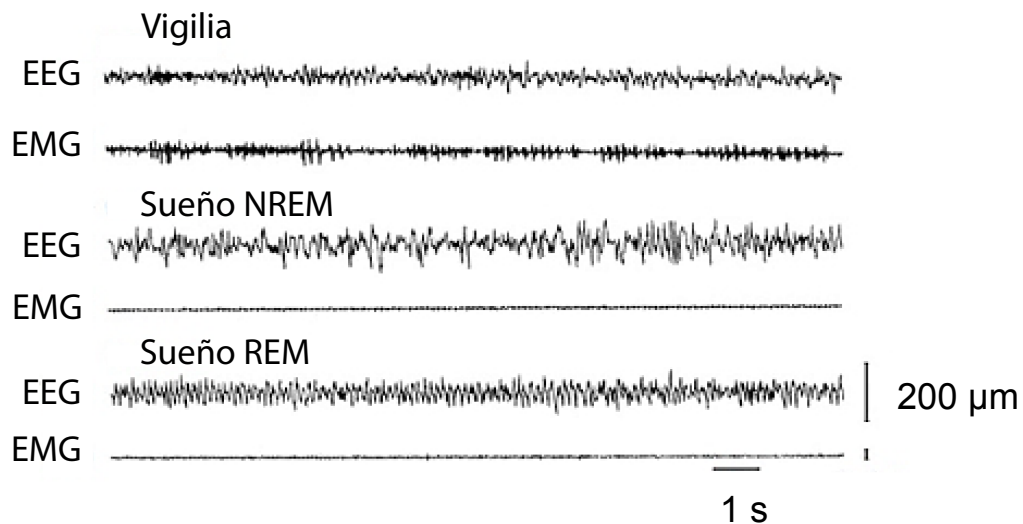


Figura 3. Los registros del electroencefalograma (EEG) y del electromiograma (EMG) pueden ser utilizados para definir los estados de sueño y vigilia. Se muestra un ejemplo obtenidos en ratón, pero los mamíferos en general presentan este mismo tipo de registro.

En los mamíferos, los diferentes estados del sueño y la vigilia son generados y regulados por diversas estructuras del cerebro. El balance entre los sistemas promotores de la vigilia y los sistemas promotores del sueño define el estado comportamental del



individuo. De esta forma los neurotransmisores promotores de la vigilia como la NA, la acetilcolina (ACh), 5-HT, histamina, glutamato y recientemente las Hcrts son responsables del despertar y la vigilia (Jacobs and Fornal, 1999; Gallopin et al., 2000; John et al., 2004; Lee et al., 2005b; Mileykovskiy et al., 2005; Szymusiak and McGinty, 2008; Siegel, 2009). En tanto, estructuras como el área preóptica del hipotálamo (POA) en especial el VLPO y MPO son importantes para la generación del sueño NREM (McGinty and Szymusiak, 2001), mientras el tronco encefálico resulta crítico para la generación y mantenimiento del sueño REM (Siegel, 2009). Este balance entre los sistemas promotores de la vigilia y del sueño se halla a su vez sujeto a la influencia del ciclo circadiano, factores sensoriales, autonómicos, metabólicos, endócrinos y comportamentales entre otros [(para mayor detalle acerca de los mecanismos del sueño y la vigilia ver (Kryger MH, 2011)].

Los efectos promotores de la vigilia de las Hcrts han sido establecidos en diferentes especies por varias líneas de trabajo (Hagan et al., 1999; Piper et al., 2000; Lee et al., 2005a; Mileykovskiy et al., 2005; Adamantidis et al., 2007; Deadwyler et al., 2007; Sasaki et al., 2011). Entre los mediadores de estos efectos, la transmisión histaminérgica parece tener un papel destacable (Huang et al., 2001; Nishino et al., 2001; Yamanaka et al., 2002; Mochizuki et al., 2011). Aún así, el bloqueo de la señalización histaminérgica únicamente atenúa los efectos promotores de la vigilia de las Hcrts, indicando la participación de otros sistemas (Yamanaka et al., 2002). Ciertamente los estudios *in vitro* demuestran que las neuronas NAérgicas del LC, 5-HTérgicas del DR, colinérgicas del cerebro basal y de los núcleos tegmentales del puente, estructuras relacionadas con la vigilia, aumentan su descarga en respuesta a las Hcrts (Hagan et al., 1999; Eggermann et al., 2001; Xi et al., 2001; Burlet et al., 2002; Liu et al., 2002). La interpretación conjunta de estos resultados sugiere que varios fenotipos neuronales actúan de forma coordinada para generar y consolidar la vigilia. Sin embargo un trabajo reciente reportó que la concomitante destrucción de varios de estos grupos neuronales incluyendo el colinérgico, Hcrtérgico y NAérgico no tiene efectos significativos sobre la vigilia (Blanco-Centurion et al., 2007). Esto sugiere la necesidad de reevaluar los conceptos clásicos acerca de los mecanismos involucrados en el mantenimiento de la vigilia.

### 2.3.2- Narcolepsia

En humanos, la narcolepsia es una enfermedad crónica y se presenta de forma esporádica, salvo un solo caso conocido que presenta una mutación que impide el procesamiento y tráfico del PPH (Peyron et al., 2000). Sus características más prominentes incluyen una excesiva somnolencia diurna (EDS), disrupción del sueño nocturno, ataques de sueño, corta latencia en la transición vigilia-sueño REM (utilizado como herramienta diagnóstica, test múltiple de latencia al sueño, ver apéndice) y cataplejia; una pérdida repentina del tono muscular de corta duración asociada generalmente a procesos emocionales (Siegel and Boehmer, 2006). A pesar de la EDS, la cantidad de sueño total en narcolépticos no es significativamente mayor comparada a individuos normales, y ha sido reportado que presentan un menor grado de somnolencia durante la fase normal del sueño (Guilleminault C, 2000; Goel et al., 2010).

La cataplejia, ha sido propuesta como una intrusión de un estado tipo REM durante la vigilia basados en ciertas similitudes entre ambos estados como la atonía muscular bilateral y el ritmo theta en el hipocampo (Siegel, 2009). Sin embargo, a diferencia del sueño REM los sujetos (humanos y animales) no experimentan pérdida de conciencia durante un ataque de cataplejia. Los pacientes narcolépticos con cataplejia pierden el 90 % de las neuronas Hcrtérgicas, mientras que aquellos sin cataplejia se observa una reducción de solo el 33 % (Thannickal et al., 2000; Thannickal et al., 2009). Es posible que la disminución moderada en el número de neuronas Hcrtérgicas se traduzca en la somnolencia característica de esta patología, mientras que una lesión más extensa resulte en la expresión de otros síntomas tales como la cataplejia (Siegel, 2004). Aún permanecen desconocidas las causas de la muerte neuronal Hcrtérgica, aunque un creciente número de trabajos apunta a un proceso autoinmune (Thannickal et al., 2000; Overeem et al., 2008; Cvetkovic-Lopes et al., 2010; Dauvilliers et al., 2010; Nishino et al., 2010; Han et al., 2011).

Los modelos animales de narcolepsia en general suponen disrupciones en el sistema Hcrtérgico ya sea por destrucción de las neuronas Hcrtérgicas, mutaciones en los HcrtR o eliminación de la expresión del PPH. Este último modelo fue creado en ratones y resultó en el descubrimiento de la relación entre las Hcrts y el ciclo sueño vigilia

(Chemelli et al., 1999). Desde su creación ha sido extensamente utilizado para estudiar las diferentes funciones del sistema Hcrtérgico, así como de otros sistemas que interactúan con éste.

### 2.3.3- Variación circadiana

La actividad de las neuronas Hcrtérgicas, los niveles de RNA mensajero (mRNA) para PPH (mRNA PPH) y la concentración de Hcrt-1 varían con el ritmo circadiano y, en el curso de 24 h, los cambios en los niveles de vigilia se corresponden con las fluctuaciones en la actividad de las neuronas Hcrtérgicas (Taheri et al., 2000; Estabrooke et al., 2001). En animales nocturnos como los roedores (rata), los niveles de Hcrt-1 medidos en el LCR aumentan durante la fase nocturna registrando los valores máximos al inicio de la fase diurna (Fujiki et al., 2001). Por otro lado, los niveles en el LCR en animales diurnos como los primates se observa el esquema opuesto (Zeitzer et al., 2003). A pesar de ello, la falta de Hcrts parece no afectar significativamente el ritmo circadiano endógeno. Así, tanto animales con ausencia de Hcrts (KO PPH) o con extensas lesiones del campo Hcrtérgico exhiben ciclos circadianos normales (Mistlberger et al., 2003; Mochizuki et al., 2004). Sin embargo, los efectos fisiológicos de las Hcrts sobre sus blancos celulares se hallan bajo modulación circadiana. Por ejemplo, las neuronas del LC y del TMN, presentan una menor respuesta a las Hcrts a medida que aumenta la presión de sueño, en tanto que los efectos promotores de la vigilia producto de la excitación optogenética de las neuronas Hcrtérgicas se ven también afectados por el mismo fenómeno (Carter et al., 2009). Además, la inhibición optogenética de estas neuronas resulta en la inducción del sueño lento solo durante la fase diurna, período de sueño natural en los roedores (Tsunematsu et al., 2011). Desafortunadamente carecemos aún de trabajos que describan la fluctuación en el número de HcrtRs o cambios en su sensibilidad a lo largo del ciclo circadiano.

A pesar de estos estudios, la variable circadiana no es incluida en la mayoría de los trabajos referentes a las Hcrts. El hecho de que las estructuras blanco puedan regular su sensibilidad a las Hcrts puede ser importante por ejemplo a la hora de interpretar los

resultados obtenidos con el uso de agonistas y/o antagonistas de los HcrtRs. Resulta necesario entonces incluir la variable circadiana para poder determinar el papel fisiológico de este sistema de señalización.

#### *2.3.4- Procesamiento de recompensas o aversión.*

La habilidad para completar efectivamente ciertas metas u objetivos, como por ejemplo cubrir las necesidades básicas de alimentación, resulta crítico para la supervivencia y el bienestar a largo plazo de todos los individuos. Esta herramienta adaptativa se repite a lo largo de toda la escala zoológica desde los animales unicelulares con respuestas relativamente sencillas a estímulos particulares, hasta los vertebrados superiores cuyo nivel de complejidad permite respuestas más sofisticadas y con un mayor rango de estímulos del ambiente (Elliot, 2006).

La búsqueda y subsecuente concreción de un objetivo particular puede definirse como las “respuestas intencionales ejecutadas con el fin de generar o mantener un estado deseable”, o “las respuestas intencionales ejecutadas con el fin de controlar o prevenir un estado no deseado”. Estas definiciones se traducen en lo que se conoce como comportamientos de acercamiento o evasión (Moskowitz and Grant, 2009). Esta dicotomía entre las respuestas de acercamiento o evasión se considera central en la búsqueda y concreción de objetivos, lo que resulta fundamental para la motivación e indispensable para la exitosa adaptación de los individuos al medio (Elliot, 2006). A pesar de la importancia de este argumento en la comprensión de los comportamientos motivados, es necesario recordar que la motivación es un fenómeno multidimensional que incluye mayor número de aspectos [para una revisión del tema ver (Elliot, 2008)].

Estas respuestas están asociadas, entre otros, a redes neuronales que median aspectos de la funcionalidad cortical, la sensibilidad a la recompensa y la expresión del comportamiento. Entre ellas podemos destacar circuitos del sistema mesocorticolímbico, el sistema amígdala-hipotálamo-estriado, el tronco encefálico y los sistemas promotores de la vigilia, todos ellos implicados en la acción-reacción a los estímulos destacados del ambiente (Laricchiuta and Petrosini, 2014). El sistema que modula el comportamiento de

acercamiento se considera un sistema motivacional que activa circuitos relacionados a la búsqueda de recompensa como el sistema DAérgico mesocorticolímbico y esta asociado a la exploración e impulsividad. El comportamiento de aversión por otro lado incluye componentes circuitales que promueven activamente la abstinencia al comportamiento o la inhibición de las respuestas de atracción. Entre ellos se destacan la corteza cingulada anterior, la amígdala, el núcleo basal de la estria terminal (BNST) y el glutamato como molécula señalizadora (McNaughton and Gray, 2000; Pickering, 2001; Carver and Miller, 2006) (Masabumi, 2009). Aunque esta clasificación resulta útil, es necesario mencionar que existe solapamiento entre los componentes que regulan estos comportamientos que resultan resistentes a nuestras herramientas de disección Aristotélicas (Ungless et al., 2010) (Fernando et al., 2013).

La relación de las Hcrts con las estructuras relacionadas a la modulación de los comportamientos aversivos presenta aun controversias en la literatura. Si bien el sistema Hértérgico proyecta al complejo amigdalino y al BNST y ambas estructuras expresan HcrTRs los efectos fisiológicos directos de los péptidos han sido contradictorios. Por ejemplo la administración directa de Hcrts en la amígdala provoca comportamientos ansiogénicos, mientras que la señalización mediada por el HcrTR2 en esta misma estructura genera efectos ansiolíticos (Avolio et al., 2011) (Arendt et al., 2014). Por otro lado, los efectos despolarizantes de las Hcrts sobre las neuronas del BNST en preparaciones *in vitro* de ratas adultas contrastan con los efectos observados en ratones (Lungwitz et al., 2012) (Conrad et al., 2012). Sumado a ello, un creciente número de publicaciones sugiere que los efectos de las Hcrts sobre la modulación de estados aversivos ocurre a través del factor de liberación de corticotropina (CRF), neuropéptido prototípico en la respuesta al estrés (Kuru et al., 2000; Hata et al., 2011) (Schmitt et al., 2012). Por otro lado, la presencia de un estímulo aversivo (alimento novedoso que genera aversión) provoca el silenciamiento de las neuronas Hértérgicas (Mileykovskiy et al., 2005). Este fenómeno parece no estar de acuerdo con datos previamente publicados en relación a la activación de las neuronas Hértérgicas en situaciones aversivas. Por ejemplo Winksky-Sommerer y colaboradores reportó un aumento significativo en la activación de las neuronas Hértérgicas cuantificado mediante la expresión de Fos, luego de exponer los animales a situaciones aversivas. En este trabajo, los autores someten a los sujetos

experimentales a una de dos situaciones estresantes, ambas de relativa corta duración, para luego retornar los animales a sus jaulas por una hora previa al sacrificio (Winsky-Sommerer et al., 2004). Por lo tanto este paradigma comportamental supone la combinación de una situación aversiva de corta duración seguida de una sensación placentera, el alivio de retornar a sus jaulas. Sumado a ello, es esperable que los animales se acicalen y exploren sus alrededores, comportamientos típicos que se observan luego de que los roedores han sido manipulados y que provocan un aumento significativo en la descarga de las neuronas Hcrtérgicas (Mileykovskiy et al., 2005). Por lo tanto, la notable controversia en los reportes en la literatura acerca del papel de las Hcrts en el procesamiento de situaciones aversivas hace difícil establecer un rol de este sistema neuropeptidérgico en la modulación de comportamientos motivados por Hcrts.

Con respecto a la modulación de los comportamientos de acercamiento, hay un extenso cuerpo de literatura que relaciona a las Hcrts con la modulación positiva del sistema DAérgico mesocorticolímbico, que como se mencionara con anterioridad, es un protagonista central en el procesamiento de la recompensa (Salamone et al., 1991; Robinson and Berridge, 1993). Por ejemplo, la exposición breve de neuronas DAérgicas a Hcrt-1 o Hcrt-2 en rodajas de mesencéfalo genera rápida y transitoriamente una potenciación de las corrientes post sinápticas excitatorias (CPSE) mediadas por los receptores glutamatérgico N-metil-D-aspartato (NMDAR) (Borgland et al., 2006; Borgland et al., 2008). No se han reportado efectos agudos a la aplicación de la Hcrt-1 en las CPSE mediadas por los receptores glutamatérgicos AMPA. Sin embargo 3-4 horas luego de la aplicación de Hcrts, se observa un aumento en las CPSE miniatura en los AMPAR (dependiente de los NMDAR) y de la razón AMPAR/NMDAR. La potenciación de la entrada sináptica excitatoria en las neuronas DAérgicas mesencefálicas que resulta del aumento en las corrientes postsinápticas mediadas por los AMPAR, ha sido descrita capaz de modular la descarga de estas neuronas (Zhang et al., 1997) (Overton and Clark, 1997). Sumado a ello, este tipo de potenciación a largo plazo (LPT) en un marco temporal de horas ha sido demostrada en modelos *in vivo* luego de la exposición a varias drogas de abuso, incluyendo cocaína y ha sido relacionada a la transformación de estímulos ambientales neutros en claves destacadas con valor predictivo para la obtención de recompensas (Ungless et al., 2001; Saal et al., 2003; Borgland et al., 2004; Stuber et

al., 2008). Por otro lado, la administración de Hcrts i.c.v. o intra-VTA puede afectar los niveles de DA en la corteza prefrontal y NAcc medidos por microdiálisis, modulación asociada a la obtención de recompensas (Narita et al., 2006; Vittoz and Berridge, 2006; Vittoz et al., 2008; Espana et al., 2010). Consistente con éstos resultados, la administración sistémica o intra-VTA de SB 334867 (antagonista ¿?) impide el aumento en la concentración de DA estriatal inducida por cocaína (Espana et al., 2010).

Desde el punto de vista comportamental, los estudios farmacológicos han demostrado la participación del sistema Hcrtérgico en diferentes aspectos de la búsqueda, consumo y recaída a las drogas de abuso como cocaína, anfetaminas, morfina, nicotina y alcohol (Harris et al., 2005) (McPherson et al., 2007) (Hollander et al., 2008; Espana et al., 2010; Jupp et al., 2011a).

### *2.3.5- Hipocretinas y alimentación*

Las Hcrts tienen efectos orexigénicos modestos comparados con otras moléculas orexigénicas establecidas. Su administración i.c.v. provoca un aumento agudo en el consumo de alimento durante la fase diurna, pero el nivel de ingesta neto en 24 h no es significativamente diferente al de los animales control (Yamanaka et al., 1999). Si bien la alimentación responde a variables homeostáticas, también se halla modulada por los procesos de recompensa como la motivación para obtener alimento, las claves predictivas para la obtención de alimentos o la palatabilidad de los mismos. Algunos trabajos recientes han sugerido que el sistema Hcrtérgico participa en la modulación de algunos de estos aspectos que regulan la alimentación. Por ejemplo, la administración directa de Hcrt-1 en el NAcc incrementa el consumo de alimento, mientras que su administración en el LH incrementa la motivación para obtener sucrosa en un paradigma comportamental operante (Thorpe et al., 2005). El bloqueo del HcrtR-1 por administración i.c.v. o sistémica del antagonista 1-(2-metilbenzoxazol-6-yl)-3-[1,5] naftiridin- 4-yl urea (SB-334867) reduce los niveles de ingesta naturales (Haynes et al., 2000; Rodgers et al., 2001), inhibe el consumo de alimentos sabrosos inducido por los agonistas de los receptores  $\mu$  opioides (Thorpe and Kotz, 2005; Zheng et al., 2007), y reduce la respuesta

a los alimentos altos en grasa, sucrosa y chocolate sin afectar la respuesta por alimento común (Thorpe et al., 2005; Nair et al., 2008; Borgland et al., 2009; Choi et al., 2010; Espana et al., 2010; Sharf et al., 2010). La mayoría de estos trabajos emplean tareas comportamentales combinadas con agonistas y antagonistas de los HcrtRs para manipular la señalización Hcrtérgica.

Si bien el uso de estas herramientas farmacológicas provee valiosa información, podría no ser la mejor estrategia experimental para estudiar el papel del sistema Hcrtérgico en los comportamientos motivados por alimentos. Por ejemplo, las concentraciones de los fármacos utilizadas se encuentran significativamente fuera el rango de los valores fisiológicos y por ello los efectos reportados pueden surgir como un artefacto de las elevadas concentraciones utilizadas. Sumado a ello, las Hcrts son reconocidas moléculas excitatorias y por lo tanto es posible que se observen resultados comportamentales similares tras la administración de otra molécula con propiedades excitatorias como por ejemplo el glutamato. Estos trabajos suponen además, contrariamente a lo reportado, que los blancos celulares responden de la misma manera a las Hcrts independientemente del momento del ciclo circadiano, lo que podría suponer respuestas atenuadas o exageradas a la estimulación Hcrtérgica. Por otro lado, el bloqueo de los HcrtRs por administración sistémica del antagonista no es la metodología adecuada a la hora de brindar datos específicos sobre el sistema Hcrtérgico ya que el efecto observado es el balance de los receptores inhibidos/no inhibidos a nivel sistémico.

El enclave anatómico, las proyecciones y los efectos fisiológicos como agente promotor de la vigilia y modulador de los circuitos de recompensa colocan al sistema Hcrtérgico como un candidato a participar en la modulación de los comportamientos motivados. Es posible que este sistema no participe indiscriminadamente en la modulación de estos comportamientos ya que parece no afectar las propiedades reforzadoras primarias tanto de ciertas drogas de abuso (Smith et al., 2009; Espana et al., 2010) como del alimento común (Thorpe et al., 2005) (Borgland et al., 2009). Por lo tanto es posible que su reclutamiento dependa de la naturaleza motivacional que impulsa al comportamiento. Basados en la falta de datos que permitan determinar el papel que cumplen las Hcrts en la fisiología normal de los individuos en respuesta a los



comportamientos motivados por la obtención de recompensas o evitar una situación aversiva nos propusimos realizar el presente trabajo. Resulta además importante agregar la variable circadiana en estos estudios ya que este sistema presenta oscilaciones circadianas endógenas en cuanto a su actividad. Para la realización de este estudio la herramienta de los animales KO PPH y sus compañeros de camada salvajes (WT) resulta particularmente útil.

### 3- Hipótesis general

El sistema Hcrtérgico es reclutado según la naturaleza motivacional del comportamiento. Por lo tanto las situaciones que suponen la obtención de una recompensa requieren de la participación este sistema, mientras que las situaciones aversivas no provocan su activación. Además ese reclutamiento está condicionado al momento del ciclo circadiano en el cual se desarrolla la actividad.

#### 3.1- Hipótesis específica

La falta de Hcrts en animales provocará déficits en el comportamiento motivado por una recompensa durante la fase diurna (inactiva). Durante la fase nocturna (activa) los déficits comportamentales serán aún más pronunciados. Los comportamientos motivados por evitar un refuerzo negativo no se verán afectados por la ausencia de los péptidos. Estos déficits comportamentales estarán relacionados con cambios en la actividad de las neuronas Hcrtérgicas.

## 4- Objetivo general

Estudiar el comportamiento operante de animales KO PPH (falta de Hcrt) y WT en paradigmas experimentales que suponen la obtención de una recompensa positiva o evitar un refuerzo negativo durante diferentes fases del ciclo circadiano. Complementar los estudios comportamentales con el análisis de la activación de las neuronas Hcrtérgicas en animales WT.

### 4.1- Objetivos específicos

- 1) Comparar el rendimiento de animales WT y KO PPH en una tarea operante que supone la obtención de una recompensa de alimento durante la fase diurna y nocturna del ciclo circadiano.
- 2) Evaluar mediante el registro del EEG y EMG el estado comportamental de los animales de ambos genotipos durante diferentes tareas comportamentales.
- 3) Evaluar los efectos del incremento en la motivación para obtener alimento en animales de ambos genotipos.
- 4) Comparar el rendimiento de los animales WT y KO PPH en una tarea operante que supone la obtención de una recompensa de agua.
- 5) Comparar el rendimiento de los animales WT y KO PPH en una tarea operante que supone evitar un refuerzo negativo.
- 6) Evaluar la actividad de las neuronas Hcrtérgicas en los animales WT utilizando la expresión del gen de respuesta inmediata c-fos bajo diferentes condiciones comportamentales y durante las dos fases del ciclo circadiano.

## 5- Metodología

### 5.1- Sujetos experimentales

Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité Institucional para el Uso y Cuidado de los Animales de Experimentación de la Universidad de California en Los Ángeles (UCLA) y el *Veterans Administration Greater Los Angeles Health Care System*. Se realizaron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento de los sujetos experimentales.

Se utilizaron ratones KO PPH C57BL/6J-129/SvEv, obtenidos del Dr. M. Yanagisawa (Instituto Médico Howard Hughes, Departamento de Genética Molecular, Universidad de Tejas, Centro Médico Southwestern, Dallas, Tejas, USA). Los animales, fueron mantenidos como heterocigotos y cruzados para obtener los ratones KO PPH y sus compañeros de camada WT. El genotipo de los KO PPH fue identificado mediante la reacción de la polimerasa en cadena (polimerase chain reaction, PCR) utilizando un método previamente descrito (Kayaba et al., 2003). Brevemente, se extrajo una muestra del DNA de una biopsia de cola de los animales y se amplificó utilizando como cebador la secuencia 5' GAC CTA TCA GGA CAT AGC GTT GGC y 3' TCA CCC CCT TGG GAT AGC CCT TTC para el alelo mutante y 5' GAC GAC GGC CTC AGA CTT CTT GGG con la misma secuencia 3' para identificar el alelo salvaje. Los productos de la reacción fueron analizados en un gel de poliacrilamida, revelados con bromuro de etidio y visualizados con luz UV. Los animales WT se identificaron con una banda de 1.5 Kb y los KO PPH con una banda de 2.1 Kb que corresponden a los alelos característicos de cada genotipo (Chemelli et al., 1999).

Se utilizaron solamente animales macho (WT n=70, KO PPH n=26) con 2-4 meses de edad al inicio de los experimentos, a menos que se indique lo contrario. El genotipo de los animales fue confirmado por IHQ utilizando el anticuerpo anti-Hcrt-1 y anti-Hcrt-2 (rabbit anti-orexin B, H003-32, Phoenix Pharmaceuticals, USA y rabbit anti-orexin A, PC 345, Millipore, USA).

Todos los animales fueron mantenidos dentro de cámaras con atenuación sonora,

impermeables a la luz, con sonido blanco producido por los ventiladores del laboratorio localizado en un edificio de planta única, con cuartos adyacentes desocupados y la entrada solamente permitida a los investigadores. El cuarto experimental fue mantenido a  $22\pm 1^{\circ}\text{C}$  en un ciclo de 12 horas de luz (45 lux)/oscuridad (0.03 lux), con luces encendidas a las 7:00 am y apagadas a las 7:00 pm. Todos los animales experimentales fueron obtenidos de la UCLA, a menos que se indique lo contrario.

## 5.2- Dispositivos experimentales

### 5.2.1- Cámaras Operantes

Los experimentos comportamentales fueron realizados en cámaras de condicionamiento operante (cámara operante) diseñadas para ratones (dimensiones: 17.8 X 17.8 X 30.5 cm; modelo H10-11M-TC, con rejilla modular modelo H10-11M-TC-SF Coulbourn Instruments, USA; todos dispositivos para los experimentos comportamentales fue obtenidos de la misma compañía). Estas cámaras fueron colocadas dentro de cubículos de aislamiento, con ventilación y atenuación sonora (dimensiones: 65.4 X 52.7 X 61.6 cm; modelo H10-24 TA). Cada cubículo consta de una cámara CCD infrarroja (KPC-S50 NV, Sony) para la grabación y posterior análisis de las sesiones experimentales. Cada cámara operante está equipada con una palanca (1.9 X 0.9 cm) colocada 0.6 cm por encima del piso de rejilla, una combinación de tres luces (roja, verde y amarilla) LCD para generar claves visuales (modelo; H11-02M), un parlante en la pared opuesta para generar claves sonoras y una luz general blanca. Los pellets de alimento para el paradigma de refuerzo con alimento fueron suministrados por un dispensador de pellets motorizado (modelo; H14-23M) a través de un receptáculo en la pared de la jaula (2.3 cm X 2.5 cm) a la izquierda de la palanca. Para los animales implantados con electrodos los pellets fueron suministrados en una bandeja de plástico (9.5 cm de largo X 4 cm de ancho X 2 cm de altura) colocada a la izquierda de la palanca para evitar que el implante impidiera el acceso al alimento. Para el paradigma de refuerzo con agua, el líquido fue suministrado por un brazo motorizado (modelo; H14-05M), accesible a través de un receptáculo rectangular en la pared de la jaula (2.3 cm X 2.5 cm)

a la izquierda de la palanca. El brazo culmina en un pequeño receptáculo que contiene 0.01 cm<sup>3</sup> de agua. Para el paradigma de refuerzo negativo, la estimulación eléctrica fue suministrada a través de una rejilla metálica en el suelo de la jaula (1s, 150-500  $\mu$ A, modelo; H13-15).

La luz dentro en los cubículos de aislamiento durante las sesiones experimentales conducidas en la fase diurna fue de 11.4 lux (luz general) y 0.07 lux (luz roja de clave visual). Durante la fase nocturna solo la luz roja de clave visual fue encendida intermitentemente con una frecuencia de 0.1s por 3s al dispensar una recompensa. Para la comparación en la activación de las neuronas Hcrtérgicas en la presencia o ausencia de la luz general, la luz roja de clave permaneció encendida. Al finalizar la sesión experimental, todas las luces fueron apagadas (0.03 lux) y los animales regresados a sus jaulas.

### 5.3- Cuantificación del consumo de alimento

Para los experimentos comportamentales con recompensa de alimento, los sujetos experimentales fueron mantenidos al 85-90% de su peso corporal original, a menos que se indique lo contrario, mediante restricción calórica. El alimento (LABDiet, PMI Nutrition, USA) fue racionado en base al peso diario de cada uno de los animales. Una vez estabilizados en el nuevo peso corporal y manteniendo la restricción calórica se cuantificó la cantidad de alimento por peso (g) consumido en 120 minutos entre las 11:00 am y la 1:00 pm cada día por 14 días consecutivos en sus jaulas. El agua estuvo disponible *ad libitum*.

### 5.4- Cuantificación del consumo de agua

Para los experimentos comportamentales con recompensa de agua, los sujetos experimentales fueron mantenidos bajo restricción de agua, con acceso al líquido por un total de 90 minutos por día dividido en dos: 60 minutos entre las 11:00 am y las 12:00 pm y 30 minutos durante las 3:00 pm y 3:30 pm. Una vez que los animales se

acostumbraron a este régimen de ingesta, la cantidad de agua fue cuantificada utilizando un cilindro graduado por 60 minutos entre las 11:00 am y las 12:00 pm cada día por 14 días consecutivos en sus jaulas. El alimento estuvo disponible *ad libitum*.

## 5.5- Procedimientos quirúrgicos

Se implantaron en condiciones asépticas electrodos corticales y musculares en 5 ratones KO PPH y 3 WT para el registro del EEG y EMG. La anestesia fue inducida con ketamina/xilacina (100 mg/kg/ 15mg/kg, i.p.) y mantenida con una mezcla gaseosa de isofluorano en oxígeno (0.6-1.2%) una vez que los animales fueron colocados en el marco esterotáxico. La temperatura corporal fue mantenida con una manta térmica (Gaymar Industries, USA). Cuatro tornillos de acero inoxidable con cables conductores soldados fueron implantados para el registro del EEG, dos en los huesos frontales [antero-posterior (AP): +1 mm; lateral  $\pm 1.5$  mm, relativo a bregma] y dos en los huesos parietales (AP: +1 mm; lateral  $\pm 1.5$  mm relativo a lambda.). Dos electrodos adicionales fueron colocados en los músculos de la nuca para el registro del EMG. El conjunto de terminales fue insertado en un enchufe plástico (Plastics One, USA) y adosado al cráneo con cemento dental. Se permitió un periodo de recuperación de dos semanas antes de comenzar las sesiones de entrenamiento.

## 5.6- Registro del EEG y EMG

Se realizaron registros en los animales durante diferentes tareas comportamentales y durante el ciclo sueño-vigilia espontáneo en sus jaulas. El EEG cortical fue filtrado entre 0.3 y 100 Hz con una frecuencia de muestreo de 128 Hz. El EMG fue filtrado entre 30 Hz y 3 kHz con una frecuencia de muestreo de 1 kHz. Los datos del EEG y EMG fueron digitalizados con la interface CED 1401 Plus (Cambridge Electronic Design, UK) y analizados con un ordenador utilizando el programa Spike2 (Cambridge Electronic Design, UK).

## 5.7- Entrenamiento comportamental

### 5.7.1- Comportamientos operantes

#### 5.7.1.1- Refuerzo positivo, recompensa: alimento

Todos los regímenes de entrenamiento comportamental y procesamiento de los animales para los estudios histológicos se encuentran descritos en los diagramas de las Fig. 4 y Fig. 5 al final del capítulo de metodología.

Los animales fueron sujetos al régimen de restricción calórica para mantener el 85-90% de su peso corporal original (cantidad de alimento: aproximadamente 3-3.5 g/día vs 4-4.5 g/día) y fueron expuestos diariamente a 0.5 g de pellets de alimento de precisión (Dustless Precision Pellets F0071, Bioserve). Todas las sesiones de entrenamiento y la mayoría de los experimentos fueron conducidas en este rango de peso corporal. Para algunos experimentos específicos los animales fueron mantenidos en 70-75% o 100% de su peso corporal original.

Una vez que los sujetos experimentales se estabilizaron en su nuevo peso corporal (14 días; peso promedio WT  $28.5 \pm 0.7$  g, KO PPH  $29.3 \pm 0.9$  g) se iniciaron las sesiones de entrenamiento con una semana de aclimatación a las cámaras operantes (120 min/día), seguido de dos sesiones de entrenamiento con entrega automática durante la cual un pellet de alimento fue suministrado en un intervalo variable (IV) de 1 min (IV-1min) sin contingencia con la presión de palanca (los pellets de alimento fueron suministrados a intervalos aleatorios entre 20 y 100s por el ordenador).

Posteriormente a las sesiones de aclimatamiento y entrega automática, comenzó el entrenamiento asociativo entre la presión de la palanca y la obtención de un pellet de alimento (barra operante alimento). Una vez culminada esta etapa de aprendizaje, los animales fueron colocados en un paradigma de razón fija (FR) de 1 (FR1) durante el cual recibieron un pellet de recompensa por cada accionar de palanca. Bajo los esquemas de FR se suministra una recompensa luego de un número específico de respuestas correctas. Este esquema es utilizado para incrementar y mantener un ritmo estable en las respuestas y constituye el mejor método para aprender un nuevo comportamiento. La sesión culminó



a los 30 min de iniciada o con la obtención de 20 pellets cualquiera que se cumpla primero. Cuando los animales obtuvieron 20 pellets durante los primeros 10 min en tres sesiones consecutivas se consideró completa la etapa FR1, y se incrementó la dificultad a FR3 y finalmente a FR5 y la duración de la sesión experimental se extendió a 60 min. Una vez completado el entrenamiento en el FR5 (obtención de 20 pellets durante los primeros 15 min en tres sesiones consecutivas) los animales fueron transferidos al paradigma de razón progresiva (PR) comenzando en PR1 y la duración de la sesión fue incrementada a 120 min. En este tipo de esquema progresivo el refuerzo es presentado luego de completar un cierto número establecido de presiones de palanca. Este número se incrementa luego del suministro de cada recompensa. En nuestro esquema inicial PR1, el número de presiones de palanca se ve incrementado en 1 (son necesarias 1 presión para la obtención de la primer recompensa, 2 para la segunda, 3 para la tercera, etc.). Este esquema comportamental se utiliza en general para evaluar la motivación de los sujetos experimentales para obtener la recompensa. El siguiente escalón en el entrenamiento es PR3 y finalmente PR5, con cinco sesiones experimentales en cada uno de los protocolos. No se estableció un límite al número de pellets que los animales pudieron obtener en PR3 y PR5, aunque las sesiones en PR5 fueron programadas para terminar prematuramente si el animal no acciona la palanca durante 15 min consecutivos (terminación temprana). El peso promedio de los WT y KO PPH al final del entrenamiento fue  $29.1 \pm 1.0$  g y  $28.7 \pm 1.0$  g, respectivamente.

Para los animales que completaron los 120 min programados para la sesión, la razón del número de presiones de palanca por pellet (razón final) fue utilizada para el análisis. Para los animales que no completaron los 120 min en PR5, el punto de quiebre (PQ) se definió operacionalmente como el número de presiones de palanca alcanzado que correspondió a la obtención del último pellet. Para el análisis estadístico se utilizó el promedio del PQ/razón final de las 3 últimas sesiones en PR5. Se suministró alimento luego de cada sesión experimental para mantener a los animales en sus respectivos pesos corporales (70-75%, 85-90%, o 100% de su peso corporal inicial).

Las sesiones experimentales barra operante alimento fueron conducidas durante la fase diurna y nocturna. Para la fase diurna las sesiones fueron conducidas 120 min luego

del encendido de las luces (entre las 9:00 am y la 1:00 pm), y para la fase nocturna las sesiones comenzaron 120 min luego del apagado de las luces (entre las 9:00 pm y la 1:00 am).

#### 5.7.1.2- Refuerzo positivo, recompensa: agua

Los animales fueron entrenados para obtener una recompensa de agua (barra operante agua) con un régimen similar al utilizado para la recompensa de alimento. Se limitó el acceso al agua a 90 min diarios, dividido en dos bloques temporales de 60 min y 30 min separados 4 horas entre si por 14 días. El proceso de aclimatación a la cámara operante se llevó a cabo por una semana en sesiones de 60 min diarias. A continuación, una sesión de 60 min por día durante 2 días de entrenamiento magazine en la cual los animales tuvieron acceso al líquido durante 4s por dispensa en un paradigma IV-1 min y como resultado de presionar la palanca. En la segunda fase del entrenamiento los animales fueron condicionados y luego colocados en un régimen FR1 en sesiones de 60 min. Se consideró completo el régimen FR1 cuando los animales presionaron la palanca por lo menos 100 veces en 60 min en tres sesiones consecutivas. La dificultad fue aumentada a FR3 y luego FR5. Tras completar exitosamente el nivel FR5 (por lo menos 500 presiones de palanca en 60 min), los animales fueron colocados en un esquema PR siguiendo el mismo procedimiento que el utilizado para el paradigma barra operante alimento, aunque la sesión experimental duró 60 min. El acceso al líquido presentado como recompensa fue restringido a 3s en el paradigma PR. Se condujeron 5 sesiones en cada paradigma (PR1 y PR3). El PQ/razón final se definió según el mismo criterio utilizado en el paradigma barra operante alimento y las tres últimas sesiones fueron promediadas y utilizadas para el análisis estadístico.

#### 5.7.1.3- Refuerzo negativo: choque eléctrico

Los animales fueron aclimatados a la cámara operante por 120 min diarios durante 7 días. Se determinó luego el umbral de respuesta al choque eléctrico para cada animal variando la intensidad del estímulo desde 0.06 hasta 0.4 mA (en incrementos de

0.05 mA) utilizando el método de Turner modificado (Turner et al., 1967). Se realizó una serie de choques eléctricos con intensidad ascendente seguida de una serie descendente y finalmente una serie al azar. Cada estímulo tuvo una duración de 1s, con un intervalo de 15s entre estímulo y una pausa de 30s entre las series. Un observador ciego a la magnitud del estímulo cuantificó las respuestas en una escala de 0 a 4 (0 = sin respuesta, 1 = titubeo, 2 = pequeño salto, movimiento hacia adelante o atrás, 3 = correr, 4 = saltar, las cuatro extremidades elevadas del suelo al mismo tiempo). Se eligió una intensidad para cada animal que produjo una respuesta tipo 2.

Los animales fueron condicionados para eludir el choque eléctrico mediante la presión de la palanca (barra choque eléctrico). Luego fueron puestos en un esquema FR1 según el siguiente protocolo: 30s luego de haber sido colocados en la jaula se enciende la clave visual verde de advertencia acompañada por un tono de 80 dB (2 kHz) por 10s indicando el comienzo de la sesión. Quince segundos más tarde se enciende una señal de advertencia que consiste en un tono de 80 dB y 4 kHz acompañado por la clave visual roja por 10s. Si el animal presiona la palanca al menos una vez dentro de estos 10s obtiene una pausa de 20s antes de que la siguiente señal de advertencia comience. De no accionar la palanca recibe un choque eléctrico. Luego de recibir cada estímulo se establece una pausa de 5s antes de que un nuevo ciclo señal de advertencia-choque eléctrico comience. La sesión termina cuando el animal no logra presionar la palanca en 10 ciclos consecutivos señal de advertencia-choque eléctrico. Las sesiones de entrenamiento tuvieron una duración de 30 min. El entrenamiento continuó hasta que los sujetos experimentales eludieron por lo menos el 80% de los choques eléctricos programados para la sesión. El número de presiones de palanca necesarios para eludir el choque eléctrico fue luego incrementado a FR2, FR3 y finalmente FR5 y la duración de la sesión a 60 min. La intensidad del estímulo fue incrementada en escalones discretos de 0.1 mA (hasta un máximo de 0.4 mA) cada vez que el animal no alcanzó la razón necesaria en cinco sesiones consecutivas. Una vez completada con éxito la etapa FR5 los animales fueron transferidos al paradigma PR y la duración de las sesiones fue extendida a 120 min. Para los paradigmas PR que requieren múltiples presiones de palanca para eludir el choque eléctrico, cada presión de palanca dentro del ciclo señal de advertencia-choque eléctrico pospone el choque por otros 10s hasta que se complete la razón, y luego

obtiene una pausa de 20s antes del siguiente ciclo señal de advertencia-choque eléctrico comience. Las presiones de palanca durante los 20s de pausa posponen el choque eléctrico por un período adicional de 10s como ocurre durante el período de advertencia, y es computado como válido hacia la razón del siguiente ciclo. Con el objetivo de minimizar el número de choques eléctricos administrados y mantener un incremento en el número de presiones necesarias para eludir el estímulo, se utilizó un paradigma PR modificado aplicando una fórmula exponencial para generar los escalafones (Grasing et al., 2003). Por ejemplo en el PR1-10 los primeros 10 estímulos pueden ser evitados por 1 presión de la palanca, los siguientes 9, 2 presiones, los siguientes 8, 3 presiones, y así sucesivamente. El mismo principio fue aplicado para los paradigmas PR2-10 y PR3-10. La sesión culmina si el animal no logra eludir 10 choques eléctricos consecutivos. Completado el esquema PR 2-10, se realizaron 5 sesiones en el paradigma PR3-10 y el PQ/razón final de las tres últimas sesiones fue promediado y utilizado para el análisis estadístico. Las sesiones bajo este paradigma experimental se realizaron durante la fase diurna y la fase nocturna en el mismo esquema previamente utilizado.

#### *5.7.2- Comportamientos no operantes*

##### *5.7.2.1- Control cámara operante*

Los sujetos experimentales fueron mantenidos en el 85-90% de su peso corporal original siguiendo el mismo protocolo utilizado en el paradigma barra operante alimento. Una vez estabilizados en el nuevo peso corporal, los animales fueron colocados en las cámaras operantes por 120 minutos diarios comenzando 2 h luego del inicio de la fase diurna (entre las 9:00 am y la 1:00 pm) o 2 h luego del inicio de la fase nocturna (entre las 9:00 pm y la 1:00 am). Tanto la luz general como la luz roja de clave visual se mantuvieron encendidas durante la sesión en la fase diurna. Las sesiones experimentales fueron conducidas por 5 semanas consecutivas. Durante las sesiones no se suministró alimento, agua o choque eléctrico.

### 5.7.2.2- Recompensa de alimento esperada y no esperada.

Los animales fueron mantenidos en el 85-90% de su peso corporal original siguiendo el mismo protocolo utilizado previamente y sustituyendo además 1/3 de la ración de alimento por los mismos pellets utilizados en el paradigma barra operante alimento por 14 días. Fueron luego aclimatados a la cámara operante (120 min por día) con la luz general encendida por 7 días y divididos en dos grupos experimentales. En el primer grupo, *recompensa de alimento esperada*, los animales fueron colocados en la cámara operante y la recompensa de alimento fue suministrada en un esquema IV-4 min. Las sesiones experimentales fueron conducidas diariamente por 4 semanas durante la fase diurna. En el segundo grupo, *recompensa de alimento no esperada*, los animales fueron colocados en la cámara operante diariamente por 4 semanas y la recompensa fue suministrada solamente el día en que los animales fueron sacrificados empleando el mismo esquema (IV-4 min). En este grupo experimental, los pellets fueron dispensados a una bandeja plástica colocada en el piso de la jaula en lugar del receptáculo de manera de que los sujetos experimentales pudieran hallar el alimento una vez suministrado. En ambos casos, no fue necesaria ni se registró ninguna presión de la palanca para obtener la recompensa. Todas las sesiones experimentales tuvieron una duración de 120 min.

### 5.7.2.3- Choque eléctrico no evitable

Los animales fueron aclimatados a la cámara operante en sesiones diarias de 120 min por 7 días. Seguidamente se determinó el umbral de intensidad del choque eléctrico utilizando el mismo procedimiento previamente descrito para el paradigma barra choque eléctrico. Para cada animal se eligió una intensidad que provocó una respuesta de tipo 2 (rango de 0.25mA a 0.4 mA). Los animales fueron colocados en la cámara operante por 120 min diarios por 4 semanas. Solamente el día del sacrificio se administró un choque eléctrico no evitable (duración 1s) en un esquema de intervalo fijo (IF) de 5 min (IF-5 min) durante toda la sesión experimental (120 min).

## 5.8- Técnicas inmunohistoquímicas

Las tinciones inmunohistoquímicas, a menos que se indique lo contrario, fueron realizadas en secciones libres en flotación, con agitación constante y siguiendo un protocolo de incubación secuencial: anticuerpo primario, anticuerpo secundario, complejo avidina-biotina, revelado. A menos que se indique lo contrario, todas las reacciones fueron llevadas a cabo a temperatura ambiente y el revelado fue realizado con el método del tetrahydrocloridrato de diaminobencidina (DAB) que consiste en la inmersión del tejido en una solución con 0.02% DAB y 0.03% de peróxido de hidrógeno por 5-10 min lo que resulta en un precipitado marrón en las neuronas inmunopositivas. Para el caso específico de la proteína Fos se agregó 0.6% sulfato de níquel-amonio a la solución de revelado DAB (DAB/Ni) que resulta en un precipitado negro. El doble inmunomarcaje Fos/Hcrt se realizó de forma secuencial, primero detectando Fos y luego Hcrt. Se utilizaron 11 grupos experimentales en diferentes paradigmas comportamentales, 8 en la fase diurna y 3 en la fase nocturna (n=4 animales por grupo). Todos los animales fueron sacrificados inmediatamente después de culminadas las sesiones experimentales (todas con una duración de 120 min).

### 5.8.1- *Procesamiento del tejido*

Los animales fueron anestesiados con nembutal (100 mg/kg, i.p.) y sometidos a perfusión transcardíaca con 0.03 l de solución tampón fosfato salina (BFS; 0.1M, pH 7.4) heparinizada (1000 U/L), seguida de 0.07 l de BFS con 4% paraformaldehído (PF). Los cerebros fueron disecados y colocados en BFS con 4% PF por 15 min. Luego de la postfijación fueron transferidos a BFS con sucrosa al 20% por 24 h y luego al 30% por 48 h, embebidos medio histológico (OCT, Sakura Finetek Inc.), congelados con hielo seco y cortados en el plano coronal a 35  $\mu$ m de espesor utilizando un criostato (1800 Cryocut, Reichert Jung). Cada sección fue colocada en un pocillo de una placa con 6 pocillos conteniendo BFS. La primera sección fue colocada en el primer pocillo de la placa; las secciones subsecuentes fueron colocadas siguiendo un orden serial en los pocillos restantes. La sección número 7 fue colocada en el pocillo número 1 y el procedimiento

fue repetido hasta que todo el cerebro fue seccionado. Los procedimientos IHQ se realizaron de inmediato y las secciones no utilizadas fueron colocadas en solución crioprotectora y almacenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Para la doble inmunodetección de Fos e Hcrt (Fos/Hcrt) las secciones hipotalámicas fueron tratadas con 0.5%  $\text{H}_2\text{O}_2$  por 30 min, enjuagadas e incubadas por 120 min en BFS con 0.3% Tritón-X (BFST) con 1.5% de suero normal de cabra [normal goat serum, NGS (Vector Laboratories, Burlingame, CA)], seguido de una solución con el anticuerpo primario anti-fos generado en conejo (PC-38, Calbiochem) 1:10000 en BFST con 1.5% de NGS por 24 h. Luego de enjuagadas, las secciones fueron incubadas con el anticuerpo secundario biotilado anti-conejo generado en cabra [goat anti-rabbit, GAR (Jackson Immunoresearch Laboratories)] 1:600 por 120 min en BFST seguido del Complejo Avidina-Biotina [Avidin-Biotin Complex, ABC (Vector Laboratories)] estándar 1:400. El revelado fue realizado con DAB/Ni. Seguidamente, las secciones fueron incubadas en anticuerpo primario anti-Hcrt-2 generado en conejo [rabbit anti-Hcrt-B, (H003-32, Phoenix Pharmaceutical)] 1:10000 en BFST con 1.5% de NGS por 24 h, seguido de anticuerpo secundario GAR 1:600, ABC, 1:400 y revelado con DAB.

#### *5.8.2- Paradigmas comportamentales; grupos experimentales*

- 1) animales mantenidos en 85-90 % de su peso corporal y entrenados en el paradigma barra operante alimento hasta el nivel PR5 durante la fase diurna (PR Alimento).
- 2) animales mantenidos en 85-90 % de su peso corporal y entrenados en el paradigma barra operante alimento hasta el nivel PR5 durante la fase nocturna (PR Alimento).
- 3) animales entrenados en el paradigma barra choque eléctrico hasta el nivel PR3-10 con el estímulo activo el día del sacrificio durante la fase diurna (Eludir Choque Eléctrico).
- 4) animales entrenados en el paradigma barra choque eléctrico hasta el nivel PR3-10 con el estímulo activo el día del sacrificio durante la fase nocturna (Eludir Choque Eléctrico).

- 5) animales mantenidos entre 85-90% del peso corporal aclimatados a la cámara operante durante la fase diurna (Control Cámara Operante).
- 6) animales mantenidos entre 85-90% del peso corporal aclimatados a la cámara operante durante la fase nocturna (Control Cámara Operante).
- 7) animales aclimatados a la cámara operante y entrenados a recibir una recompensa de alimento en la cámara operante sin contingencia con la palanca (Alimento Esperado).
- 8) animales aclimatados a la cámara operante que reciben una recompensa de alimento solamente el día del sacrificio sin contingencia con la palanca (Alimento No Esperado).
- 9) animales aclimatados a la cámara operante que reciben choques eléctricos no evitables solamente el día del sacrificio (Choque Eléctrico No Evitable).
- 10) animales en el paradigma barra choque eléctrico hasta el nivel PR3-10 con el estímulo inactivo el día del sacrificio (Choque Eléctrico Extinción).
- 11) animales mantenidos en 85-90 % de su peso corporal y entrenados en el paradigma de refuerzo positivo con alimento hasta el nivel PR5 sin luz general durante la sesión experimental en la fase diurna (Día Subjetivo).

## 5.9- Cuantificación del número de células

El número de neuronas inmunoreactivas para Hcrt (Hcrt<sup>+</sup>) y para Fos/Hcrt (Fos<sup>+</sup>/Hcrt<sup>+</sup>) fueron contadas cada tercera sección coronal en el sector tuberal y mamilar del hipotálamo. Se utilizó un microscopio Nikon Eclipse 80i con portaobjetos motorizado en los tres ejes, cámara de video, interface Neurolucida y programa Stereoinvestigator (MicroBrightField). La cuantificación fue realizada ciego a la condición experimental utilizando un objetivo X60. Los criterios anatómicos utilizados para la parcelación del hipotálamo se basan en el atlas del cerebro de ratón (Paxinos G., 2001). El área perifornical (PFA) fue definida como la región alrededor del fornix (140 µm desde el perímetro de la estructura), la subdivisión medial (hipotálamo medial, MH) fue el área



comprendida entre el límite medial del fornix hasta el tercer ventrículo (3V) y la subdivisión lateral (hipotálamo lateral, LH) se extendió desde el límite medial del fornix hasta el límite lateral del hipotálamo. Se cuantificó el número total del número de neuronas Hcrtérgicas y de estas las neuronas doble inmunopositivas (Fos<sup>+</sup>/Hcrt<sup>+</sup>).

## 5.10- Análisis de datos

Los datos obtenidos de los grupos experimentales comportamentales e inmunohistoquímicos fueron procesados con el análisis de ANOVA de dos vías seguidos del test Newman-Keuls para comparaciones *post hoc* o test de *t*. Los datos se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM) Todos los ensayos fueron de dos colas. Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos cuando  $p < 0.05$ . El análisis del espectro del EEG fue realizado en épocas consecutivas de 4s utilizando la transformada rápida de Fourier (Hanning window, bandas de 0.25 Hz) con el programa Spike2. Para comparar el espectro entre los estados comportamentales, el espectro de cada estado fue dividido por el espectro total del REM y presentado como el porcentaje del espectro REM. Para el análisis se utilizaron las frecuencias entre 0.5 y 20 Hz. El análisis de las sesiones experimentales en los paradigmas comportamentales fueron cuantificados por un observador entrenado y ciego al genotipo y a la condición experimental.

## Comportamientos Operantes: Diagramas de las sesiones de entrenamiento

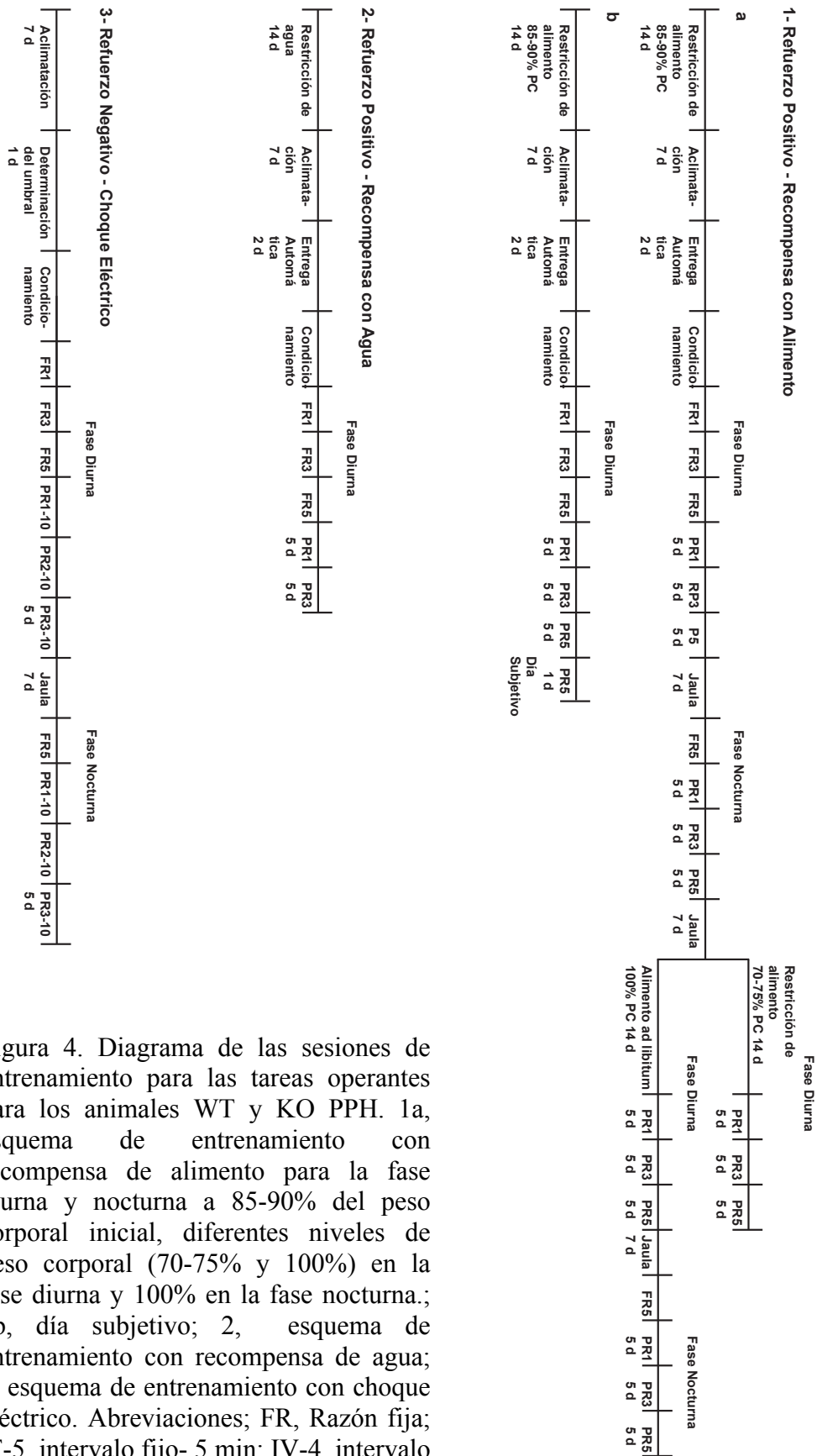
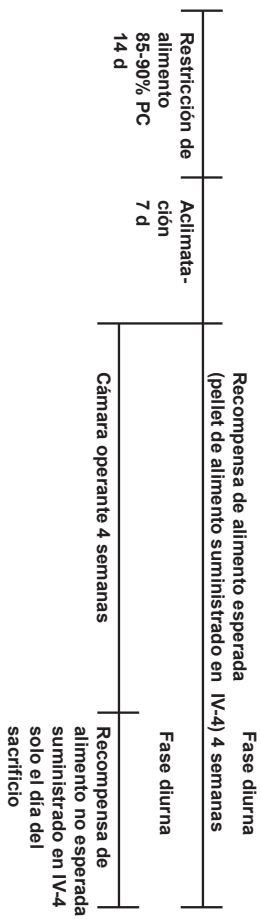


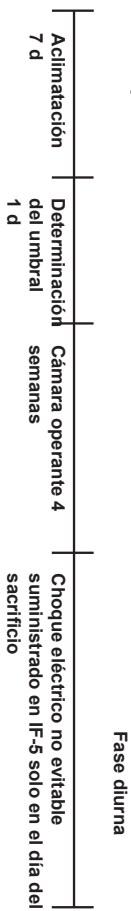
Figura 4. Diagrama de las sesiones de entrenamiento para las tareas operantes para los animales WT y KO PPH. 1a, esquema de entrenamiento con recompensa de alimento para la fase diurna y nocturna a 85-90% del peso corporal inicial, diferentes niveles de peso corporal (70-75% y 100%) en la fase diurna y 100% en la fase nocturna.; 1b, día subjetivo; 2, esquema de entrenamiento con recompensa de agua; 3, esquema de entrenamiento con choque eléctrico. Abreviaciones; FR, Razón fija; IF-5, intervalo fijo- 5 min; IV-4, intervalo variable 4 min; PC, peso corporal.; PR, Razón progresiva.

## Comportamientos no operantes: Diagramas de entrenamiento.

### 1 - Recompensa de alimento esperada y no esperada.



### 2 - Choque eléctrico no evitable.



### 3 - Control de cámara operante

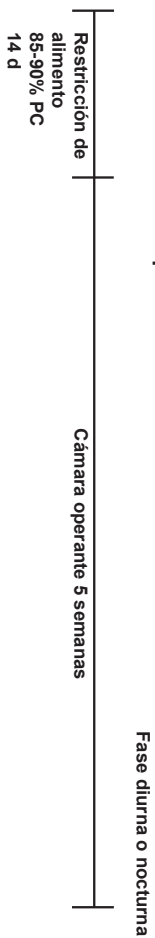


Figura 5. Diagrama de las sesiones de entrenamiento para las tareas no operantes para los animales WT 1, recompensa de alimento esperada y no esperada; 2, choque eléctrico no evitable; 3, control de cámara operante. Abreviaciones; IF-5, intervalo fijo- 5 min; IV-4, intervalo variable 4 min; PC, peso corporal.

## 6- Resultados

### 6.1- Recompensa positiva, animales WT vs KO PPH

#### 6.1.1- Tarea operante para la obtención de una recompensa de alimento

Los animales WT así como los KO PPH aprendieron la tarea de presionar la barra para obtener un pellet de alimento indicando que ambos genotipos adquieren la tarea operante para la obtención de una recompensa. Los animales WT y KO PPH asimilaron la tarea con la misma rapidez y no se observaron diferencias entre los genotipos en el número de sesiones requeridas para alcanzar la etapa FR5 ( $9.1 \pm 1.3$  para los WT y  $9.0 \pm 1.3$  para los KO PPH ) o en el tiempo que demoraron en adquirir 20 pellets en FR5 ( $13.3 \pm 1.9$  min para los WT y  $13.8 \pm 2.2$  min para los KO PPH ) en la fase diurna (fase inactiva). Esto indica que no hay diferencias en el aprendizaje de esta tarea. Sin embargo, cuando la adquisición de la recompensa se tornó cada vez más difícil de obtener (en el esquema PR), los animales KO PPH mostraron un rendimiento marcadamente inferior a sus compañeros de camada WT durante la fase diurna. Esto se ilustra en los registros acumulativos de la Fig. 6a,b (a, animal WT, número total de presiones: 2817; b, animal KO PPH, número total de presiones: 456). Se detectó un efecto significativo de genotipo ( $p < 0.01$ ), un efecto significativo de la fase circadiana ( $p < 0.02$ ) y un efecto significativo en la interacción de ambos factores ( $p < 0.01$ ). Los animales KO PPH mostraron una reducción significativa en el PQ/razón final alcanzada en el esquema PR5 ( $52.2 \pm 6.6$  comparados con  $141.3 \pm 15.8$  para los animales WT,  $p < 0.01$ , test Newman-Keuls) (Fig. 6c).

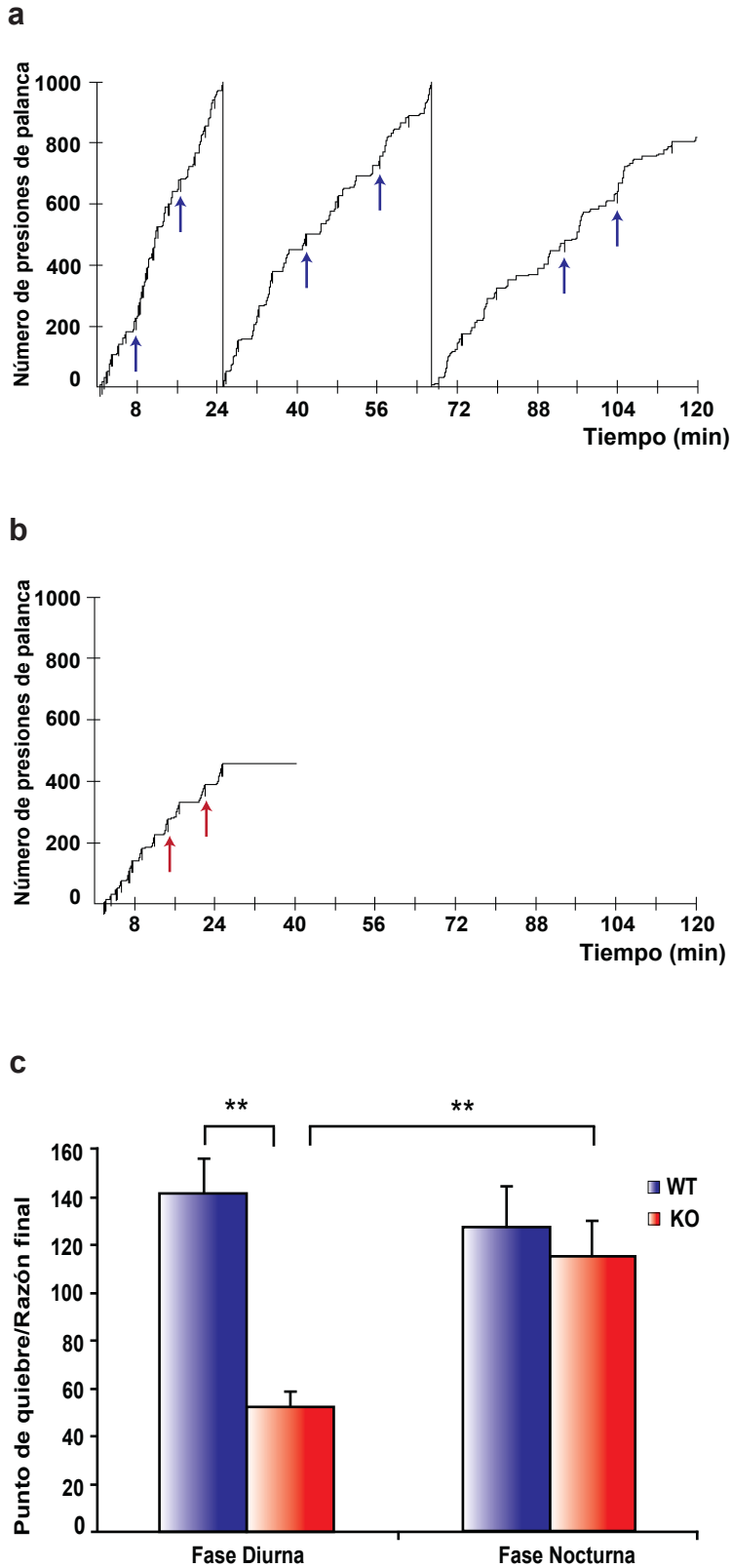


Figura 6. Comportamiento operante de los ratones WT y KO PPH en el paradigma experimental con recompensa de alimento en el esquema progresivo 5. **a,b**, Ejemplos representativos de los registros acumulativos de un animal WT y un animal KO PPH. Las rayas verticales en los registros acumulativos indican el suministro de un pellet de alimento. Las flechas azules (WT) y rojas (KO PPH) indican ejemplos de los mismos. La sesión del ratón KO PPH fue terminada prematuramente debido a que el animal no accionó la palanca por 15 min consecutivos. **c**, Rendimiento de los animales WT y KO PPH durante la tarea comportamental durante la fase diurna (WT, n = 8; KO PPH, n = 8) y nocturna (WT, n = 7; KO PPH, n = 7) \*\*= p < 0.01.

Durante las sesiones experimentales se observaron frecuentes pausas en el comportamiento de los animales KO PPH y eventualmente todos dejaron de accionar la palanca por 15 min consecutivos, cumpliendo con el criterio establecido para la terminación prematura (antes de los 120 min programados) de la sesión experimental (promedio de la duración de las sesiones de los animales KO PPH  $45.6 \pm 4.7$  min, incluyendo los 15 min de inactividad consecutivos). Un análisis detallado de las sesiones reveló que los animales WT y KO PPH mostraron el mismo nivel de rendimiento durante los primeros 10 min de la sesión experimental (Fig. 7a). Sin embargo a medida que la sesión progresó, los animales KO PPH mostraron un descenso constante en el número de presiones de palanca comparados con los animales WT. Se encontró un efecto significativo del genotipo ( $p < 0.02$ ) y del tiempo en la sesión ( $p < 0.01$ ). Las frecuentes pausas en el comportamiento operante de los KO PPH se hicieron evidentes en el análisis de los intervalos entre las presiones de palanca; éstos animales presentaron un mayor porcentaje de intervalos largos entre presiones, en especial aquellos con una duración mayor a 2 s (todos  $p < 0.05$ , test *post hoc* de Newman-Keuls)(Fig. 7b).

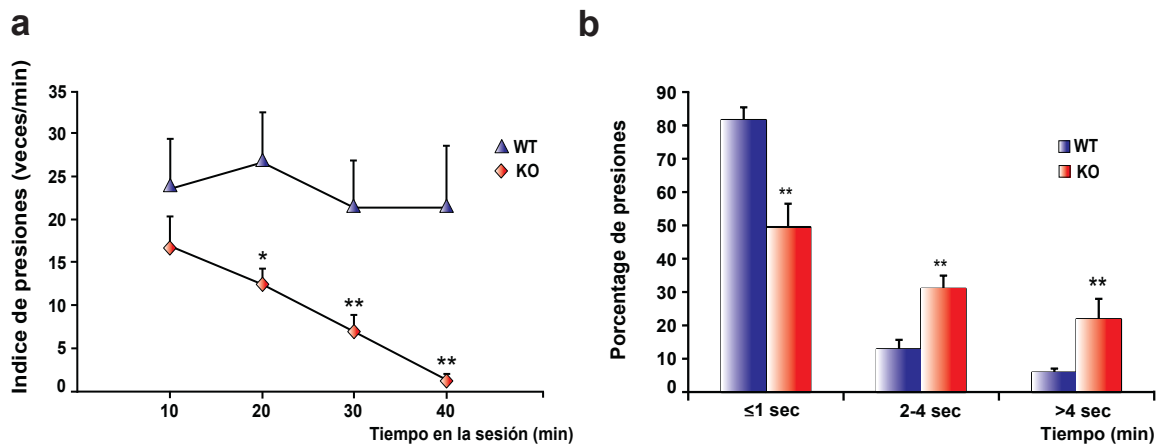


Figura 7. Rendimiento de los animales WT y KO PPH a medida que progresa la sesión experimental. **a**, El rendimiento de los WT (triángulos azules) y KO PPH (rombos rojos) fueron analizados en intervalos de 10 min durante los primeros 40 min de las sesiones experimentales en la fase diurna. **b**, Comparación de los intervalos entre presiones de palanca en la fase diurna para animales WT (n = 8) y KO PPH (n = 8). Los valores representan el porcentaje de presiones cada categoría temporal con respecto al total de presiones durante la sesión.

Es posible que la reducción en el rendimiento de los ratones KO PPH luego de la fase inicial de la sesión experimental se deba al saciamiento prematuro de estos animales. Sin embargo esta explicación parece improbable ya que el número de pellets de alimento que los animales consumieron en el esquema de PR5 fue mínimo, en promedio 11 pellets o 0.22 g, antes de culminar la sesión comparado con los 2.2 g de alimento que consumen en un periodo de 120 min a la misma hora del día cuando tienen libre acceso al alimento sin necesidad de trabajar para obtenerlo. Esta cantidad de alimento no es significativamente diferente a la consumida por sus compañeros de camada WT en sus jaulas, durante el mismo periodo de 120 min a la misma hora del día ( $p=0.3$  test de  $t$ ) (Fig. 8). Por ello, la saciedad temprana de los ratones KO PPH no sería la explicación de la terminación prematura de las sesiones experimentales observada en estos animales.

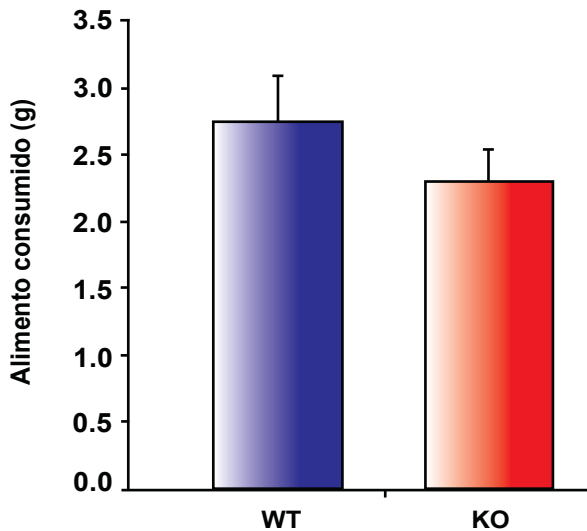


Figura 8. Cantidad de alimento consumida por ambos genotipos. Promedio de alimento consumido por los WT y KO PPH durante 120 min (11:00 A.M. 1:00 P.M.) en sus jaulas con libre acceso al alimento en la fase diurna ( $n = 7$  para cada genotipo).

Cuando las sesiones experimentales fueron conducidas durante la fase nocturna (fase activa), los animales WT tuvieron un rendimiento similar al registrado durante las

sesiones en la fase diurna. En cambio, los ratones KO PPH mostraron un aumento dramático en su rendimiento (a una razón final de  $115.0 \pm 15.0$ ) comparado con la fase diurna ( $p < 0.01$ , test *post hoc* de Newman-Keuls)(Fig. 6c). Los valores obtenidos por estos animales durante la fase nocturna fueron similares a los observados en los animales WT. La Fig. 9 ilustra un ejemplo característico del registro acumulativo del comportamiento operante durante una sesión experimental de un mismo animal KO PPH en las dos fases del ciclo circadiano. El trazo en rojo muestra el registro del comportamiento durante la fase diurna (número total de presiones, 351) y el trazo en azul durante la fase nocturna (total de presiones, 2837).

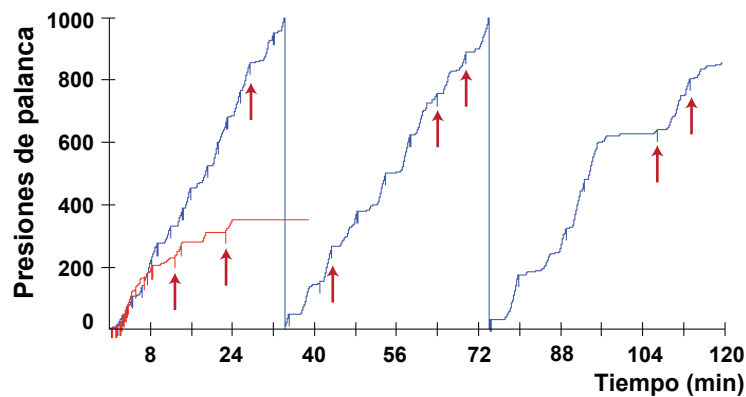


Figura 9. Diferencia circadiana en el rendimiento de un animal KO PPH. Ejemplo de un registro acumulativo de un mismo animal KO PPH realizando la tarea barra operante alimento durante la fase diurna y la fase nocturna. Las rayas verticales en los registros acumulativos indican el suministro de un pellet de alimento. Las flechas rojas indican ejemplos de los mismos.

Se utilizó un segundo grupo de animales para determinar si la diferencia en el rendimiento de los ratones entre las dos fases no es debida a la secuencia en que las sesiones experimentales fueron conducidas. El rendimiento de los KO PPH fue igualmente deficiente en la fase diurna una semana antes de las sesiones en la fase nocturna (razón final  $43.0 \pm 6.1$ ) así como una semana después de culminadas las



sesiones nocturnas (razón final  $50.0 \pm 5.0$ ). El rendimiento durante la fase nocturna (razón final  $110.0 \pm 10.0$ ) fue significativamente mayor que en ambas sesiones diurnas ( $p < 0.01$  test *post hoc* de Newman-Keuls).

#### 6.1.2- Registro del EEG y EMG durante diferentes tareas comportamentales

Todos los animales KO PPH mostraron pausas comportamentales durante las sesiones experimentales barra operante alimento. Durante estas pausas los animales interrumpieron las presiones de palanca y asumieron una posición agazapada. Este comportamiento se observó tanto en la fase diurna como en la fase nocturna, con un número de pausas significativamente mayor durante la fase diurna comparado con la fase nocturna ( $15.7 \pm 3.1$  vs  $5.9 \pm 1.4$  veces/hora respectivamente;  $n=7$  en cada grupo;  $p = 0.02$ , test de *t*). Las pausas duraron desde unos segundos a varios minutos (Fig. 10a,b). Durante las pausas cortas ( $<20$  s), el EEG se caracterizó por la presencia del ritmo theta (4-8 Hz) con un EMG de baja amplitud (la reducción en el tono muscular fue acompañada de un cambio en el espectro de frecuencias del EEG), indicando un estado de vigilia con somnolencia (Scammell et al., 2009) (Fig. 10a,1,2 y 3). Los ojos de los animales permanecieron abiertos y se registró un mayor tono muscular que durante el sueño. Las pausas cortas nunca fueron acompañadas de completa atonía muscular como ocurre durante el sueño REM (Fig. 10b) y por lo tanto no cumplen con los criterios establecidos para su clasificación como cataplejia murina (ibid). Durante las pausas largas, los animales realizaron frecuentes transiciones al sueño NREM, que ocasionalmente condujo al sueño REM con completa atonía muscular (Fig. 10b). El espectro de frecuencias durante estas pausas representa una mezcla de estados que se correlaciona más al sueño NREM ( $r = 0.95$ ) y a la vigilia ( $r = 0.86$ ) que al sueño REM ( $r = 0.56$ ) (Fig. 11). Las pausas comportamentales ocurrieron sobre o en la vecindad de la palanca (74%) y con menos frecuencia en uno de los rincones de la cámara operante (14%) o en la bandeja para dispensar alimento (sobre ella o en su vecindad; 12%).

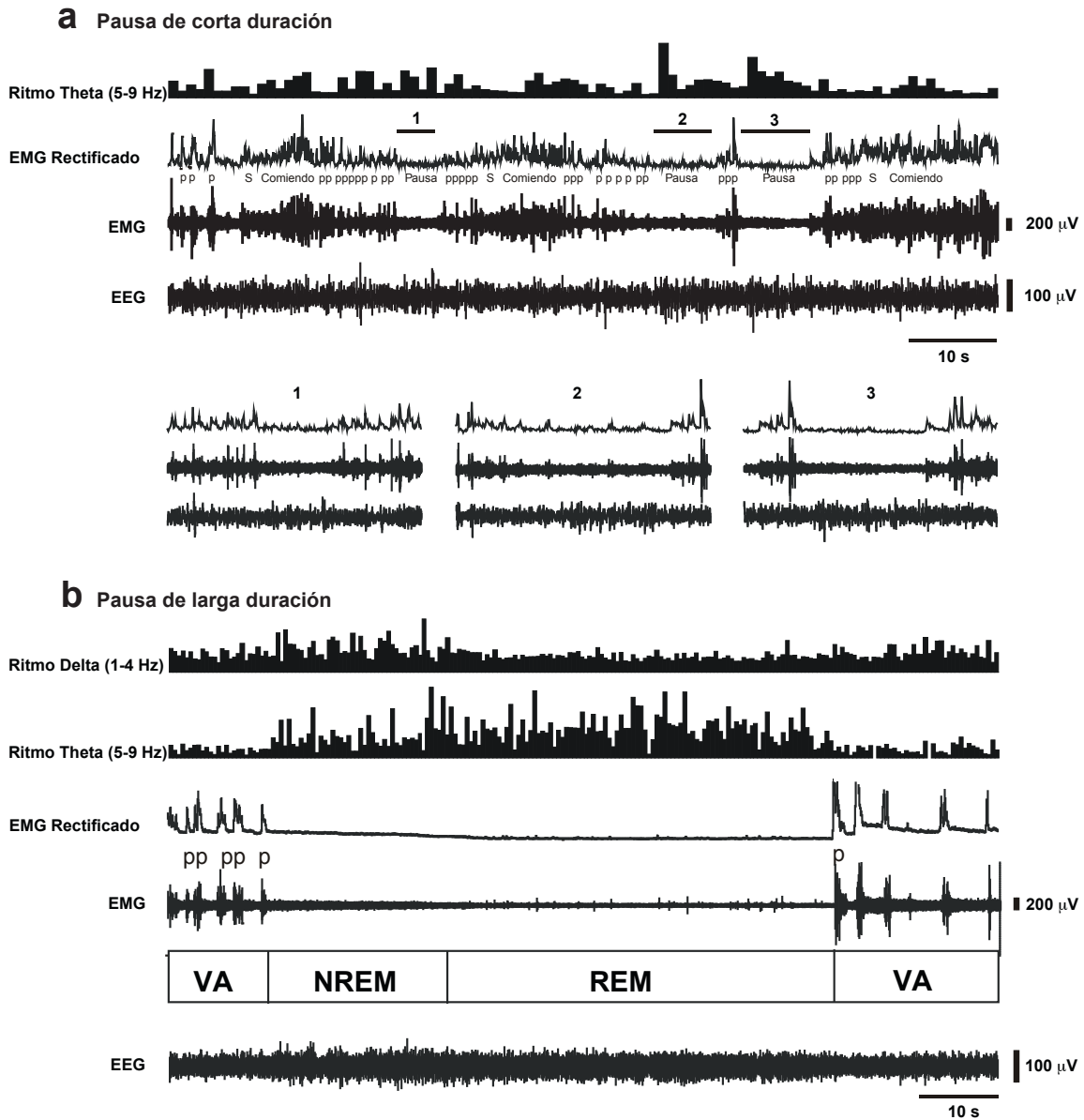


Figura 10. EEG, espectro de frecuencias del EEG y EMG de animales KO PPH durante los comportamientos operantes. **a**, EEG, EMG y el espectro de potencia de la frecuencia theta de un ratón KO PPH exhibiendo una pausa corta (1,2,3) durante la tarea barra operante alimento en el esquema PR5 durante la fase diurna. Debajo se muestran las pausas a mayor aumento. p, presión de la palanca; s, suministro de un pellet de alimento. **b**, El mismo animal KO PPH durante una pausa larga que condujo al sueño NREM y sueño REM durante el misma tarea; VA, vigilia activa.

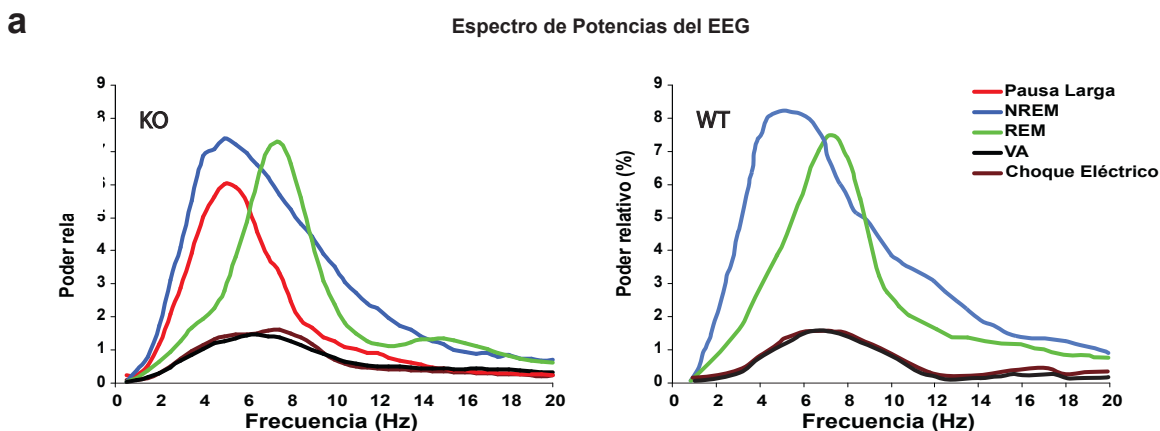


Figura 11. Espectro del EEG expresado como poder relativo de sueño REM de un animal KO PPH durante las pausas de larga duración observadas durante la tarea barra operante alimento en el esquema de razón progresiva 5 (PR5), sueño NREM, sueño REM, vigilia activa (VA) y barra choque eléctrico. Se muestra un registro de un animal WT bajo las mismas condiciones para comparación.

### 6.1.3- Efecto del incremento en la motivación sobre la tarea operante para la obtención de una recompensa de alimento

Se evaluaron los efectos del incremento en la motivación para obtener la recompensa de alimento mediante la manipulación del peso corporal de los animales de ambos genotipos. Culminados los ensayos en PR5 un grupo de animales (n=3 para cada genotipo) fue sometido a restricción calórica adicional para alcanzar un 70-75% de su peso corporal inicial, mientras que a un segundo grupo de animales (n=3 para cada genotipo) se les permitió libre acceso al alimento hasta que se estabilizaron en su peso *ad libitum* (Fig. 4). Como fuera anticipado, el rendimiento de los animales durante la fase diurna dependió significativamente del genotipo ( $p < 0.0001$ ) y del peso corporal ( $p < 0.0001$ ) con una interacción significativa entre ambos factores ( $p < 0.01$ ) (Fig. 12a).

Cuando el peso corporal fue reducido al 70-75% del valor original, se observó un aumento significativo del rendimiento de los animales WT ( $p < 0.05$ , test *post hoc* de Newman-Keuls) (Fig. 12a). Los animales KO PPH mostraron cierto nivel de progreso en

este nivel de peso corporal, aunque su rendimiento fue significativamente menor que los WT ( $p < 0.01$  test *post hoc* de Newman-Keuls)(Fig. 12a). El rendimiento de los animales WT en ambas fases del ciclo circadiano en su peso *ad libitum* fue significativamente menor que el observado a 85-90% de su peso original ( $p < 0.01$  y  $p < 0.05$  durante la fase diurna y nocturna respectivamente; test *post hoc* de Newman-Keuls)(Fig. 12a,b). En contraste, los animales KO PPH no fueron afectados por el aumento en el peso corporal, mostrando el mismo nivel de bajo rendimiento que se observó en el 85-90% del peso *ad libitum* (Fig. 12a), Basados en los resultados de la fase diurna, no se realizaron sesiones experimentales con los animales a 70-75% del peso corporal inicial durante la fase nocturna.

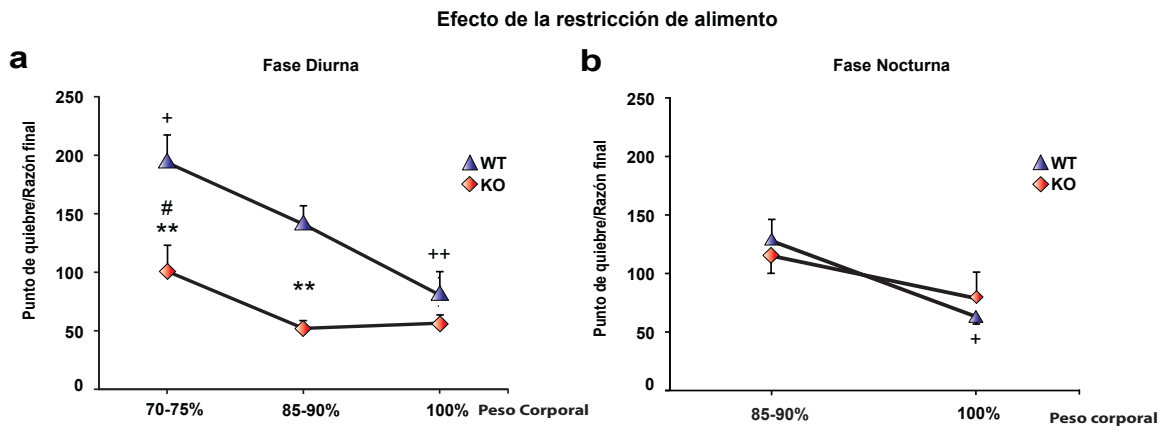


Figura 12. Efecto del peso corporal en el comportamiento operante. **a**, Animales WT y KO PPH durante la fase diurna a 100%, 85-90% y 70-75% de su peso corporal inicial (\*\* $p < 0.01$  relativo a WT, # $p < 0.02$  para los KO PPH relativo al peso a 85-90% del peso, + $p < 0.05$ , ++ $p < 0.01$  para WT relativo a 85-90% del peso, test *post hoc* de Newman-Keuls). **b**, Diferencia en el rendimiento de los animales WT y KO PPH en la fase nocturna bajo dos pesos corporales distintos (+ $p < 0.05$  test *post hoc* de Newman-Keuls).

#### 6.1.4- Tarea operante para la obtención de una recompensa de agua

Ambos genotipos aprendieron la tarea al mismo ritmo, sin diferencia significativa en el número de sesiones que les llevo alcanzar la etapa FR5 análogo al paradigma barra operante alimento ( $15.2 \pm 2.7$  WT vs  $20.8 \pm 2.6$  KO PPH ,  $p > 0.2$ , test *post hoc* de Newman-Keuls). Sin embargo, cuando los animales fueron colocados en un esquema PR3 durante la fase diurna el rendimiento de los KO PPH fue significativamente inferior al de los WT, como se ilustra en los registros acumulativos de un animal de cada genotipo en la Fig. 13a,b (a, animal WT, número total de presiones: 2494; b, animal KO PPH, número total de presiones: 164). Los animales KO PPH mostraron una reducción significativa en el PQ/razón final alcanzado en el esquema PR3 ( $64.2 \pm 9.4$  vs  $23.6 \pm 2.9$  para los WT y KO PPH respectivamente,  $p < 0.01$ , test de *t*.) (Fig. 13c). Todos los WT completaron el tiempo programado para las sesiones experimentales, mientras que todos los animales KO PPH dejaron de accionar la palanca por 15 min consecutivos, resultando en la terminación prematura de la sesión (duración promedio de las sesiones  $35.6 \pm 8.5$  min). En este paradigma experimental los animales KO PPH mostraron pausas comportamentales con características similares a las observadas en las sesiones con recompensa de alimento. No se observaron pausas comportamentales en los animales WT. Cuando tuvieron libre acceso al líquido en sus jaulas, ambos genotipos consumieron la misma cantidad de agua en un período de 60 min a la misma hora en la fase diurna ( $p > 0.15$ , test de *t*) (Fig. 13d). Este estudio sugiere que las neuronas Hcrtérgicas son requeridas por igual para la ejecución de los comportamientos operantes que suponen la obtención de una recompensa de alimento o agua.

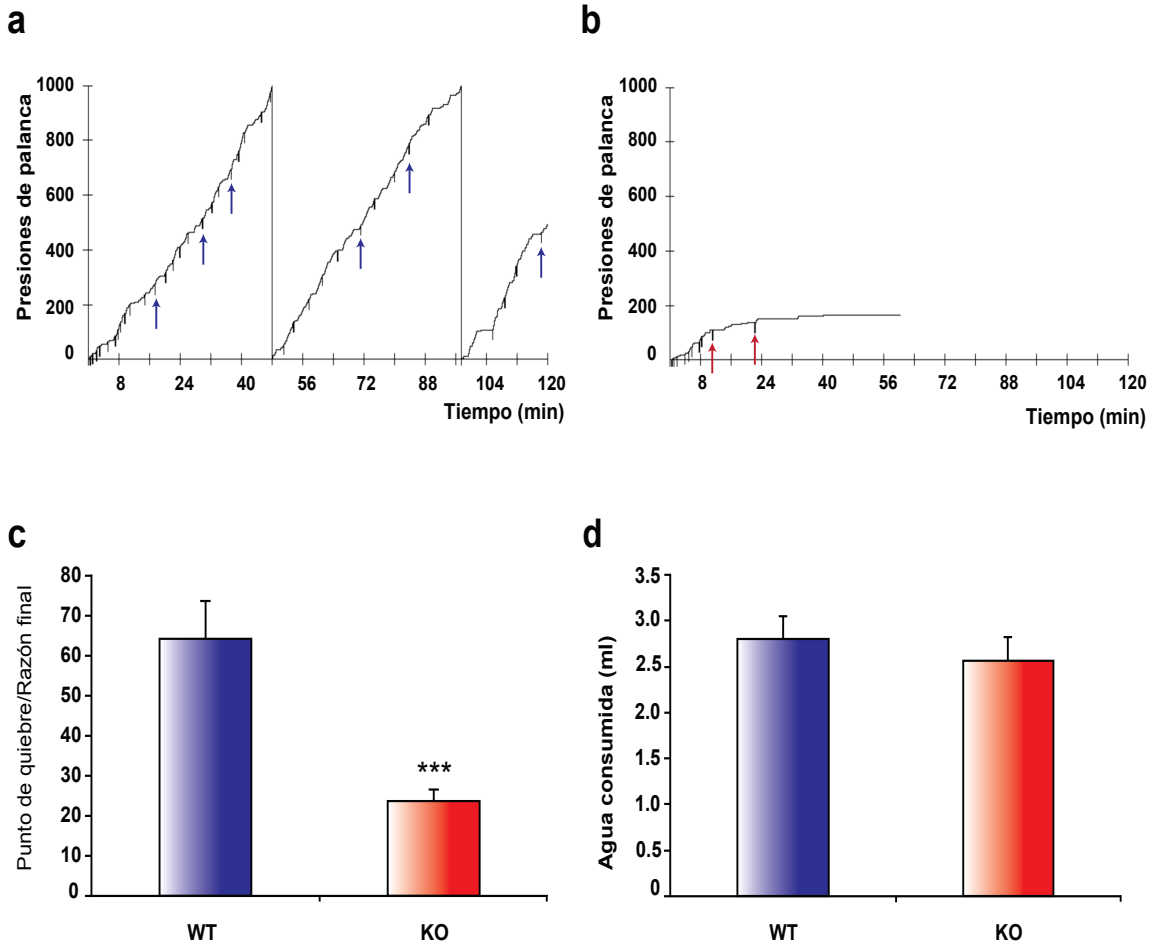


Figura 13. Comportamiento operante en el paradigma experimental barra operante agua (PR3). **a,b** Ejemplos representativos de los registros acumulativos de un animal WT y un animal KO PPH. Las rayas verticales en los registros acumulativos indican el suministro de una dosis de agua. Las flechas azules (WT) y rojas (KO PPH) indican ejemplos de los mismos. La sesión del ratón KO PPH fue terminada prematuramente debido a que el animal no accionó la palanca por 15 min consecutivos. **c**, Rendimiento de los animales WT y KO PPH en la tarea para la obtención de una recompensa de agua ( $n = 5$  para cada genotipo,  $*** p < 0.005$  test de  $t$ ). **d**, Cantidad de agua consumida por los animales WT y los KO PPH durante 60 min en sus jaulas con libre acceso al líquido.

## 6.2- Refuerzo negativo animales WT vs KO PPH

Los sujetos experimentales fueron entrenados en la tarea barra choque eléctrico y no se observó diferencia significativa entre los animales de ambos genotipos en el número de sesiones de entrenamiento necesarias para alcanzar el nivel FR5 ( $22.2 \pm 2.4$  vs  $23.7 \pm 1.5$  para WT y KO PPH respectivamente). En contraste a lo observado en los dos paradigmas experimentales con recompensa positiva, los animales WT y KO PPH mostraron el mismo nivel de rendimiento cuando el origen de la motivación fue eludir un choque eléctrico en la fase diurna (Fig. 14a,b; a, animal WT número total de presiones; 2207; b, animal KO PPH número total de presiones 2617). No hubo diferencia significativa en la razón final que los dos grupos alcanzaron ( $43.1 \pm 3.8$  vs  $38.1 \pm 3.4$  para los WT y KO PPH respectivamente,  $p > 0.3$ , test de *t*) (Fig. 14c). Durante las sesiones con refuerzo negativo todos los animales de ambos genotipos completaron los 120 min programados para la sesión experimental y no se observó ninguna pausa comportamental en los animales KO PPH.

El análisis del espectro del EEG reveló que los animales estaban en un estado de alta vigilia a lo largo de la sesión, análogo al observado durante la vigilia activa espontánea ( $r = 0.97$ ) (Fig. 11). Por lo tanto las Hcrts no son necesarias para los altos niveles de vigilia ni para el rendimiento óptimo en ésta tarea motivada por la necesidad de eludir el estímulo aversivo.

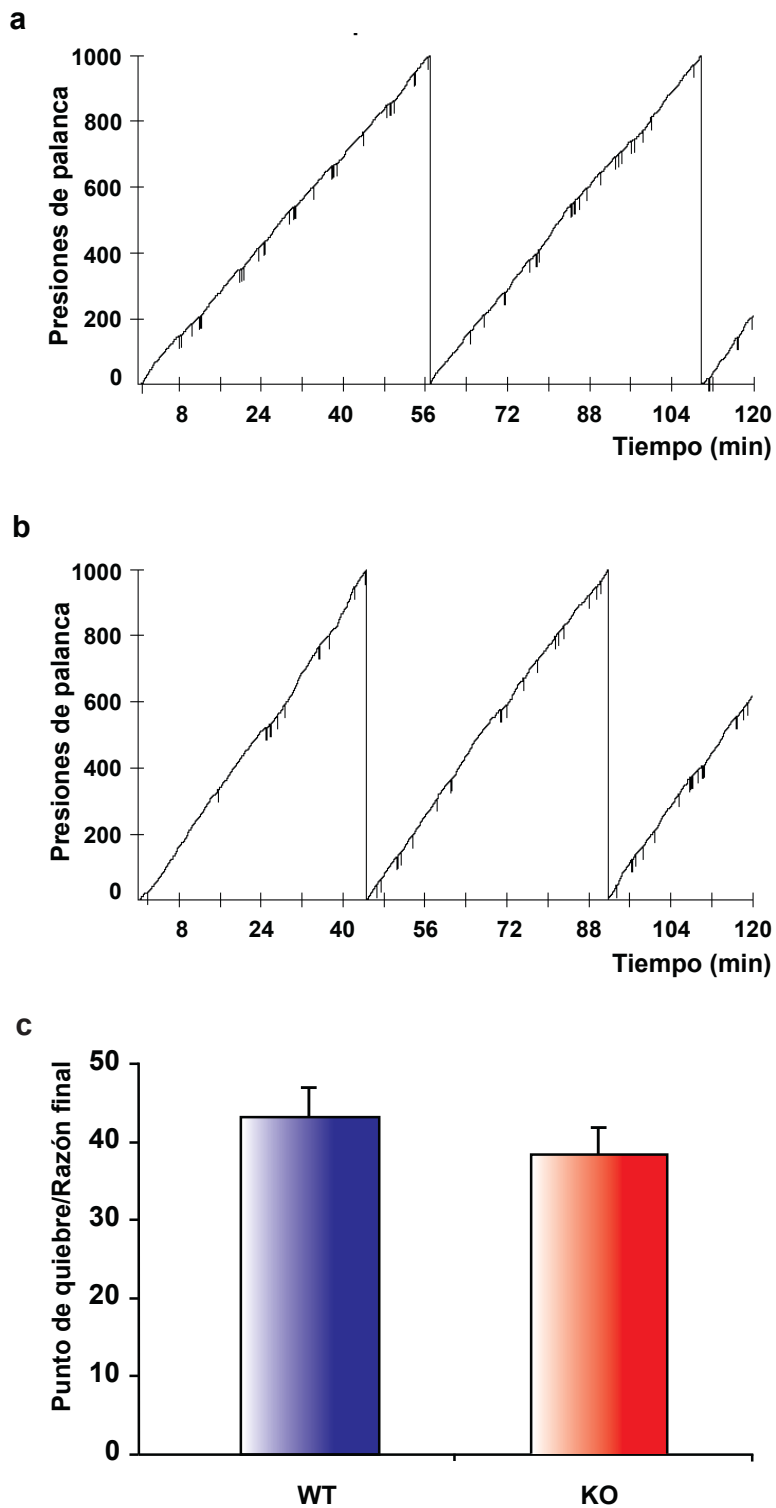


Figura 14. Comportamiento operante en el paradigma experimental barra choque eléctrico PR3-10 en la fase diurna. **a,b** Ejemplos representativos de los registros acumulativos en una sesión de un animal WT (**a**, número total de presiones: 2207) y un animal KO PPH (**b**, número total de presiones: 2617) en la tarea barra choque eléctrico durante la fase diurna. Las rayas verticales en los registros acumulativos indican el suministro de un choque eléctrico. (n = 8 para cada genotipo). **c**, Razón final alcanzada por los animales de ambos genotipos

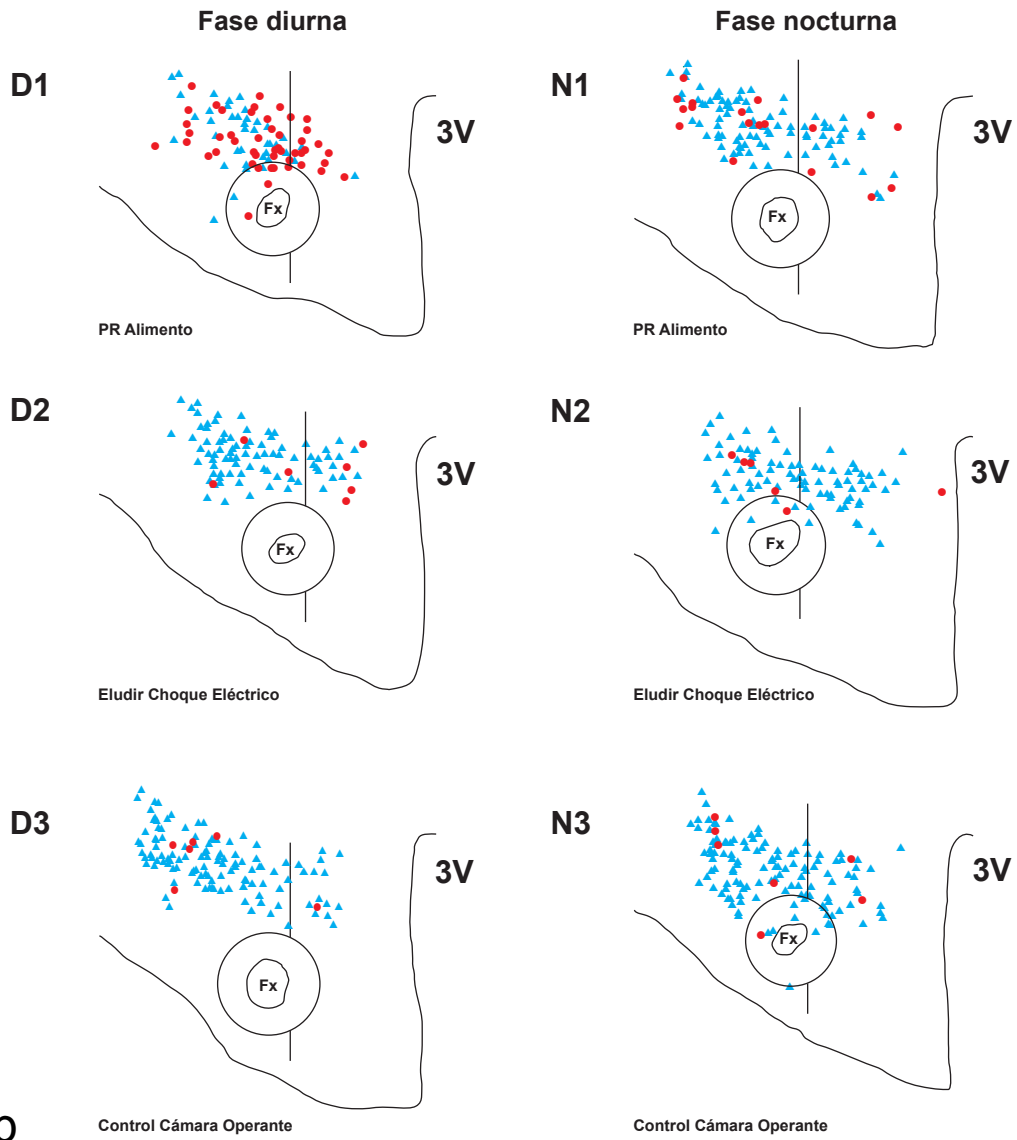


## 6.3 Estudios histológicos utilizando Fos en los animales WT

### 6.3.1- Tarea operante con recompensa positiva durante la fase diurna y nocturna

El número y la distribución de neuronas Hcrt<sup>+</sup> y doble-inmunopositivas Fos<sup>+</sup>/Hcrt<sup>+</sup> fue evaluado en animales WT compañeros de camada de los KO PPH. Las neuronas doble marcadas Fos<sup>+</sup>/Hcrt<sup>+</sup> se observaron entremezcladas con otras neuronas Hcrt<sup>+</sup> dentro del campo de neuronas Hcrtérgicas (Fig. 15a). La microfotografía en la Fig. 15b muestra un ejemplo de células inmunopositivas en el LH, MH y PFA en un animal luego del paradigma barra operante alimento en el esquema PR5 durante la fase diurna. Bajo esta condición experimental se observó un incremento significativo en el número de neuronas Hcrtérgicas que expresaron Fos (círculos rojos) con respecto a la misma condición en la fase nocturna y a la condición control. De forma contraria no se registró la expresión de Fos por durante barra choque eléctrico en ambas fases comparados con el control cámara operante (Fig. 15a). Se detectó un efecto significativo de la condición experimental ( $p < 0.01$ ) y una interacción significativa entre la fase diurna/fase nocturna y la condición experimental ( $p < 0.01$ ). El aumento en la expresión de Fos durante la barra operante alimento fue significativo comparado con la condición control en la fase diurna ( $55.2 \pm 9\%$  vs  $14.9 \pm 2.4\%$ ,  $p < 0.01$ , test *post hoc* de Newman-Keuls). Sin embargo, la expresión de Fos en la neuronas Hcrtérgicas no aumento significativamente durante la fase nocturna en está misma tarea ( $19.8 \pm 6.7\%$  vs control  $15.6 \pm 5.5\%$ ,  $p < 0.5$ , test *post hoc* de Newman-Keuls)(Fig. 16a).

a



b

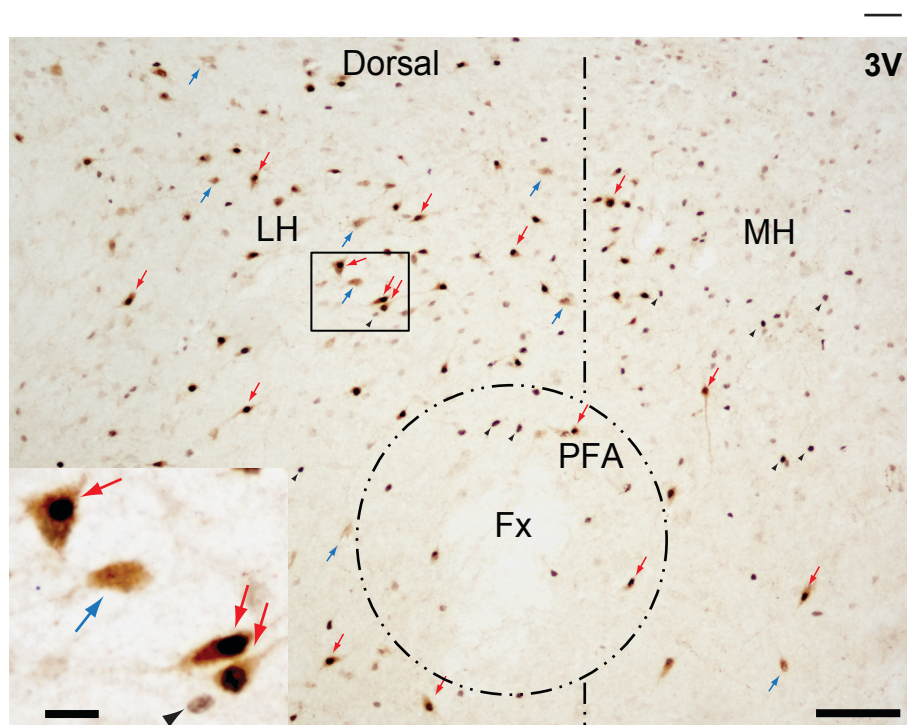


Figura 15. Distribución de las neuronas Hcrt<sup>+</sup> y Fos<sup>+</sup>/Hcrt<sup>+</sup> en el hipotálamo de ratones WT bajo diferentes condiciones experimentales. **a**, Diagramas de secciones coronales del hipotálamo teñidas para Hcrt y Fos de seis animales, cada uno bajo una condición experimental diferente durante la fase diurna y la fase nocturna D1, barra operante alimento PR5, fase diurna; D2, eludir un choque eléctrico, fase diurna; D3 control cámara operante, fase diurna; N1, barra operante alimento PR5, fase nocturna; N2, eludir un choque eléctrico, fase nocturna; N3 control cámara operante, fase nocturna. Círculos rojos indican neuronas doble inmunomarcadas Fos<sup>+</sup>/Hcrt<sup>+</sup>, triángulos azules corresponden a neuronas Hcrt<sup>+</sup>. Fx, fornix; 3V, tercer ventrículo. Barra de calibración, 150 μm. **b**, Fotomicrografía de la misma región del hipotálamo de una sección procesada para Hcrt y Fos. LH, hipotálamo lateral; MH, hipotálamo medial; PFA, área perifornical. Barra de calibración 150 μm. El área rectangular en el LH se encuentra magnificada en el inserto debajo y a la izquierda. Barra de calibración 20 μm. Las neuronas doble inmunomarcadas (flechas rojas) muestran el característico color negro en el núcleo evidenciando la presencia de Fos revelado con níquel y el precipitado marrón en el citoplasma indicando su naturaleza Hcrtérgica. Estas células pueden diferenciarse fácilmente de las neuronas inmunomarcadas solo para Hcrt (flechas azules) o solo para Fos (cabezas de flecha negras).

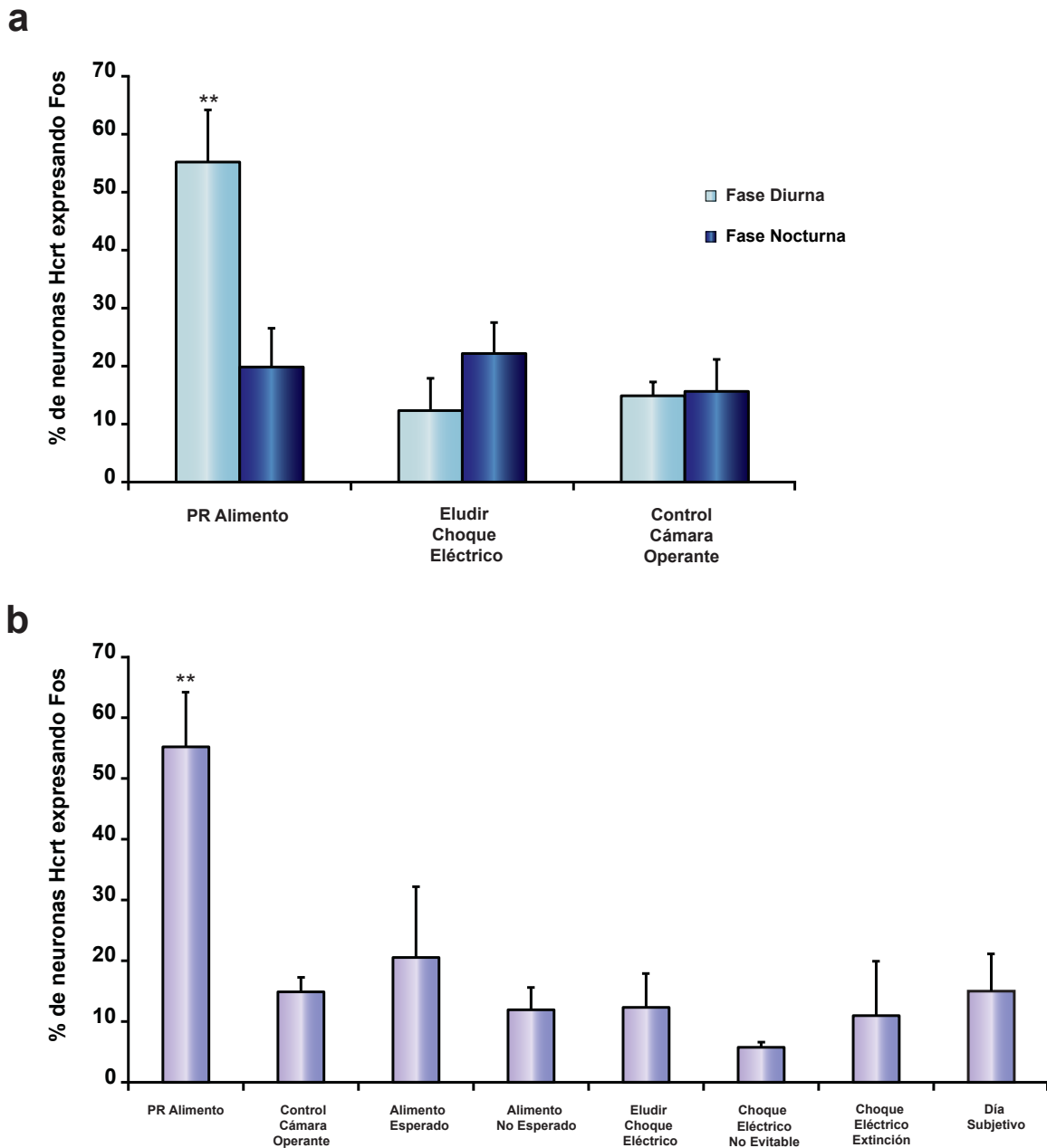
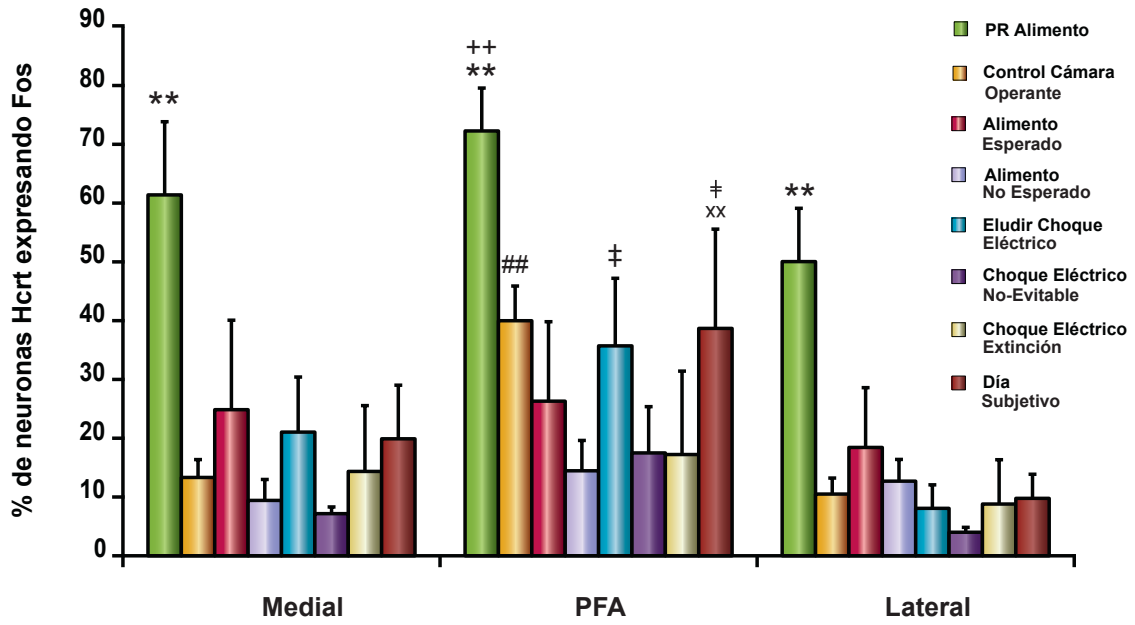


Figura 16. Porcentaje de neuronas Hcrtérgicas que expresan Fos en el hipotálamo de ratones WT bajo diferentes condiciones comportamentales. **a**, Comparación del porcentaje de neuronas Hcrtérgicas expresando Fos en los paradigmas barra operante alimento (PR alimento), barra choque eléctrico, y control cámara operante durante la fase diurna y nocturna (\*\* $p < 0.01$ , test *post hoc* de Newman-Keuls, comparando PR alimento durante la fase diurna con todas las demás condiciones;  $n = 4$  para cada condición). **b**, Comparación del porcentaje de neuronas expresando Fos en el paradigma barra operante alimento con las demás condiciones durante la fase diurna (\*\* $p < 0.01$ , test *post hoc* de Newman-Keuls, comparando la PR alimento con todas las demás condiciones;  $n = 4$  para cada condición).

a



b

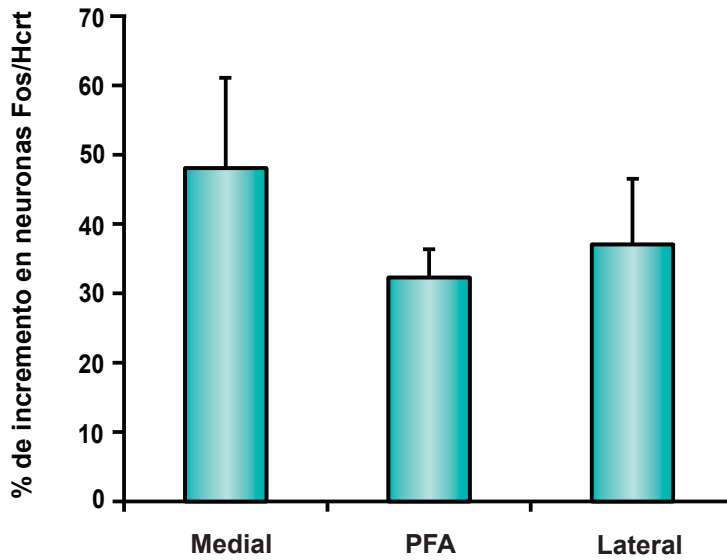


Figura 17. Distribución de neuronas doble inmunomarcadas en diferentes regiones hipotalámicas. **a**, Porcentaje de neuronas doble inmunomarcadas Fos<sup>+</sup>/Hcrt<sup>+</sup> en las regiones Medial, PFA, Lateral en diferentes condiciones comportamentales durante la fase diurna (\*\*p < 0.01, test *post hoc* de Newman-Keuls, comparando PR alimento con todas las demás condiciones dentro de cada subdivisión, <sup>++</sup>p < 0.01 test *post hoc* de Newman-Keuls, comparando PFA con las divisiones lateral y medial en la condición PR alimento, <sup>##</sup>p < 0.01 test *post hoc* de Newman-Keuls, comparando PFA con las divisiones lateral y medial en la condición control cámara operante, <sup>xx</sup>p < 0.01 test *post hoc* de Newman-Keuls, comparando PFA con las divisiones lateral y medial en la condición día subjetivo, <sup>‡</sup>p < 0.05, test *post hoc* de Newman-Keuls, comparando el PFA con la subdivisión lateral en la condición eludir un choque eléctrico. **b**, Comparación del porcentaje de incremento en neuronas doble inmunomarcadas Fos<sup>+</sup>/Hcrt<sup>+</sup> entre las tres subdivisiones en la condición barra operante alimento bajo el esquema PR5 alimento relativo al control cámara operante.

Los resultados obtenidos de la cuantificación de los datos obtenidos de las tinciones histológicas utilizando Hcrt y Fos respaldan las conclusiones de los estudios comportamentales en los animales WT y los KO PPH. Las células Hcrtérgicas en los animales WT son reclutadas para la realización de la tarea barra operante alimento durante la fase diurna mientras que los animales KO PPH, que carecen de Hcrts, son incapaces de completar la misma tarea experimental durante esta fase del ciclo. Por otro lado, cuando las sesiones experimentales fueron conducidas durante la fase nocturna, las neuronas Hcrtérgicas en los animales WT no fueron reclutadas para la tarea y los animales KO PPH no mostraron el déficit comportamental. Esto indica que neuronas Hcrtérgicas no estarían involucradas en la ejecución de este comportamiento durante la fase nocturna.

### 6.3.2- Suministro de alimento sin contingencia con la tarea operante.

Para comprender mejor los factores que determinan el aumento de la expresión de Fos en las neuronas Hcrtérgicas durante el comportamiento barra operante alimento, sometimos a los animales en un 85-90% de su peso corporal inicial a una de dos

condiciones. En la primer condición los sujetos experimentales fueron entrenados para recibir una recompensa de alimento en intervalos variables en la cámara operante; en la segunda condición, los animales no recibieron previamente alimento en la cámara operante y solo fueron recompensados con arribos de alimento inesperados en la bandeja solamente el día del sacrificio. Ambas condiciones experimentales fueron conducidas en la fase diurna con la luz general encendida. En ambas condiciones no fue necesaria, ni se registró ninguna presión de la palanca y todo el alimento fue consumido rápidamente y en su totalidad. En contraste con lo observado durante el comportamiento barra operante alimento, no se registró un incremento significativo en el nivel de expresión de Fos en las neuronas Hcrtérgicas en ninguna de estas condiciones experimentales (alimento esperado  $20.5 \pm 11.6\%$  y alimento no esperado  $11.9 \pm 3.7\%$  comparado con la condición control;  $p > 0.5$ , test *post hoc* de Newman-Keuls) (Fig. 16b). Por lo tanto las neuronas Hcrtérgicas son reclutadas solamente cuando se requiere de esfuerzo para obtener la recompensa.

### 6.3.3- Contexto aversivo durante la fase diurna y nocturna.

En la tarea barra choque eléctrico solo el  $12.3 \pm 5.6\%$  de las neuronas Hcrtérgicas expresaran Fos durante la fase diurna y  $22.2 \pm 5.3\%$  en la fase nocturna (Fig. 16a). Los animales recibieron entre 11 y 86 choques eléctricos con un promedio de  $55.8 \pm 16.0$  choques eléctricos en los 120 min que duró la sesión. Se analizó además la expresión de Fos en las neuronas Hcrtérgicas durante el choque eléctrico no anticipado e inevitable. Esta condición no produjo un incremento en la expresión de Fos en éstas células por encima de la condición control ( $5.8 \pm 0.8\%$ ) (Fig. 16b). En el paradigma de extinción del choque eléctrico, en el cual los sujetos experimentales continuaron presionando la palanca en respuesta las claves asociadas al choque eléctrico pero el estímulo no fue suministrado, el porcentaje de neuronas Hcrtérgicas que expresaron Fos no fue significativamente diferente al observado cuando los animales recibieron el choque eléctrico ( $11 \pm 8.9$  vs  $12.3 \pm 5.6\%$ ) o al de los animales control cámara operante ( $14.9 \pm 2.4\%$ , todo  $p > 0.05$ , test *post hoc* de Newman-Keuls)(Fig. 16b). La expresión de Fos en las células Hcrtérgicas en todas las condiciones que involucraron choque eléctrico fue

significativamente menor que en la condición barra operante alimento durante la fase diurna (todas  $p < 0.01$ , test *post hoc* de Newman-Keuls)(Fig. 16b). Por lo tanto las neuronas Hcrtérgicas no fueron reclutadas a pesar del alto nivel de vigilia en que los animales se encontraban mientras recibían choques eléctricos, eludían los mismos o experimentaban la ansiedad del contexto previamente asociado con recibir un choque eléctrico.

#### 6.3.4- Papel de la luz

Para determinar si la activación de las neuronas Hcrtérgicas en el paradigma barra operante alimento durante la fase diurna se halla relacionada a la presencia de la luz general en la jaula operante o se debe a un efecto circadiano, los animales WT fueron sometidos a este paradigma en la presencia o ausencia de luz general en la cámara operante. El incremento en la expresión de Fos en las neuronas Hcrtérgicas solo fue observado cuando los animales realizaron la tarea con la luz general de la cámara operante encendida (Fig. 16b, PR alimento). A pesar de que los animales WT mostraron un mismo nivel de rendimiento en presencia o ausencia de luz (razón final  $134.3 \pm 9.1$  vs  $138.8 \pm 13.8$  respectivamente), no hubo un incremento en la expresión de Fos en las neuronas Hcrtérgicas en ausencia de luz en el mismo momento del ciclo circadiano (Fig. 16b, día subjetivo). Esto sugiere un rol de la luz en la activación de las neuronas Hcrtérgicas.

#### 6.3.5- Expresión de Fos en neuronas hipocretinérgicas laterales y mediales

Con la intención de establecer una posible segregación anatómica en términos de la expresión de Fos dentro del campo Hcrtérgico, subdividimos el hipotálamo en tres sectores, lateral, medial y perifornical y cuantificamos el número de neuronas Fos<sup>+</sup>/Hcrt<sup>+</sup> e Hcrt<sup>+</sup> en cada subdivisión. Hallamos un efecto significativo de la condición experimental ( $p < 0.01$ ) y de las subdivisiones anatómicas ( $p < 0.0001$ ). Se observó un número significativamente mayor de neuronas Fos<sup>+</sup>/Hcrt<sup>+</sup> en todas las subdivisiones



luego de realizar la tarea barra operante alimento durante la fase diurna con luz general encendida comparado con todas las demás condiciones experimentales ( $p < 0.01$ , test *post hoc* de Newman-Keuls)(Fig. 17a). Con respecto a su distribución, no observamos una diferencia significativa en el número de neuronas Fos<sup>+</sup>/Hcrt<sup>+</sup> entre la subdivisión lateral y medial en el paradigma barra operante alimento. Sin embargo, la subdivisión PFA mostró un incremento significativo en el porcentaje de neuronas doble marcadas comparado con la subdivisión lateral ( $p < 0.01$ , test *post hoc* de Newman-Keuls)(Fig. 17a). Además, el PFA en el grupo experimental control cámara operante mostró un porcentaje significativamente mayor de neuronas Fos<sup>+</sup>/Hcrt<sup>+</sup> comparado con las subdivisiones medial y lateral (todas  $p < 0.01$ , test *post hoc* de Newman-Keuls)(Fig. 17a). Sin embargo, no se halló diferencia significativa en el incremento del porcentaje de neuronas Fos<sup>+</sup>/Hcrt<sup>+</sup> entre las subdivisiones hipotalámicas en la tarea barra operante alimento relativo al control cámara operante ( $p > 0.05$ , test *post hoc* de Newman-Keuls)(Fig. 17a). Sumado a ello, en todas las demás condiciones se observó una distribución similar de neuronas Fos<sup>+</sup>/Hcrt<sup>+</sup> entre las subdivisiones medial y lateral (todas  $p > 0.05$ , test *post hoc* de Newman-Keuls)(Fig. 17b). Bajo las condiciones experimentales utilizadas en el presente trabajo, nosotros no observamos una diferencia entre la activación de las neuronas Hcrtérgicas mediales y laterales.

Los criterios anatómicos utilizados por Harris et al. (Harris et al., 2005) son relativamente diferentes a los empleados en el presente estudio. Por lo tanto para descartar la posibilidad de que sea esta la causa de las diferencias entre los trabajos, realizamos un segundo análisis anatómico en las secciones histológicas utilizando los criterios publicados por los autores y adaptados al ratón. En este esquema, las neuronas distribuidas lateralmente al fornix fueron consideradas parte del LH, las neuronas localizadas 140  $\mu\text{m}$  medial al límite medial del fornix y dorsalmente hasta el límite dorsal del hipotálamo fueron consideradas en la PFA, el resto fue establecido como el MH (Fig 16a).

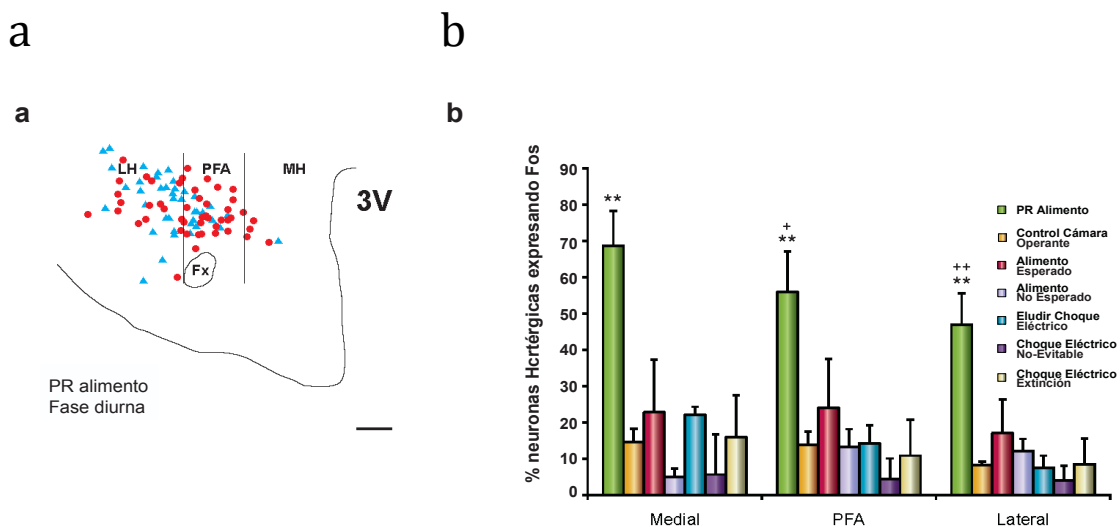


Figura 18. Análisis de las secciones utilizando una segunda parcelación hipotalámica **a**, Diagrama de la parcelación hipotalámica utilizada para este análisis en una sección coronal del hipotálamo de un animal WT luego de la tarea comportamental barra operante alimento. Los círculos rojos indican neuronas doble marcadas Fos<sup>+</sup>/Hcrt<sup>+</sup>; los triángulos azules corresponden a las neuronas Hcrt<sup>+</sup>. Fx, fornix; 3V, tercer ventrículo; Barra de calibración, 150  $\mu$ m. **b**, Porcentaje de neuronas Fos<sup>+</sup>/Hcrt<sup>+</sup> luego de la tarea barra operante alimento (\*\* $p < 0.01$ , comparando PR 5 con el resto de las condiciones, ++ $p < 0.01$ , + $p < 0.05$  comparando la subdivisión MH con las regiones LH y PFA, test *post hoc* de Newman-Keuls,  $n=4$  para cada condición).

Como observamos previamente hay un número significativamente mayor de neuronas Fos<sup>+</sup>/Hcrt<sup>+</sup> luego de la tarea barra operante alimento comparado con todas las demás condiciones ( $p < 0.01$ , test *post hoc* de Newman-Keuls)(Fig. 18b). La subdivisión MH presentó un mayor número de neuronas Fos<sup>+</sup>/Hcrt<sup>+</sup> comparada con la regiones LH y PFA (++) $p < 0.01$ , + $p < 0.05$  test *post hoc* de Newman-Keuls). Todas las demás condiciones presentaron una distribución similar de las neuronas doble inmunomarcadas Fos<sup>+</sup>/Hcrt<sup>+</sup> entre las subdivisiones medial y lateral (todas  $p > 0.05$  test *post hoc* de Newman-Keuls)(Fig. 18b).

## Discusión

### 7.1- Consideraciones metodológicas previas

#### *7.1.1- Anticuerpos*

En el presente trabajo la especificidad de los anticuerpos utilizados para la detección de Hcrt-1 y Hcrt-2 fue confirmada en animales KO PPH (ver métodos suplementarios). El anticuerpo para la detección de la proteína Fos fue seleccionado a partir de trabajos previamente publicados (Berghorn K, 1994; Estabrooke et al., 2001; Hale, 2008; Stratford J, 2011). Para minimizar la variabilidad los animales fueron procesados simultáneamente.

#### *7.1.2- Fos como marcador de actividad neuronal*

La expresión de Fos es considerado como un marcador de actividad neuronal (Dragunow M, 1989; Day H.E., 2008; VanElzakker M, 2008), sin embargo la ausencia en su expresión no necesariamente indica inactividad neuronal ya que no todas las neuronas utilizan el producto de este proto-oncogen en respuesta a un aumento en su actividad celular (Dragunow M, 1989). Tampoco es posible suponer la universalidad de las respuestas neuronales frente a un estímulo particular, o la existencia de un umbral de estimulación mínimo para todas las células. A pesar de estas consideraciones, la detección de Fos es una técnica no invasiva ya establecida en la literatura, que resulta particularmente útil en el estudio de poblaciones celulares de localización subcortical y distribución dispersa, tales como las neuronas Hcrtérgicas. Permite además trabajar con los animales sin restricción de movimiento haciendo posible establecer una correlación entre el comportamiento observado y los resultados anatómicos. Sumado a ello, este tipo de abordaje inmunohistoquímico provee un panorama global de la población neuronal posibilitando el estudio detallado de la distribución de su actividad. Debido a la baja resolución temporal de esta técnica (90 min) (Morgan et al., 1987; Cullinan et al., 1995) trabajos futuros requerirán la combinación con otras técnicas como el registro de

unidades, para obtener una visión completa del patrón de actividad de la población Hcrtérgica en respuesta a un comportamiento particular.

### *7.1.3- Animales KO PPH*

Los animales KO suponen la ausencia de uno o varios productos génicos. Este tipo de manipulación genética es similar a una lesión y lo que observamos es la capacidad del sistema para desarrollarse y operar sin el o los productos génicos, por ejemplo PPH. Se considera que esta estrategia puede generar procesos compensatorios que sustituyen las funciones del sistema Hcrtérgico enmascarando el papel fisiológico de estos péptidos, más aún, el efecto compensatorio puede no ser total, provocando déficits todavía más sutiles. Alternativamente, la falta de las Hcrts puede afectar el desarrollo ontogenético modificando la fisiología normal de los sistemas lo que resultaría en déficits aún mayores que el propio papel de las Hcrts. A pesar de estas desventajas, en los animales KO PPH las neuronas putativamente Hcrtérgicas parecen mantenerse intactas como lo indican los estudios IHQs con tinción para dinorfina y Narp (Blouin et al., 2005; Crocker et al., 2005). A la fecha no hay estudios que demuestren cambios anatómicos sustanciales en el cerebro de los ratones KO PPH.

### *7.1.4- Expresión de Fos en neuronas hipocretinérgicas mediales y laterales*

Utilizando la expresión de Fos como marcador de activación neuronal ha sido propuesta una dicotomía funcional en la población Hcrtérgica (Harris et al., 2005). Según estos investigadores, las neuronas localizadas en LH estarían relacionadas a los procesos de recompensa, mientras las neuronas mediales y perifornicales modularían la vigilia y la respuesta al estrés (ibid). En nuestro trabajo no encontramos una diferencia significativa entre la activación de las neuronas Hcrtérgicas mediales y laterales durante la tarea con recompensa positiva o su falta de reclutamiento durante la tarea con choque eléctrico aún empleando los mismos criterios del trabajo previamente citado. Dicha discrepancia puede deberse a los diferentes paradigmas comportamentales utilizados. Por ejemplo, en nuestro estudio, la realización de la tarea barra operante alimento implica mantener un estado de

vigilia consolidado, realizar un acto motor y procesar las claves para la obtención de la recompensa. Es posible que la combinación de estos elementos requiera la participación de ambas poblaciones neuronales en comparación con el grupo de emociones pasivas que los animales experimentan en el lugar previamente asociado con la recompensa (*CPP*, ver apéndice), paradigma utilizado en el trabajo previamente citado. Sumado a ello, pueden existir diferencias entre las especies utilizadas en ambos trabajos, nuestros estudios fueron realizados en ratones mientras que los autores del trabajo previo utilizaron ratas (Harris et al., 2005). Otros factores como los procedimientos experimentales o el análisis de los datos también pueden contribuir a estas diferencias.

## 7.2 Rol comportamental de las hipocretinas

### 7.2.1- Emociones positivas

En el presente estudio observamos un aumento significativo en el número de neuronas Hcrtérgicas reclutadas para la ejecución de una tarea motora motivada por una recompensa comparada con la misma tarea motora motivada para evitar un castigo durante la fase diurna. De forma inesperada, en ésta misma fase del ciclo circadiano las neuronas Hcrtérgicas no se hallan activadas cuando no se requirió trabajo para obtener la recompensa. Esto indica que la participación de estas neuronas está sujeta a situaciones en las que resulta necesario poner cierto grado de esfuerzo para obtener una recompensa. Los estudios en otras especies parecen apoyar ésta idea. Por ejemplo, las neuronas Hcrtérgicas en los gatos presentan un nivel de activación (cFos) significativamente mayor cuando los animales se hayan despiertos y explorando su entorno comparados con los animales que se encuentran en vigilia tranquila (sin interaccionar con el ambiente). Inclusive 2 horas de vigilia tranquila mantenida no resulta en una activación significativa de las neuronas Hcrtérgicas en estos animales (Tortero, 2001). Este fenómeno concuerda con el aumento de la descarga de las neuronas Hcrtérgicas observado cuando los animales (ratas) se hallan explorando su entorno (Mileykovskiy et al., 2005). En perros por otro lado, los niveles de Hcrt-1 medidos en el LCR durante el ejercicio físico en una cinta automática para correr resultan comparables a los del reposo, a pesar de un

aumento significativo en la frecuencia cardíaca y respiratoria y en la temperatura corporal. Inclusive al máximo de velocidad no hay cambios en los niveles del péptido (Wu et al., 2011). En cambio, cuando estos mismos animales son llevados a un predio abierto en donde realizan actividades placenteras como cavar hoyos, correr e interactuar con otros perros, los niveles de Hcrt-1 aumentan significativamente (ibid.). De forma similar los niveles de Hcrt-1 en humanos se relacionan con situaciones que presentan contenidos emocionales positivos. Así, en pacientes neuroquirúrgicos los niveles del péptido en la amígdala se registran máximos mientras éstos reciben la visita de su familia en el hospital. Una segunda elevación en los niveles del péptido se observa cuando los pacientes interactúan con el médico y este les informa de su evolución favorable. De forma contraria, cuando los pacientes se hallan en vigilia y adoloridos, los niveles de Hcrt-1 caen a su mínimo valor registrado (Blouin et al., 2013). Esta última situación podría ser similar a la falta de activación de las neuronas Hcrtérgicas bajo los paradigmas aversivos a los que sometemos a los animales en el presente estudio, que está de acuerdo con datos previamente publicados. Así, Kiss y colaboradores no observa inducción de Fos en las neuronas Hcrtérgicas luego de un choque eléctrico (Kiss, 2007), mientras que Zhu y colaboradores no reporta su activación durante el paradigma de miedo condicionado (Zhu et al., 2002b). Sin embargo estos mismos autores observaron la activación de las neuronas Hcrtérgicas luego de un breve choque eléctrico y posterior retorno a sus jaulas. Este paradigma experimental puede representar una situación similar a la descrita previamente en la cual un estímulo aversivo de corta duración es seguido de una situación placentera previo al sacrificio.

En el presente trabajo reportamos que los animales KO PPH demuestran un déficit para mantener el nivel de trabajo para obtener una recompensa positiva, mientras que ponen el mismo nivel de esfuerzo que los WT para evitar un refuerzo negativo, evidenciando cierto grado de anhedonia motivacional. Sin embargo, de nuestros resultados se desprende que los animales KO PPH son capaces de mantener la motivación para obtener una recompensa positiva durante la fase nocturna así como por los primeros 10 min de las sesiones experimentales durante la fase diurna. Es posible entonces que la incapacidad de mantener el rendimiento durante la fase diurna se deba, en parte, a que los animales se hallen muy somnolientos, inclusive sufran ataques de sueño.

A pesar de ello, este hecho sería parte de un fenómeno mayor ya que los episodios de sueño registrados durante las sesiones comportamentales en la fase diurna se observaron con una duración máxima de 3 minutos, período de tiempo significativamente inferior a los 15 minutos de inactividad continua necesarios para la finalización prematura de las sesiones. Además, los animales KO PPH parecen no responder al aumento en la motivación producto de la restricción calórica, lo que concuerda con lo previamente descrito para estos animales (Lutter et al., 2008). Es posible que las Hcrts actúen modulando concomitantemente aspectos de la vigilia y aspectos de los circuitos de recompensa que modulan la motivación. La ausencia de los péptidos resultaría en la pérdida de entradas excitatorias o facilitatorias a los sistemas promotores de la vigilia así como estructuras relacionadas al procesamiento de recompensas. Esto puede generar la pérdida del incremento en la vigilia motivacional producto de la expectativa de obtener una recompensa, la que se traduce en el déficit comportamental observado.

### *7.2.2- Sistemas promotores de la vigilia*

Las Hcrts juegan un importante papel en la regulación de la vigilia y su ausencia provoca somnolencia crónica. Sin embargo, en el presente trabajo las neuronas Hértérgicas muestran niveles de actividad mínimos en situaciones que generan altos niveles de vigilia como la expectativa de recibir un choque eléctrico o durante la ejecución de la tarea para evitarlo. Por lo tanto, la activación del EEG correspondiente a la vigilia observado en estos comportamientos debe de provenir de otros sistemas promotores de la vigilia. Para comprender la contribución de las Hcrts y la de otros sistemas al mantenimiento de la vigilia podemos referirnos a las características de la narcolepsia humana y a los estudios realizados en diferentes modelos animales. En los humanos narcolépticos con cataplejía se registra una pérdida casi total de neuronas Hértérgicas. Sin embargo, durante un ataque de cataplejía, los pacientes permanecen conscientes y con los ojos abiertos, indicando que mantienen algunos de los componentes de la vigilia a pesar de la pérdida del tono motor. Este mismo fenómeno ocurre en los perros que sufren de narcolepsia con cataplejía espontánea, que de forma similar a lo que ocurre en humanos pierden casi la totalidad de las neuronas Hértérgicas, se mantienen

conscientes durante un ataque catapléjico. Una mirada mas detallada a los modelos animales de narcolepsia nos puede ayudar a comprender un poco mejor la participación de los diferentes sistemas promotores de la vigilia a la generación y mantenimiento los diferentes componentes de la vigilia. Por ejemplo, en el modelo de narcolepsia canina con mutación en el HcrtR-2, los ataques de cataplejia, durante los cuales se mantienen conscientes, pueden ser disparados por la presencia de alimentos sabrosos o juego vigoroso, presumiblemente por las emociones positivas asociadas a estos comportamientos (Siegel et al., 1991). Las emociones positivas también provocan la activación de las neuronas Hcrtérgicas y aumento en la liberación de los péptidos (Wu et al., 2011; Blouin et al., 2013). Es posible inferir que durante un ataque de cataplejía el tono Hcrtérgico se vea aumentado en las estructuras blanco como el LC, núcleo cuya actividad está fuertemente correlacionada con la vigilia (Takahashi et al., 2010). El aumento en la liberación de Hcrts y glutamato de los terminales Hcrtérgicos, los efectos excitatorios de las Hcrts sobre las neuronas NAérgicas y la expresión de receptores funcionales en este núcleo (HcrtR-1), permiten suponer un aumento en la frecuencia de descarga de estas neuronas. Sin embargo, los registros fisiológicos indican que estas células se hallan completamente silentes durante un ataque de cataplejia, indicando la participación de este grupo neuronal en el mantenimiento del tono motor en lugar de la vigilia (John et al., 2004). En cambio, las neuronas histaminérgicas del TMN, otro grupo neuronal asociado con la vigilia, aumentan significativamente su frecuencia de disparo durante un ataque de cataplejía indicando su rol en el mantenimiento de la vigilia (ibid). Por lo expuesto anteriormente, resulta natural pensar que el aumento en la actividad neuronal en el TMN sea debido al aumento en el tono Hcrtérgico. No obstante esto parece poco probable ya que esta región del hipotálamo (TMN) solo expresa el mRNA para el HcrtR-2, receptor no funcional en los perros narcolépticos (Marcus et al., 2001). Es posible que sea el glutamato coliberado de los terminales Hcrtérgicos el responsable del aumento en la actividad registrado. Sin embargo, un trabajo reciente (Schone et al., 2014) reportó que los efectos de la estimulación glutamatérgica de las neuronas histaminérgicas solo provoca un incremento transitorio en la actividad celular, mientras que la presencia de las Hcrts es necesaria para el aumento sostenido de la descarga en estas neuronas, mismo patrón de actividad neuronal observado en los animales



narcolépticos durante la cataplejía. Este mismo trabajo descartó además la participación de otras moléculas señalizadoras coexpresadas por las neuronas Hcrtérgicas como mediadoras del aumento en la frecuencia de disparo (ibid). Esto indica que otro u otros sistemas promotores de la vigilia serían los responsables del aumento en la actividad histaminérgica.

Otro modelo biológico, los animales con sueño asimétrico, nos permite diseccionar aún más las contribuciones de los diferentes sistemas al mantenimiento de la vigilia. Los pinnípedos, que desarrollan sus actividades naturales con alimentarse y dormir tanto en la tierra como en el mar, presentan la peculiar característica del sueño de ondas lentas asimétrico (ASWS) similar al sueño de ondas lentas unilateral registrado en los cetáceos (Lyamin et al., 2002). En estos animales es posible suponer que la lateralización en el EEG se ve acompañada con una concomitante lateralización en los niveles de neurotransmisores promotores de la vigilia. Los trabajos con microdiálisis confirmaron una fuerte lateralización de los niveles corticales de Ach, registrando niveles significativamente mayores en el hemisferio con EEG de bajo voltaje (vigilia) (Lapierre et al., 2007). A pesar de ello los niveles de 5-HT, otro neurotransmisor tradicionalmente asociado a la vigilia (McGinty and Harper, 1976; Monti, 2011), no muestran el mismo patrón de lateralización asociado al EEG. Los niveles de este transmisor permanecen comparables entre ambos hemisferios durante el sueño de ondas lentas bilateral y el ASWS (Lapierre et al., 2013). De forma interesante, los máximos niveles de 5-HT corticales en estos animales se registran cuando son mojados con una manguera, estimulación a la que responden con una robusta actividad motora que incluye movimientos laterales rítmicos, apertura y cierre de la mandíbula y movimiento de las orejas (Lapierre, comunicación personal). Estos niveles son significativamente mayores (<400%, niveles relativos a la vigilia tranquila) comparados con otras actividades que también requieren de la vigilia como alimentarse (>200%) o mantenerse alerta (>150%) (Lapierre et al., 2013).

En conjunto, los trabajos en perros narcolépticos y pinnípedos, sumados a los resultados del presente estudio apoyan la idea de que los sistemas promotores de la vigilia que utilizan diferentes neurotransmisores/neuropéptidos tienen 1) tareas específicas en el

mantenimiento y consolidación de la vigilia y 2) pueden ser independientemente reclutados en función de la tarea comportamental o contexto ambiental. Es posible además que uno o más de estos sistemas puedan ser reclutados durante diferentes etapas de una misma tarea.

### *7.2.3- Ciclo circadiano*

El efecto neto de la luz en animales nocturnos como las ratas y ratones provoca la inhibición de los sistemas promotores de la vigilia, fenómeno que ha sido reportado para el sistema Hcrtérgico (Estabrooke et al., 2001). A pesar de ello en nuestra condición control cámara operante no observamos una diferencia significativa en el nivel de activación de las neuronas Hcrtérgicas entre la fase diurna y nocturna. Es probable que esto se deba a las diferentes condiciones experimentales utilizadas en ambos trabajos. Sin embargo, en el presente estudio observamos una diferencia significativa en la activación de las neuronas Hcrtérgicas mientras los animales realizaban una misma tarea comportamental para la obtención de una recompensa durante la fase diurna y la fase nocturna. Estos resultados histológicos tienen un paralelo extraordinario con la deficiencia comportamental observada en los animales KO PPH en la ejecución de esta misma tarea comportamental en la fase diurna. Por otro lado, la mejora sorprendente en el rendimiento de estos animales mutantes en la misma tarea durante la fase nocturna concuerda con la falta de activación de las neuronas Hcrtérgicas en los animales WT durante la fase nocturna en esta tarea. Es posible suponer que otros sistemas de señalización, reclutados naturalmente durante esta etapa del ciclo circadiano, sean la explicación de estos resultados. El ciclo circadiano en los mamíferos es controlado por el SQN y en los roedores nocturnos la actividad neuronal de este núcleo señala el período de inactividad (fase diurna) en estos animales (Schwartz et al., 1983; Houben et al., 2009). El incremento en la actividad del SQN se traduce en la inhibición de los sistemas promotores de la vigilia y de la actividad motora en general (Redlin and Mrosovsky, 1999; Scheer et al., 2005). Por otro lado en estos mismos animales, la inhibición del SQN es necesaria para la expresión de la robusta actividad locomotora y el incremento en la temperatura corporal asociados al comportamiento anticipatorio al alimento (CAA)

(Acosta-Galvan et al., 2011). De forma interesante los animales KO PPH no expresan el incremento en la actividad locomotora durante el CAA si bien mantienen el aumento en la temperatura corporal (Kaur et al., 2008). Esto indica que el sistema Hcrtérgico se halla involucrado en la modulación del componente motor del CAA, quizás a través de los efectos inhibitorios directos de las Hcrts sobre este núcleo (Date et al., 1999; Backberg et al., 2002; Klisch et al., 2009).

Es posible que bajo nuestro paradigma comportamental los animales KO PPH se vean imposibilitados de reducir la actividad del SQN resultando en la deficiencia comportamental observada. En la tarea para evitar un castigo la inhibición del SQN, de ser necesaria, estaría a cargo de otro u otros sistemas de señalización.

Nuestros resultados sugieren además la posibilidad de que sea la luz y no la fase de sueño la que determine la activación de las neuronas Hcrtérgicas como mayor componente promotor y estabilizador de la vigilia durante el comportamiento motivado por la recompensa positiva. Así, la presencia de luz suplanta al ritmo circadiano endógeno de los animales a través de las neuronas Hcrtérgicas, aunque es probable que otros sistemas se hallen también involucrados. Cuando el sistema se halla intacto, como en los animales WT, la luz actúa activando las neuronas Hcrtérgicas, las que a su vez inhiben el SQN y posiblemente otros centros promotores del sueño y excitan núcleos promotores de la vigilia. En ausencia del péptido (KO PPH), los efectos de la luz no son traducidos en señales pro-inhedoras y pro-excitatorias y por lo tanto el ritmo circadiano regulado por el SQN establece el patrón de activación e inhibición de estos sistemas. Es probable que la inhibición del SQN sea solo parte de un mecanismo mayor que involucra la activación/inhibición de otros sistemas. Sumado a ello, la falta de expresión de Fos en las neuronas Hcrtérgicas durante la tarea de eludir el choque eléctrico indica que el efecto de la luz sobre la activación Hcrtérgica este asociado a la valencia motivacional de la tarea. Son necesarios más estudios para determinar con mayor certeza el papel del SQN en la modulación de los comportamientos motivados por la obtención de una recompensa o evitar una situación aversiva durante la fase diurna, así como también evaluar la influencia de la valencia motivacional del comportamiento sobre la actividad de este núcleo.

### 7.3- Conclusiones

Los datos presentados en este trabajo demuestran que las neuronas Hcrtergicas se hallan reclutadas para la ejecución de una tarea para obtener una recompensa positiva, mientras no son reclutadas en situaciones aversivas. Sumado a ello, estas células participan del comportamiento solamente durante la fase diurna y en presencia de luz. Tomados en su conjunto esto indica un alto grado de especificidad en la actividad de un sistema promotor de la vigilia y quizás sea posible que este mismo fenómeno ocurra en otros sistemas de señalización. Esto sugiere la necesidad de reevaluar los conceptos actuales acerca de la generación y mantenimiento de la vigilia.

## 8. Sistema Hcrtérgico, perspectivas y avances recientes

### 8.1- Perspectivas

#### *8.1.1- Sistemas promotores de la vigilia*

Los resultados expuestos en el presente trabajo de tesis suponen un alto grado de especificidad en el reclutamiento de sistema promotor de la vigilia Hcrtérgico en función de la naturaleza motivacional de la tarea en ejecución. Como se mencionara en la discusión, es posible que este fenómeno ocurra en otros sistemas promotores de la vigilia. Es nuestra intención realizar nuevas tinciones histológicas combinando la expresión de genes de respuesta inmediata con marcadores que permitan identificar poblaciones neuronales específicas en las secciones de tejido de estos los mismos animales que utilizamos en el trabajo de tesis. En particular nos interesan los grupos neuronales relacionados a la generación y mantenimiento de la vigilia por lo que los candidatos naturales serían las neuronas histaminérgicas del hipotálamo posterior, serotoninérgicas del DR, los grupos colinérgicos del cerebro basal y las neuronas noradrenérgicas del LC.

#### *8.1.2- Registro de unidades Hcrtérgicas identificadas*

En el laboratorio contamos con la posibilidad de realizar el registro de unidades utilizando la tecnología de los microalambres combinada con microtorres (Fig. 19) como ha sido previamente descrito en animales sin restricciones de movimiento. Con este sistema podemos identificar la descarga de neuronas individuales y determinar su patrón de actividad así como su firma electrofisiológica. Utilizando la combinación de estos dos elementos y sumados a la respuesta antidrómica producto de la estimulación con electrodos bipolares en la región de la VTA, es posible identificar a las neuronas Hcrtérgicas basados en criterios previamente publicados (Mileykovskiy et al., 2005). Este tipo de estudios complementan los trabajos comportamentales e histológicos. Debido a la alta resolución temporal de esta técnica es posible observar cambios inmediatos en el comportamiento de las neuronas bajo registro. El hecho de que los animales se hallen libres para moverse permite la combinación de los registros con diferentes tareas comportamentales, como por ejemplo, la obtención de una recompensa. Máas aún es

posible analizar el comportamiento de la neurona durante diferentes fases del comportamiento como la expectativa de recibir la recompensa, el momento de recibirla y el consumo de la misma.

La estabilidad de la preparación permite el registro de la misma neurona por varios días sucesivos. Esto permite que una vez identificada la neurona como Hertzérgica, los animales comiencen su entrenamiento comportamental, pudiendo observar posibles cambios en diferentes fases tanto del aprendizaje como de la consolidación del comportamiento. Otras posibilidades como la respuesta a diferentes estímulos sensoriales, motores o farmacológicos son también posibles.

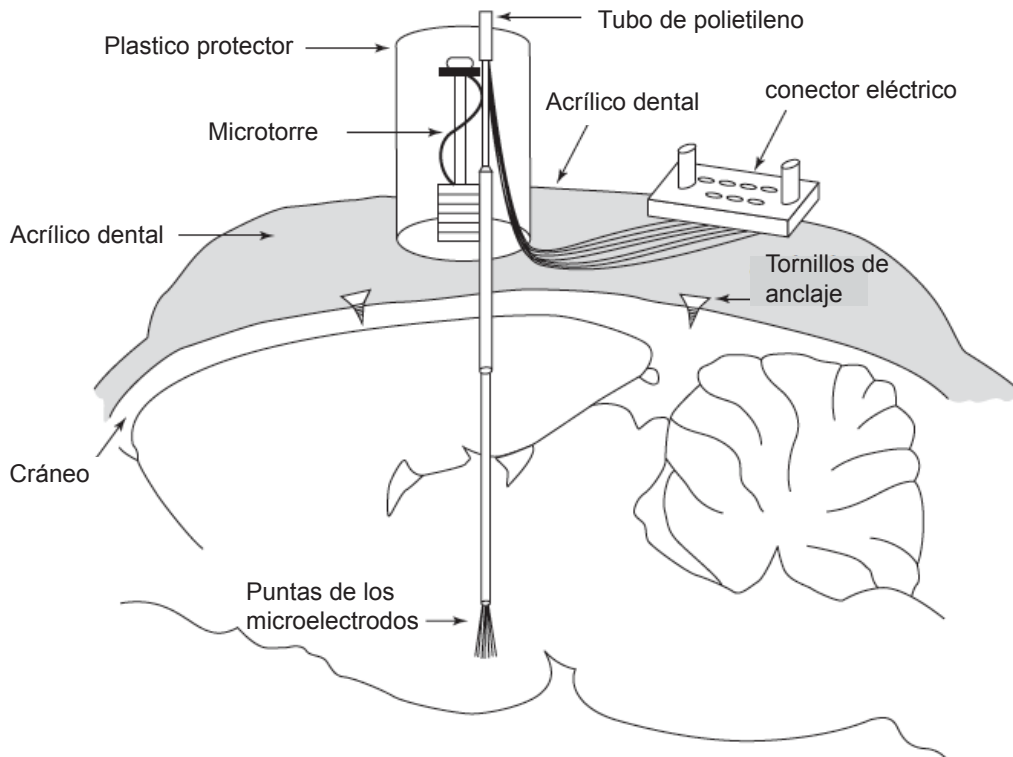
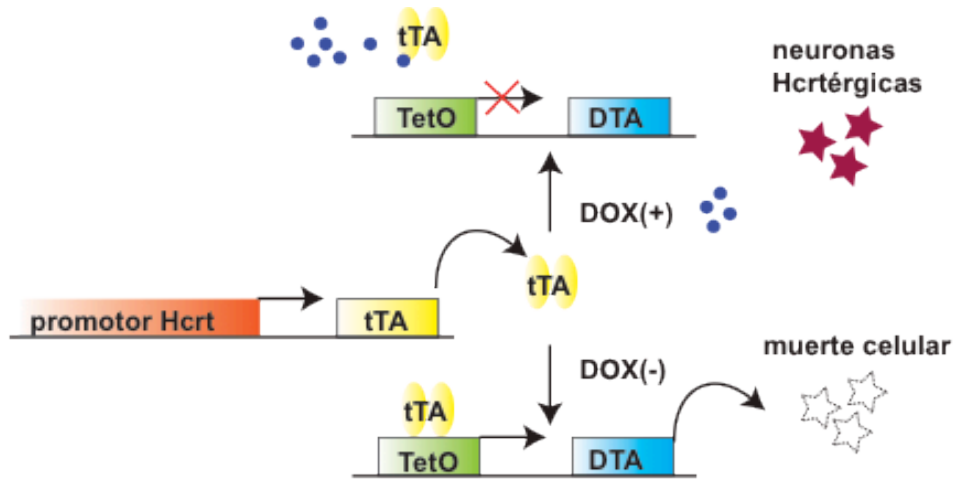


Fig. 19. Representación esquemática de la posición de ensamblaje microtorre/microelectrodos en el cráneo de la rata. La microtorre es colocada en el cerebro mediante técnica estereotáxica y cementada al cráneo con cemento dental. Los microelectrodos son luego insertados en dentro de la cánula interna de la microtorre hasta la profundidad establecida. El ensamblaje es protegido por una cubierta plástica. Los microelectrodos son soldados a un conector eléctrico que a su vez es cementado al cráneo del animal.

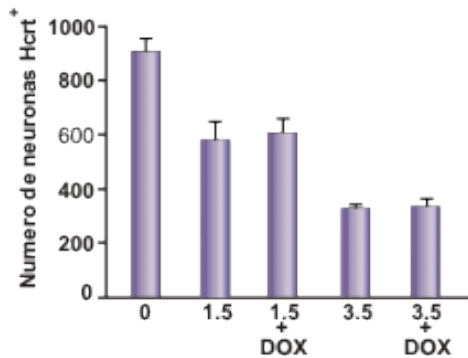
### 8.1.3- Número de neuronas Hcrtérgicas

También resulta de interés el número de neuronas Hcrtérgicas necesarias para mantener la motivación de los animales para trabajar por una recompensa durante la fase diurna. Para ello, nuestro laboratorio adquirió recientemente un nuevo modelo animal con delección temporal controlada de las neuronas Hcrtérgicas (Fig. 20a,b,c). En estos animales se utiliza un sistema de expresión tet-off para controlar la expresión del gen en la presencia o ausencia de doxiciclina (DOX). Los ratones que expresan la proteína tetraciclina transactivadora (tTA) bajo el control del promotor PPH (Hcrt-tTA), son cruzados con ratones TetO-fragmento A difteria-toxina (DAT) para generar el doble transgénico Hcrt-tTA:TetO-DTA (DTA-Hcrt, ver apéndice). En estos animales la ausencia de DOX provoca la expresión de DTA, que a su vez induce la muerte celular de las neuronas Hcrtérgicas (Fig. 20b). La restauración de DOX detiene el proceso de muerte celular y las neuronas remanentes no presentan diferencias morfológicas con aquellas de los animales control.

**a**



**b**



**c**

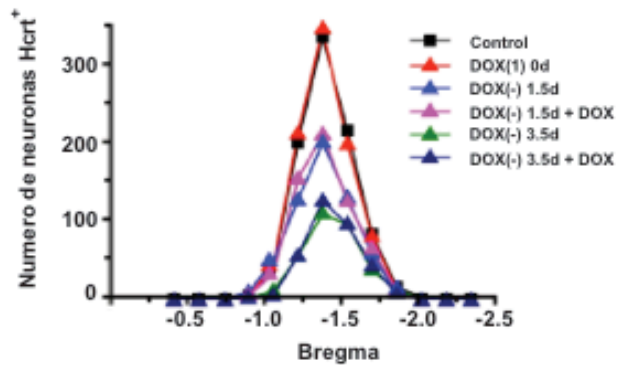


Figura 20. La remoción de DOX de la dieta provoca la muerte de las neuronas Hcrtérgicas y una reducción permanente en su número. **a**, Diagrama esquemático del mecanismo de acción del modelo de eliminación selectiva de neuronas Hcrtérgicas Hcrt-tTA:TetO-DTA. **b**, Reducción en el número de neuronas Hcrtérgicas en función del tiempo de remoción de la DOX. 1.5d provoca un descenso del 30% y 3.5d un descenso del 50% en el número de neuronas. **c**, Pérdida celular Hcrtérgica a lo largo del campo Hcrtérgico con diferentes tiempos de remoción de DOX.

Utilizando este modelo animal realizaremos los mismos paradigmas comportamentales con refuerzo positivo pero introduciendo la eliminación gradual de las



neuronas Hcrtérgicas mediante la remoción de DOX de la dieta por diferentes períodos de tiempo.

Este mismo modelo de eliminación controlada de neuronas Hcrtérgicas nos permite evaluar el impacto de la pérdida de este sistema de señalización sobre otros sistemas de neurotransmisión. Aunque la pérdida parcial de neuronas Hcrtérgicas ha sido descrita con anterioridad como en ratas mayores (40%), (Kessler et al., 2011) luego de la castración de ratones macho (30%) (Muschamp et al., 2007) o como producto de la administración de leptina a ratas hembra (16.5%)(Mendoza et al., 2011), no hay reportes acerca de las consecuencias que ello tiene sobre otros sistemas. Sin embargo, recientemente reportamos que la pérdida casi total de las neuronas Hcrtérgicas en los humanos narcolépticos (90%) provoca un incremento del 64% en el número de neuronas histaminérgicas (Fig. 21 a,b) (John et al., 2013). A pesar de este incremento significativo en el número de células no se observaron diferencias morfológicas o de tamaño comparados con los humanos control (Fig. 21c). Este mismo fenómeno fue concomitantemente descrito por un segundo grupo de investigadores independientes confirmando nuestros resultados (Valko et al., 2013). Este aumento en el número neuronal puede ser interpretado como un intento compensatorio del SNC que resulta en efectos parciales ya que los niveles de histamina en pacientes narcolépticos se hayan por debajo de los niveles normales y en algunos casos son similares (Nishino et al., 2009; Bassetti et al., 2010; Dauvilliers et al., 2012). Es posible que la señalización Hcrtérgica mantenga el tamaño de la población histaminérgica dentro de ciertos parámetros numéricos. Alternativamente, el aumento en el tono histaminérgico puede hallarse involucrado en la muerte neuronal Hcrtérgica. La siguiente etapa en este trabajo será el estudio de otros sistemas promotores de la vigilia como el LC y las poblaciones colinérgicas del cerebro basal en los pacientes narcolépticos así como en los ratones DTA-Hcrt.

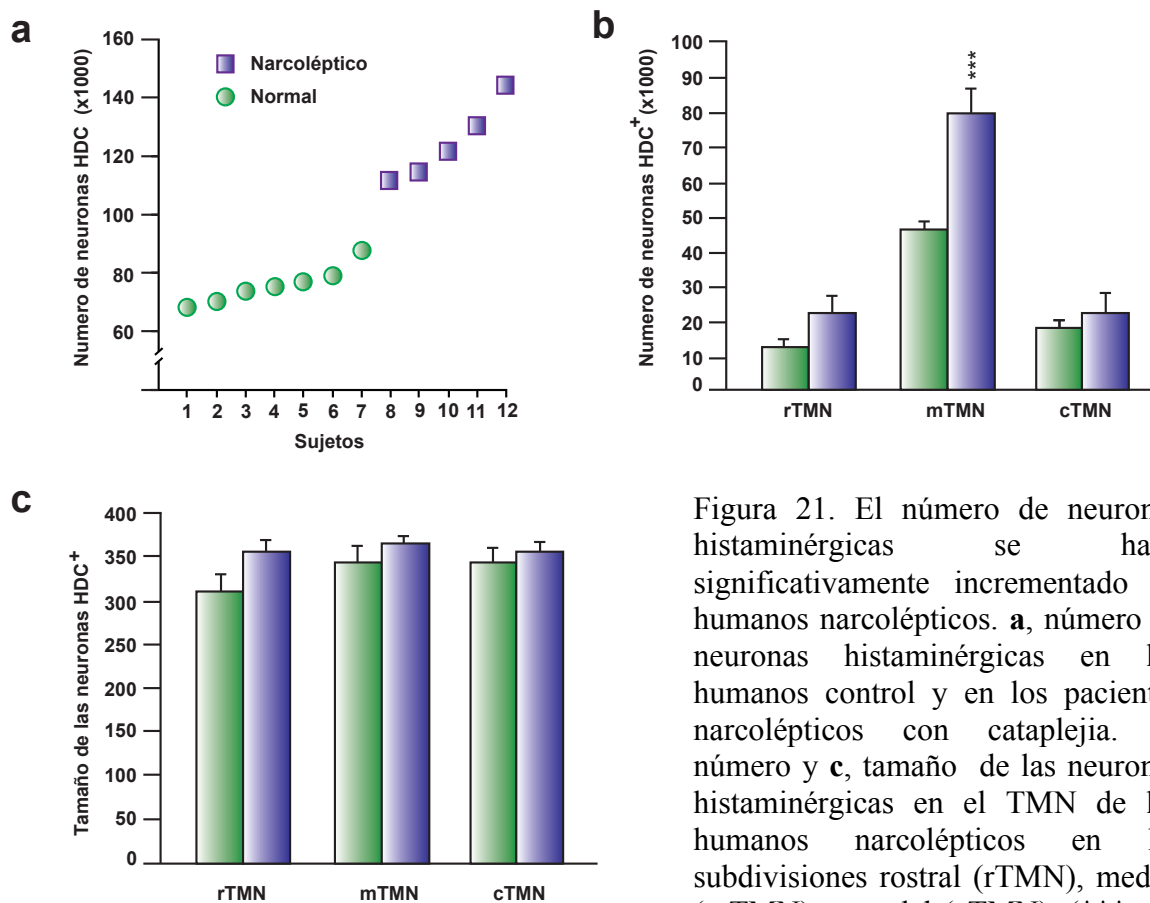


Figura 21. El número de neuronas histaminérgicas se halla significativamente incrementado en humanos narcolépticos. **a**, número de neuronas histaminérgicas en los humanos control y en los pacientes narcolépticos con cataplejía. **b**, número y **c**, tamaño de las neuronas histaminérgicas en el TMN de los humanos narcolépticos en las subdivisiones rostral (rTMN), medial (mTMN) y caudal (cTMN). (\*\*\*)  $p = 0.006$ , test de t)

## 8.2- Avances recientes

### 8.2.1- Aumento en el número de neuronas Hcrtérgicas

De forma interesante, los animales en nuestro grupo experimental control de cámara operante, durante la fase nocturna, mostraron un incremento (aunque no significativo) del número de neuronas Hcrtérgicas comparados con los animales del mismo grupo experimental durante la fase diurna ( $1131 \pm 74$  fase nocturna vs  $935 \pm 188$  fase diurna). Este fenómeno concuerda con los datos previamente publicados con respecto a la variación circadiana en los niveles de mRNA PPH hipotalámico y de las fibras Hcrtérgicas en la POA y en la formación pontina (Taheri et al., 2000). En su conjunto estos resultados nos llevaron a suponer que los niveles de Hcrts en las células

puede variar con el ciclo circadiano de tal forma que cierto número de neuronas se hallarían por debajo del límite de detección de nuestra técnica y por ello resultar “invisibles” durante la fase diurna. Para comprobar esta hipótesis utilizamos N-[(7S)-1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidrobenzo[a]heptaleno-7-yl]acetamida (colchicina, ver Métodos Suplementarios), un inhibidor de la polimerización de los microtúbulos con el fin de acumular los productos de síntesis en el cuerpo neuronal. De esta manera en los somas de las neuronas se acumularían las Hcrts haciendo posible su detección mediante nuestra técnica IHQ. Para nuestra sorpresa, los animales que recibieron colchicina presentaron un incremento significativo en el número de neuronas Hcrtérgicas comparados con salino ( $1510.8 \pm 113.6$  colchicina vs  $1120 \pm 44.4$  control, 34.9% de aumento) (Fig. 22a). En los animales tratados con colchicina todas las neuronas Hcrtérgicas se observaron distribuidas exclusivamente en el hipotálamo en las regiones previamente descritas (Fig. 22b,c).

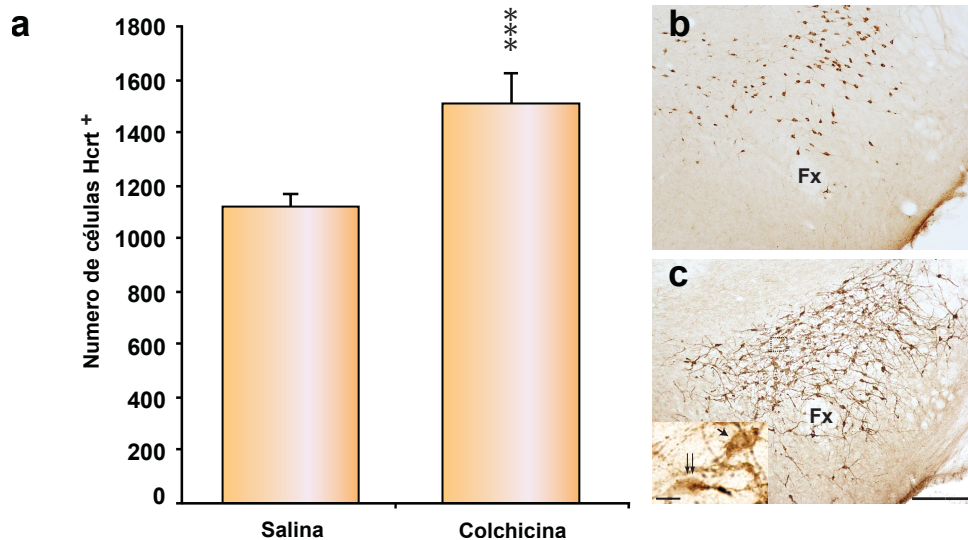


Figura 22. La administración de colchicina aumenta significativamente el número de neuronas inmunopositivas para Hcrts. **a**, Número de neuronas en animales tratados con solución salina o colchicina. (n = 5 para cada grupo experimental, \*\*\* p = 0.006, test de t) **b,c**, Fotomicrografía de la misma región del hipotálamo de una sección procesada para Hcrts de un animal tratado con solución salina (**b**) o colchicina (**c**). Barra de calibración, 250  $\mu$ m. El área rectangular en **c** se encuentra magnificado en el inserto debajo y a la izquierda. Barra de calibración, 10  $\mu$ m. En los animales tratados con colchicina se observaron células robustamente inmunopositivas (flecha negra corta) y células con menor índice de inmunoreacción (dobles flechas largas).

Estos resultados muestran por primera vez que existe un mayor número de neuronas que expresan Hcrts que el asumido hasta el momento y que forman parte de la fisiología normal de este sistema. Es admisible que en estas células “invisibles” las Hcrts sean sintetizadas en el cuerpo celular, rápidamente empacadas y enviadas a los terminales, sin una reserva de péptidos en el cuerpo celular. Una mayor o menor demanda de Hcrts por las estructuras blanco podría determinar el aumento o disminución en la producción de los péptidos, respectivamente, lo que se reflejaría en el incremento o decremento en el número de neuronas detectadas. A pesar de estas fluctuaciones, debe de existir un nivel basal de neuronas necesario para el funcionamiento del sistema ya que la falta de Hcrts resulta en narcolepsia. Asimismo, no es posible afirmar que nuestro tratamiento con colchicina revele todas las neuronas que expresan Hcrts, ya que las concentraciones de la droga utilizadas provocan el rápido deterioro de los sistemas vitales con un período de sobrevida de 55 h. Es posible que este marco temporal no sea suficiente para que todas las neuronas Hcrtérgicas “invisibles” sobrepasen el umbral de detección de nuestra técnica IHQ.

Basados en estos resultados, revisamos los datos obtenidos de un cerebro humano control que recientemente procesamos para la detección de Hcrts y que contenía un número significativamente mayor de neuronas Hcrtérgicas comparado con el promedio de los humanos control (114000 vs 69553 respectivamente, Fig. 23a). A pesar de un menor tamaño celular promedio (reducción del 11%) (Fig. 23b), la morfología neuronal se observó sin cambios significativos comparada con el resto de los controles. En busca de una explicación para este elevado número de neuronas Hcrtérgicas nos referimos a la historia clínica del paciente. En está encontramos que el individuo había sido adicto a la heroína por varios años en el transcurso de su vida.

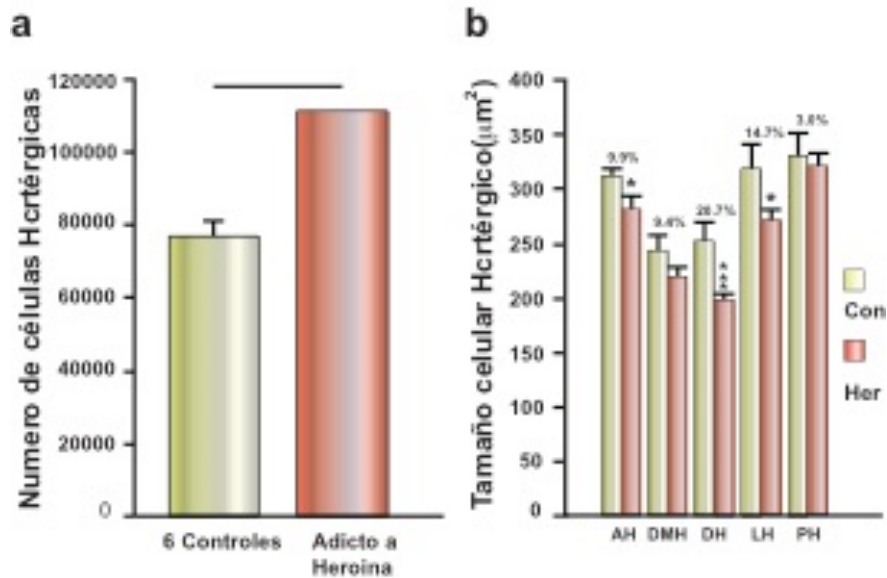


Figura 23. Cambios en las células Hcrtérgicas en un humano adicto a la heroína. **a**, Número de neuronas inmunopositivas para Hcrt en un humano adicto y en humanos control (n=6, p<0.0001, test de t). **b**, Tamaño celular de las neuronas Hcrtérgicas en el humano adicto y en los humanos control \*\*\* p<0.001, \* p<0.01, test de t) A, anterior, DM, dorsomedial, L, lateral, P posterior

Estos cambios anatómicos observados luego del uso prolongado de heroína en el paciente humano, sumado al aumento de mRNA PPH en el LH y de los receptores para opioides ( $\mu$ ) en las neuronas Hcrtérgicas luego de la administración de morfina en ratas (Zhou et al., 2006), sugiere que la administración de opioides podría aumentar el número de neuronas Hcrtérgicas detectadas por IHQ. Para confirmar esta hipótesis administramos sulfato de morfina (100 mg/kg s.c., se utiliza la misma dosis a menos que se indique lo contrario) por 3 o 14 días consecutivos a un grupo de ratones WT y luego procesamos los cerebros para la detección IHQ de Hcrt. Observamos que el tratamiento mas prolongado (14 días) provoca un incremento del 37% en el número de neuronas Hcrtérgicas en la misma región hipotalámica en donde residen las neuronas endógenas. Además tanto los 3 días como los 14 días de tratamiento provocan una misma reducción del 23% en el tamaño celular de las neuronas Hcrtérgicas comparados con el control (Fig. 24a1, a2 y b). Resulta interesante que solo 3 días de exposición a la morfina son suficientes para provocar la reducción en el tamaño celular observado en el período de administración mas prolongado (Fig. 24a1). Estos cambios en el número y tamaño se mantienen por 14

días luego de la última dosis de morfina (Fig. 24b) indicando la permanencia del efecto durante el período de abstinencia y la posibilidad de que estos cambios anatómicos puedan estar relacionados al proceso adictivo.

Contrariamente a lo que ocurre con las neuronas Hcrtérgicas, observamos una tendencia a la reducción en el número de neuronas MCHérgicas, sin cambios en el tamaño o morfología celular (Fig. 24c).

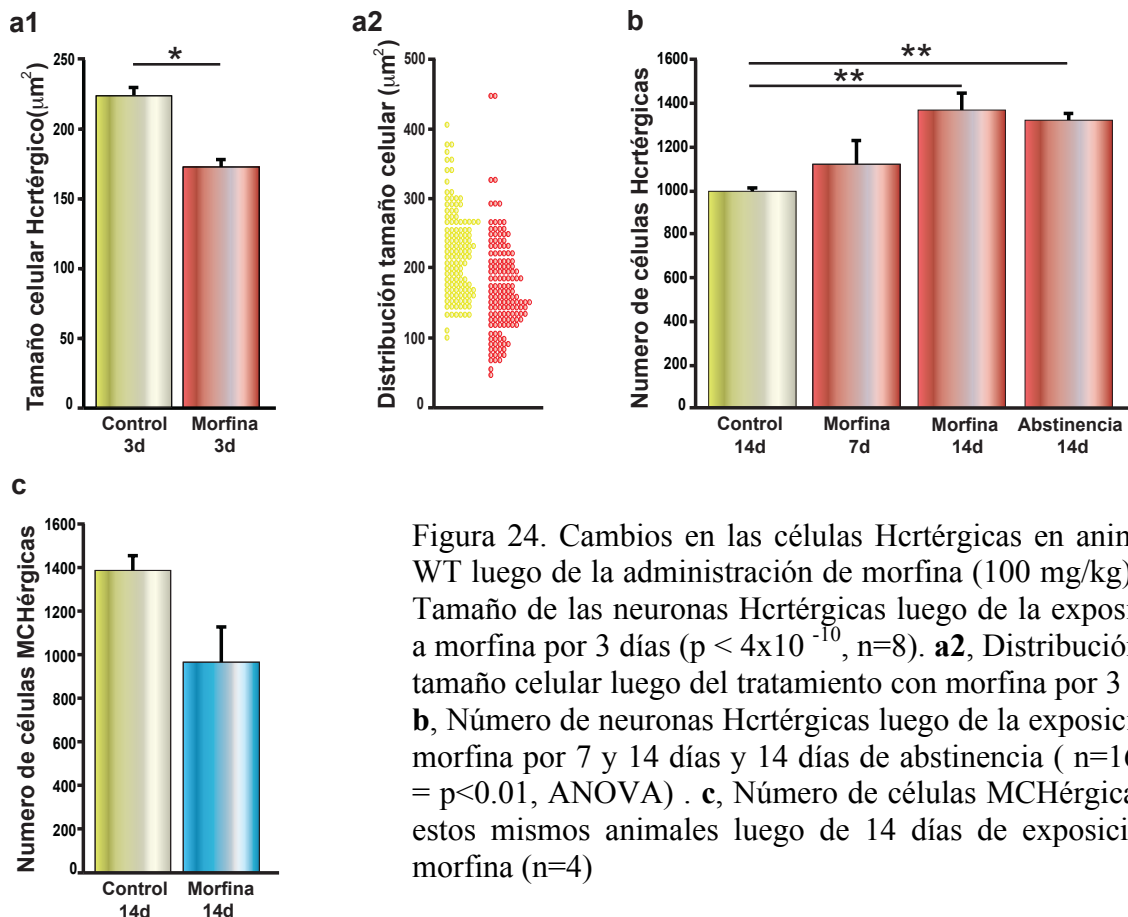


Figura 24. Cambios en las células Hcrtérgicas en animales WT luego de la administración de morfina (100 mg/kg). **a1**, Tamaño de las neuronas Hcrtérgicas luego de la exposición a morfina por 3 días ( $p < 4 \times 10^{-10}$ ,  $n=8$ ). **a2**, Distribución del tamaño celular luego del tratamiento con morfina por 3 días. **b**, Número de neuronas Hcrtérgicas luego de la exposición a morfina por 7 y 14 días y 14 días de abstinencia ( $n=16$ , \*\* =  $p < 0.01$ , ANOVA). **c**, Número de células MCHérgicas en estos mismos animales luego de 14 días de exposición a morfina ( $n=4$ )

Para confirmar este primer hallazgo, repetimos el mismo experimento utilizando el nuevo modelo de eliminación controlada de neuronas Hcrtérgicas DTA-Hcrt. La DOX fue removida de la dieta por 1.5d (pérdida del 30% de neuronas Hcrtérgicas) y se administró morfina (100 mg/kg, s.c.) o el mismo volumen de solución salina por 14 días. Los resultados confirmaron el primer hallazgo con un sorprendente aumento en el número de neuronas Hcrtérgicas en los animales tratados con morfina, restituyendo el

número de células a valores comparables a los animales WT (30% de aumento, Fig. 25a).

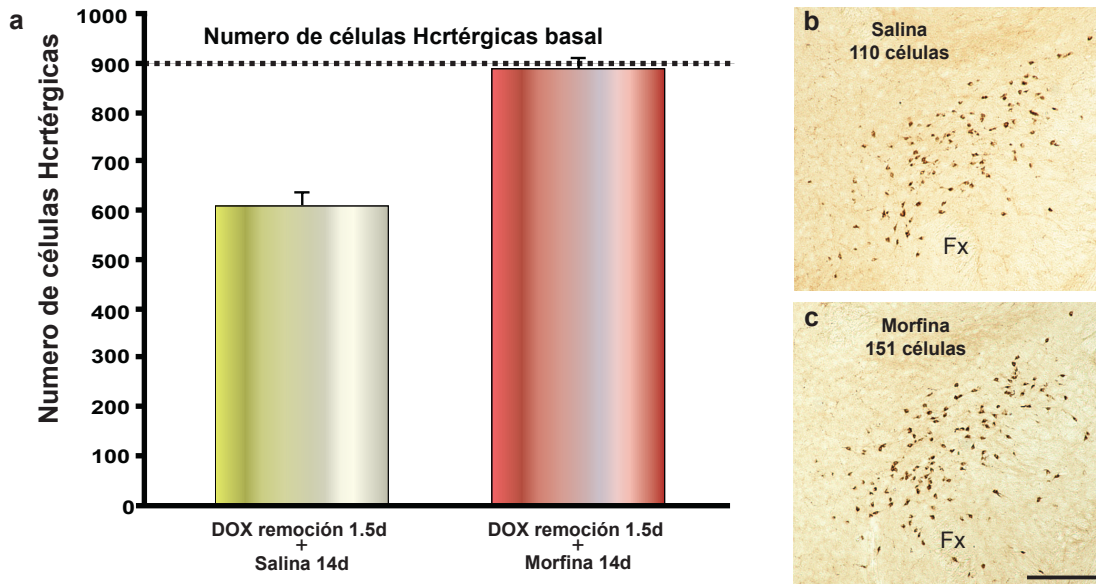


Figura 25. El número de células Hcrtérgicas es restaurado a niveles normales luego de la administración de morfina a los ratones DTA:Hcrt. **a**, Número de neuronas Hcrtérgicas en animales con remoción de DOX por 1.5 días y tratados con solución salina (amarillo) o morfina (rojo) ( $n=8$ ,  $p<0.003$  test de t). **b,c** Secciones de hipotálamo de ratones tratados con solución salina (**b**) o morfina (**c**). Se ilustra el incremento en el número de neuronas en los animales tratados con morfina. Fx fornix, barra de calibración, 200  $\mu$ m

Es posible que las nuevas células sean producto de la neurogénesis y no del aumento en la expresión del péptido. Sin embargo, nuestros estudios con la proteína de migración neuronal doblecortin, un indicador de las células migrantes recientemente formadas, no apoyan esta idea. En animales tratados con morfina por 14 días no hallamos células inmunopositivas para doblecortin en la PFA o áreas adyacentes, a pesar de encontrar un patrón normal de tinción en el giro dentado y el bulbo olfatorio (Fig. 26). Sin embargo para confirmar estos resultados son necesarios nuevos estudios con 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU, ver apéndice), técnica estándar para detectar células proliferantes en el cerebro adulto (Kee et al., 2002). No es posible distinguir con estos

métodos si las neuronas detectadas en condiciones basales son también afectadas por la administración de morfina y también aumentan la producción de los péptidos.

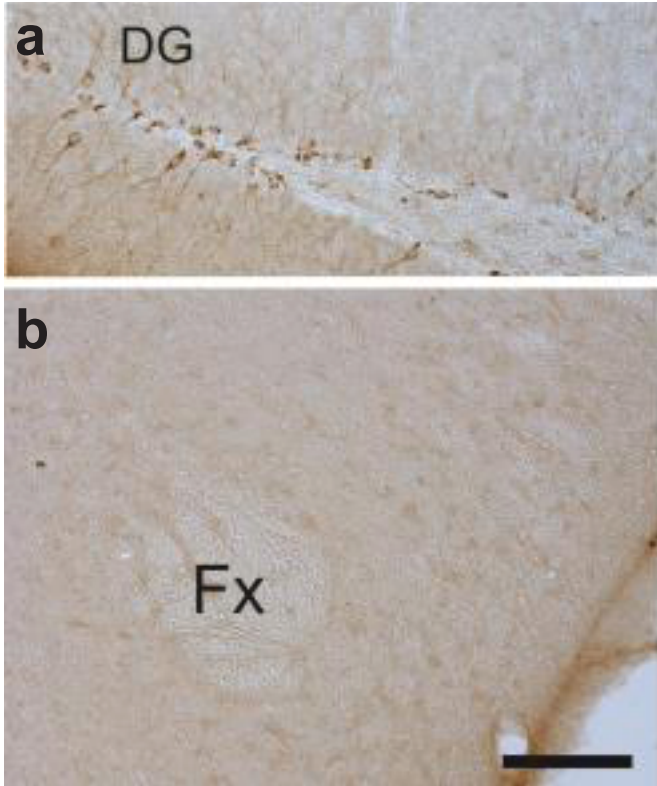


Figura 26. La morfina no provoca tinción hipotalámica para doblecortin en ratones WT. **a,b** Fotomicrografía de una sección del giro dentado (DG) (**a**) o del hipotálamo (**b**) de un ratón luego de 14 días de exposición a morfina y procesadas para doblecortin. Fx, fornix, barra de calibración, 100  $\mu$ m

Es posible también una explicación alternativa que involucra el concepto recientemente descrito para el cerebro adulto: la re-especificación de neurotransmisores. Mediante este principio las neuronas pueden adoptar una nueva identidad neuroquímica, fenómeno que es acompañado por la expresión de receptores postsinápticos para este transmisor estableciendo comunicación sináptica (Spitzer, 2012). Para determinar si las neuronas Hertérgicas son reclutadas de otros fenotipos neuroquímicos nos proponemos administrar morfina bajo el mismo protocolo seguido de colchicina. De resultar que el número de neuronas en los animales que recibieron morfina + colchicina excede al total observado en los animales que fueron tratados solamente con colchicina podemos concluir de que las “nuevas” neuronas Hertérgicas provienen de otra población neuronal siempre que los experimentos con Brdu confirmen los primeros hallazgos con



doblecortin. De hallar el mismo número de neuronas Hcrtérgicas en ambas condiciones, establecería un valor máximo para el número de neuronas Hcrtérgicas que se pueden regular bajo estas condiciones.

Las características anatómo-funcionales de estas células “invisibles” y como afectan a la fisiología del sistema permanecen casi completamente desconocidas. A pesar de ello, es posible sugerir que un aumento en el tono Hcrtérgico hipotalámico pueda traducirse en un incremento en la liberación de los péptidos en las estructuras blanco relacionadas con el procesamiento de recompensas como la VTA. Este incremento podría verse reflejado en un aumento en la plasticidad sináptica de los receptores AMPA observada en las células DAérgicas en esta región y relacionada a los procesos adictivos. Alternativamente es posible, que un aumento en el tono Hcrtérgico induzca la muerte celular de subpoblaciones de neuronas GABAérgicas en la VTA, y con ello se remueva el tono inhibitorio sobre las neuronas DAérgicas resultando en un aumento de la liberación de dopamina en el circuito mesocotricolímico. Otras estructuras como el pálido ventral, asociado al procesamiento del valor hedónico de ciertas recompensas y sensible a las Hcrts puede responder también a un aumento en el tono Hcrtérgico (Berridge, 2013). Aunque especulativos, estos mecanismos pueden formar parte de la regulación de la adicción a los opioides y quizás a otras drogas de abuso. Más aún, es posible que la permanencia de estos cambios anatómicos observados en los modelos animales y en el paciente humano pueda explicar, en parte, la alta prevalencia en la recaída al consumo de opioides (Smyth et al., 2010).

### 8.3- Morfina, hipocretinas y narcolepsia.

Basados en los resultados experimentales obtenidos con la administración de morfina, resulta natural suponer que los humanos narcolépticos tratados con morfina puedan experimentar una mejora en la sintomatología de ésta enfermedad. Una búsqueda en la literatura reveló una serie de datos inesperados y quizás estimados intrascendentes ya que los opioides no constituyen parte del tratamiento general para la narcolepsia. En 1981 un paciente tratado con codeína (una forma metilada de morfina) para el tratamiento de la

enfermedad de Crohn reportó "la desaparición de la narcolepsia, cataplejía, parálisis del sueño y las alucinaciones hipnagógicas" (Harper, 1981). En un segundo caso, un paciente narcoléptico con cataplejía quien no podía ser tratado con psicoestimulantes debido a su condición, solicitó a su médico le recetara codeína para su narcolepsia por la disminución significativa de los síntomas que había experimentado luego de tomar ésta droga. El médico reportó el caso indicando "una mejora dramática en el nivel de alerta y una reducción sustancial de la cataplejía" (Benbadis, 1996). Un tercer trabajo examinó los efectos de la codeína en 27 pacientes narcolépticos (Fry et al., 1986). Los diarios de sueño (ver apéndice) y los reportes de los pacientes indican una mejora significativa en los síntomas con respecto al placebo, aunque sin diferencia en el test múltiple de latencia al sueño. Estos investigadores asumieron el mecanismo farmacológico convencional para los opioides y realizaron el experimento solamente por una semana. Sin embargo nuestros resultados muestran que se requieren al menos dos semanas de tratamiento con morfina para observar la elevación en el número de neuronas en los ratones y posiblemente lleve al menos dos semanas en lo humanos. En el presente estudio mostramos por primera vez un mecanismo mediante el cual los opioides pueden provocar la disminución de los síntomas de la narcolepsia humana.

## 9- Apéndice

*BrdU*; 5-bromo-2'-deoxiuridina es un nucleótido sintético análogo a la timidina. Esta molécula es utilizada para la detección de células proliferantes en tejidos vivos. La BrdU puede ser incorporada en la nueva molécula de DNA sintetizada en sustitución de la timidina durante la replicación del DNA. Se puede luego utilizar anticuerpos específicos para la detección de el BrdU utilizando IHQ revelando cuales células contienen DNA recientemente sintetizados.

*CPP*; preferencia de lugar condicionado. Es un paradigma experimental de condicionamiento Pavloviano utilizado para cuantificar los efectos motivacionales de objetos o experiencias. El sujeto experimental es colocado en una jaula con dos compartimientos uno de los cuales se asocia con la recompensa, por ejemplo una droga de abuso, mientras que en el otro se asocia con el vehículo. Este procedimiento es de uso común para establecer las propiedades reforzadoras de algunas drogas. El paradigma puede ser también utilizado para la aversión de lugar condicionado, administrando un estímulo aversivo en lugar de una recompensa.

*Diarios de sueño*; se refiere a un documento mantenido por los pacientes en los cuales se registra típicamente la hora de acostarse y de levantarse, siestas diurnas, continuidad del sueño, consumo de cafeína y/o alcohol y factores estresantes. Es común que estos diarios sean utilizados una o dos semanas previas al test múltiple de latencia al sueño.

*DTA-Hcrt*; Los animales tet-DTA expresan el fragmento A de la toxina diftérica (DTA) bajo el control de un operador tetraciclina (TeTO, también llamado elemento de respuesta a la tetraciclina, TRE, u operador-tet) y un promotor mínimo de cytomegalovirus. Cuando son cruzados con animales que expresan la proteína transactivadora controlada por tetraciclina (tTA), la expresión de la DTA puede ser controlada por doxiciclina (DOX, un análogo a la tetraciclina) en los dobles transgénicos. Para el caso particular del modelo de narcolepsia, la expresión de tTA se halla bajo el control del promotor para la PPH otorgando especificidad al fenotipo neuronal a ser eliminado.

*Test múltiple de latencia al sueño*; es una herramienta diagnóstica utilizada para evaluar desordenes del sueño utilizando registros electroencefalográficos, electromiográficos y movimientos oculares. Durante el test se mide el tiempo entre el inicio de una siesta diurna y los primeros signos de sueño al que se denomina latencia al sueño. El test se basa en el precepto de que personas mas somnolientas se dormirán mas rápido. El examen consiste de cinco siestas, una cada dos horas. Este test es utilizado para evaluar los pacientes narcolépticos, para determinar la excesiva somnolencia diurna. Las personas normales demoran entre 10-20 minutos en conciliar el sueño, mientras que el tiempo para los narcolépticos es típicamente menos de 5 minutos.

## 10- Bibliografia

- Abrahamson EE, Leak RK, Moore RY (2001) The suprachiasmatic nucleus projects to posterior hypothalamic arousal systems. *Neuroreport* 12:435-440.
- Acosta-Galvan G, Yi CX, van der Vliet J, Jhamandas JH, Panula P, Angeles-Castellanos M, Del Carmen Basualdo M, Escobar C, Buijs RM (2011) Interaction between hypothalamic dorsomedial nucleus and the suprachiasmatic nucleus determines intensity of food anticipatory behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:5813-5818.
- Adamantidis AR, Zhang F, Aravanis AM, Deisseroth K, de Lecea L (2007) Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons. *Nature* 450:420-424.
- Alvarez CE, Sutcliffe JG (2002) Hypocretin is an early member of the incretin gene family. *Neurosci Lett* 324:169-172.
- Ammoun S, Holmqvist T, Shariatmadari R, Oonk HB, Detheux M, Parmentier M, Akerman KE, Kukkonen JP (2003) Distinct recognition of OX1 and OX2 receptors by orexin peptides. *J Pharmacol Exp Ther* 305:507-514.
- Annerbrink K, Westberg L, Olsson M, Andersch S, Sjodin I, Holm G, Allgulander C, Eriksson E (2011) Panic disorder is associated with the Val308Ile polymorphism in the hypocretin receptor gene. *Psychiatr Genet* 21:85-89.
- Arendt DH, Hassell J, Li H, Achua JK, Guarnieri DJ, Dileone RJ, Ronan PJ, Summers CH (2014) Anxiolytic function of the orexin 2/hypocretin A receptor in the basolateral amygdala. *Psychoneuroendocrinology* 40:17-26.
- Avolio E, Alo R, Carelli A, Canonaco M (2011) Amygdalar orexinergic-GABAergic interactions regulate anxiety behaviors of the Syrian golden hamster. *Behav Brain Res* 218:288-295.
- Backberg M, Hervieu G, Wilson S, Meister B (2002) Orexin receptor-1 (OX-R1) immunoreactivity in chemically identified neurons of the hypothalamus: focus on orexin targets involved in control of food and water intake. *Eur J Neurosci* 15:315-328.
- Balcita-Pedicino JJ, Sesack SR (2007) Orexin axons in the rat ventral tegmental area synapse infrequently onto dopamine and gamma-aminobutyric acid neurons. *J Comp Neurol* 503:668-684.
- Bassetti CL, Baumann CR, Dauvilliers Y, Croyal M, Robert P, Schwartz JC (2010) Cerebrospinal fluid histamine levels are decreased in patients with narcolepsy and excessive daytime sleepiness of other origin. *J Sleep Res* 19:620-623.
- Baumann CR, Clark EL, Pedersen NP, Hecht JL, Scammell TE (2008) Do enteric neurons make hypocretin? *Regul Pept* 147:1-3.
- Benbadis SR (1996) Effective treatment of narcolepsy with codeine in a patient receiving hemodialysis. *Pharmacotherapy* 16:463-465.
- Berghorn K BJ, and Hoffman G. (1994) cFos immunoreactivity is enhanced with biotin amplification. *J Histochem Cytochem* 42:1635-1642.
- Berridge C-YHaKC (2013) An Orexin Hotspot in Ventral Pallidum Amplifies Hedonic 'Liking' for Sweetness. *Neuropsychopharmacology*:1-10.

- Beuckmann CT, Sinton CM, Williams SC, Richardson JA, Hammer RE, Sakurai T, Yanagisawa M (2004) Expression of a poly-glutamine-ataxin-3 transgene in orexin neurons induces narcolepsy-cataplexy in the rat. *J Neurosci* 24:4469-4477.
- Bingham S, Davey PT, Babbs AJ, Irving EA, Sammons MJ, Wyles M, Jeffrey P, Cutler L, Riba I, Johns A, Porter RA, Upton N, Hunter AJ, Parsons AA (2001) Orexin-A, an hypothalamic peptide with analgesic properties. *Pain* 92:81-90.
- Blanco M, Lopez M, Garcia-Caballero T, Gallego R, Vazquez-Boquete A, Morel G, Senarís R, Casanueva F, Dieguez C, Beiras A (2001) Cellular localization of orexin receptors in human pituitary. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1616-1619.
- Blanco-Centurion C, Gerashchenko D, Shiromani PJ (2007) Effects of saporin-induced lesions of three arousal populations on daily levels of sleep and wake. *J Neurosci* 27:14041-14048.
- Blouin AM, Thannickal TC, Worley PF, Baraban JM, Reti IM, Siegel JM (2005) Narp immunostaining of human hypocretin (orexin) neurons: loss in narcolepsy. *Neurology* 65:1189-1192.
- Blouin AM, Fried I, Wilson CL, Staba RJ, Behnke EJ, Lam HA, Maidment NT, Karlsson KAE, Lapierre JL, Siegel JM (2013) Human hypocretin and melanin-concentrating hormone levels are linked to emotion and social interaction. *Nat Commun* 4:1547.
- Borgland SL, Malenka RC, Bonci A (2004) Acute and chronic cocaine-induced potentiation of synaptic strength in the ventral tegmental area: electrophysiological and behavioral correlates in individual rats. *J Neurosci* 24:7482-7490.
- Borgland SL, Storm E, Bonci A (2008) Orexin B/hypocretin 2 increases glutamatergic transmission to ventral tegmental area neurons. *Eur J Neurosci* 28:1545-1556.
- Borgland SL, Taha SA, Sarti F, Fields HL, Bonci A (2006) Orexin A in the VTA is critical for the induction of synaptic plasticity and behavioral sensitization to cocaine. *Neuron* 49:589-601.
- Borgland SL, Chang SJ, Bowers MS, Thompson JL, Vittoz N, Floresco SB, Chou J, Chen BT, Bonci A (2009) Orexin A/hypocretin-1 selectively promotes motivation for positive reinforcers. *J Neurosci* 29:11215-11225.
- Brewster JL, de Valoir T, Dwyer ND, Winter E, Gustin MC (1993) An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* 259:1760-1763.
- Bulavin DV, Fornace AJ, Jr. (2004) p38 MAP kinase's emerging role as a tumor suppressor. *Adv Cancer Res* 92:95-118.
- Burdakov D, Gerasimenko O, Verkhatsky A (2005) Physiological changes in glucose differentially modulate the excitability of hypothalamic melanin-concentrating hormone and orexin neurons in situ. *J Neurosci* 25:2429-2433.
- Burdakov D, Jensen LT, Alexopoulos H, Williams RH, Fearon IM, O'Kelly I, Gerasimenko O, Fugger L, Verkhatsky A (2006) Tandem-pore K<sup>+</sup> channels mediate inhibition of orexin neurons by glucose. *Neuron* 50:711-722.
- Burlet S, Tyler CJ, Leonard CS (2002) Direct and indirect excitation of laterodorsal tegmental neurons by Hypocretin/Orexin peptides: implications for wakefulness and narcolepsy. *J Neurosci* 22:2862-2872.

- Carter ME, Adamantidis A, Ohtsu H, Deisseroth K, de Lecea L (2009) Sleep homeostasis modulates hypocretin-mediated sleep-to-wake transitions. *J Neurosci* 29:10939-10949.
- Carver CS, Miller CJ (2006) Relations of serotonin function to personality: current views and a key methodological issue. *Psychiatry Res* 144:1-15.
- Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, Elmquist JK, Scammell T, Lee C, Richardson JA, Williams SC, Xiong Y, Kisanuki Y, Fitch TE, Nakazato M, Hammer RE, Saper CB, Yanagisawa M (1999) Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell* 98:437-451.
- Chen CT, Dun SL, Kwok EH, Dun NJ, Chang JK (1999) Orexin A-like immunoreactivity in the rat brain. *Neurosci Lett* 260:161-164.
- Chen J, Randeve HS (2004) Genomic organization of mouse orexin receptors: characterization of two novel tissue-specific splice variants. *Mol Endocrinol* 18:2790-2804.
- Chen J, Karteris E, Collins D, Randeve HS (2006) Differential expression of mouse orexin receptor type-2 (OX2R) variants in the mouse brain. *Brain Res* 1103:20-24.
- Choi DL, Davis JF, Fitzgerald ME, Benoit SC (2010) The role of orexin-A in food motivation, reward-based feeding behavior and food-induced neuronal activation in rats. *Neuroscience* 167:11-20.
- Chou TC, Lee CE, Lu J, Elmquist JK, Hara J, Willie JT, Beuckmann CT, Chemelli RM, Sakurai T, Yanagisawa M, Saper CB, Scammell TE (2001) Orexin (hypocretin) neurons contain dynorphin. *J Neurosci* 21:RC168.
- Conrad KL, Davis AR, Silberman Y, Sheffler DJ, Shields AD, Saleh SA, Sen N, Matthies HJ, Javitch JA, Lindsley CW, Winder DG (2012) Yohimbine depresses excitatory transmission in BNST and impairs extinction of cocaine place preference through orexin-dependent, norepinephrine-independent processes. *Neuropsychopharmacology* 37:2253-2266.
- Crocker A, Espana RA, Papadopoulou M, Saper CB, Faraco J, Sakurai T, Honda M, Mignot E, Scammell TE (2005) Concomitant loss of dynorphin, NARP, and orexin in narcolepsy. *Neurology* 65:1184-1188.
- Cullinan WE, Herman JP, Battaglia DF, Akil H, Watson SJ (1995) Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience* 64:477-505.
- Cutler DJ, Morris R, Sheridhar V, Wattam TA, Holmes S, Patel S, Arch JR, Wilson S, Buckingham RE, Evans ML, Leslie RA, Williams G (1999) Differential distribution of orexin-A and orexin-B immunoreactivity in the rat brain and spinal cord. *Peptides* 20:1455-1470.
- Cvetkovic-Lopes V, Bayer L, Dorsaz S, Maret S, Pradervand S, Dauvilliers Y, Lecendreux M, Lammers GJ, Donjacour CE, Du Pasquier RA, Pfister C, Petit B, Hor H, Muhlethaler M, Tafti M (2010) Elevated Tribbles homolog 2-specific antibody levels in narcolepsy patients. *J Clin Invest* 120:713-719.
- Dall'Aglio C, Pedini V, Scocco P, Boiti C, Ceccarelli P (2010) Immunohistochemical evidence of Orexin-A in the pancreatic beta cells of domestic animals. *Res Vet Sci* 89:147-149.
- Date Y, Mondal MS, Matsukura S, Nakazato M (2000a) Distribution of orexin-A and orexin-B (hypocretins) in the rat spinal cord. *Neurosci Lett* 288:87-90.

- Date Y, Mondal MS, Matsukura S, Ueta Y, Yamashita H, Kaiya H, Kangawa K, Nakazato M (2000b) Distribution of orexin/hypocretin in the rat median eminence and pituitary. *Brain Res Mol Brain Res* 76:1-6.
- Date Y, Ueta Y, Yamashita H, Yamaguchi H, Matsukura S, Kangawa K, Sakurai T, Yanagisawa M, Nakazato M (1999) Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:748-753.
- Dauvilliers Y, Delalée N, Jaussent I, Scholz S, Bayard S, Croyal M, Schwartz JC, Robert P (2012) Normal cerebrospinal fluid histamine and tele-methylhistamine levels in hypersomnia conditions. *Sleep* 35:1359-1366.
- Dauvilliers Y, Montplaisir J, Cochen V, Desautels A, Einen M, Lin L, Kawashima M, Bayard S, Monaca C, Tiberge M, Filipini D, Tripathy A, Nguyen BH, Kotagal S, Mignot E (2010) Post-H1N1 narcolepsy-cataplexy. *Sleep* 33:1428-1430.
- Day H.E. KEM, Nyhuis T.J., Herlihy L, Campeau S. (2008) Conditioned Fear Inhibits c-fos mRNA Expression in the Central Extended Amygdala. *Brain Res* 1229:137-146.
- de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS, 2nd, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG (1998) The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:322-327.
- Deadwyler SA, Porrino L, Siegel JM, Hampson RE (2007) Systemic and nasal delivery of orexin-A (Hypocretin-1) reduces the effects of sleep deprivation on cognitive performance in nonhuman primates. *J Neurosci* 27:14239-14247.
- Dragunow M FR (1989) The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. *Journal of Neuroscience Methods* 29:261-265.
- Eggermann E, Serafin M, Bayer L, Machard D, Saint-Mleux B, Jones BE, Muhlethaler M (2001) Orexins/hypocretins excite basal forebrain cholinergic neurones. *Neuroscience* 108:177-181.
- Elliot AJ (2006) The Hierarchical Model of Approach-Avoidance Motivation. *Motiv Emot* 30:111-116.
- Elliot AJ (2008) *Handbook of Approach and Avoidance Motivation* 1Edition: Psychology Press.
- Ellis J, Pediani JD, Canals M, Milasta S, Milligan G (2006) Orexin-1 receptor-cannabinoid CB1 receptor heterodimerization results in both ligand-dependent and -independent coordinated alterations of receptor localization and function. *J Biol Chem* 281:38812-38824.
- Eriksson KS, Sergeeva O, Brown RE, Haas HL (2001) Orexin/hypocretin excites the histaminergic neurons of the tuberomammillary nucleus. *J Neurosci* 21:9273-9279.
- Espana RA, Oleson EB, Locke JL, Brookshire BR, Roberts DC, Jones SR (2010) The hypocretin-orexin system regulates cocaine self-administration via actions on the mesolimbic dopamine system. *Eur J Neurosci* 31:336-348.
- Estabrooke IV, McCarthy MT, Ko E, Chou TC, Chemelli RM, Yanagisawa M, Saper CB, Scammell TE (2001) Fos expression in orexin neurons varies with behavioral state. *J Neurosci* 21:1656-1662.



- Evans NA, Groarke DA, Warrack J, Greenwood CJ, Dodgson K, Milligan G, Wilson S (2001) Visualizing differences in ligand-induced beta-arrestin-GFP interactions and trafficking between three recently characterized G protein-coupled receptors. *J Neurochem* 77:476-485.
- Fernando AB, Murray JE, Milton AL (2013) The amygdala: securing pleasure and avoiding pain. *Front Behav Neurosci* 7:190.
- Fronczek R, Lammers GJ, Balesar R, Unmehopa UA, Swaab DF (2005) The number of hypothalamic hypocretin (orexin) neurons is not affected in Prader-Willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 90:5466-5470.
- Fry JM, Pressman MR, DiPhillipo MA, Forst-Paulus M (1986) Treatment of narcolepsy with codeine. *Sleep* 9:269-274.
- Fujiki N, Yoshida Y, Ripley B, Mignot E, Nishino S (2003) Effects of IV and ICV hypocretin-1 (orexin A) in hypocretin receptor-2 gene mutated narcoleptic dogs and IV hypocretin-1 replacement therapy in a hypocretin-ligand-deficient narcoleptic dog. *Sleep* 26:953-959.
- Fujiki N, Yoshida Y, Ripley B, Honda K, Mignot E, Nishino S (2001) Changes in CSF hypocretin-1 (orexin A) levels in rats across 24 hours and in response to food deprivation. *Neuroreport* 12:993-997.
- Fujiki N, Yoshida Y, Zhang S, Sakurai T, Yanagisawa M, Nishino S (2006) Sex difference in body weight gain and leptin signaling in hypocretin/orexin deficient mouse models. *Peptides* 27:2326-2331.
- Fung SJ, Yamuy J, Sampogna S, Morales FR, Chase MH (2001) Hypocretin (orexin) input to trigeminal and hypoglossal motoneurons in the cat: a double-labeling immunohistochemical study. *Brain Res* 903:257-262.
- Furutani N, Hondo M, Kageyama H, Tsujino N, Mieda M, Yanagisawa M, Shioda S, Sakurai T (2013) Neurotensin co-expressed in orexin-producing neurons in the lateral hypothalamus plays an important role in regulation of sleep/wakefulness States. *PLoS One* 8:e62391.
- Gallopín T, Fort P, Eggermann E, Cauli B, Luppi PH, Rossier J, Audinat E, Muhlethaler M, Serafin M (2000) Identification of sleep-promoting neurons in vitro. *Nature* 404:992-995.
- Gerashchenko D, Kohls MD, Greco M, Waleh NS, Salin-Pascual R, Kilduff TS, Lappi DA, Shiromani PJ (2001) Hypocretin-2-saporin lesions of the lateral hypothalamus produce narcoleptic-like sleep behavior in the rat. *J Neurosci* 21:7273-7283.
- Goel N, Banks S, Mignot E, Dinges DF (2010) DQB1\*0602 predicts interindividual differences in physiologic sleep, sleepiness, and fatigue. *Neurology* 75:1509-1519.
- Gonzalez JA, Jensen LT, Doyle SE, Miranda-Anaya M, Menaker M, Fugger L, Bayliss DA, Burdakov D (2009) Deletion of TASK1 and TASK3 channels disrupts intrinsic excitability but does not abolish glucose or pH responses of orexin/hypocretin neurons. *Eur J Neurosci* 30:57-64.
- Grasing K, Li N, He S, Parrish C, Delich J, Glowa J (2003) A new progressive ratio schedule for support of morphine self-administration in opiate dependent rats. *Psychopharmacology (Berl)* 168:387-396.
- Guilleminault C AA (2000) Narcolepsy. In: Principles and practice of sleep medicine (Kryger MH RT, Dement WC, ed), pp 676–686. Philadelphia: W.B. Saunders.

- Guyon A, Tardy MP, Rovere C, Nahon JL, Barhanin J, Lesage F (2009) Glucose inhibition persists in hypothalamic neurons lacking tandem-pore K<sup>+</sup> channels. *J Neurosci* 29:2528-2533.
- Hagan JJ et al. (1999) Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:10911-10916.
- Hakansson M, de Lecea L, Sutcliffe JG, Yanagisawa M, Meister B (1999) Leptin receptor- and STAT3-immunoreactivities in hypocretin/orexin neurones of the lateral hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 11:653-663.
- Hale MW, Hay-Schmidt, A., Mikkelsen, J.D., Poulsen, B., Shekhar, A., and Lowry, C. A. (2008) Exposure to an open-field arena increases c-Fos expression in a distributed anxiety-related system projecting to the basolateral amygdaloid complex. 155:659–672.
- Han F, Lin L, Warby SC, Faraco J, Li J, Dong SX, An P, Zhao L, Wang LH, Li QY, Yan H, Gao ZC, Yuan Y, Strohl KP, Mignot E (2011) Narcolepsy onset is seasonal and increased following the 2009 H1N1 pandemic in China. *Ann Neurol* 70:410-417.
- Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ (1994) A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 265:808-811.
- Harper JM (1981) Gelineau's narcolepsy relieved by opiates. *Lancet* 1:92.
- Harris GC, Wimmer M, Aston-Jones G (2005) A role for lateral hypothalamic orexin neurons in reward seeking. *Nature* 437:556-559.
- Harrison TA, Chen CT, Dun NJ, Chang JK (1999) Hypothalamic orexin A-immunoreactive neurons project to the rat dorsal medulla. *Neurosci Lett* 273:17-20.
- Hata T, Chen J, Ebihara K, Date Y, Ishida Y, Nakahara D (2011) Intra-ventral tegmental area or intracerebroventricular orexin-A increases the intra-cranial self-stimulation threshold via activation of the corticotropin-releasing factor system in rats. *Eur J Neurosci* 34:816-826.
- Haynes AC, Jackson B, Chapman H, Tadayyon M, Johns A, Porter RA, Arch JR (2000) A selective orexin-1 receptor antagonist reduces food consumption in male and female rats. *Regul Pept* 96:45-51.
- Heifetz A, Morris GB, Biggin PC, Barker O, Fryatt T, Bentley J, Hallett D, Manikowski D, Pal S, Reifegerste R, Slack M, Law R (2012) Study of human Orexin-1 and -2 G-protein-coupled receptors with novel and published antagonists by modeling, molecular dynamics simulations, and site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 51:3178-3197.
- Hilairnet S, Bouaboula M, Carriere D, Le Fur G, Casellas P (2003) Hypersensitization of the Orexin 1 receptor by the CB1 receptor: evidence for cross-talk blocked by the specific CB1 antagonist, SR141716. *J Biol Chem* 278:23731-23737.
- Hollander JA, Lu Q, Cameron MD, Kamenecka TM, Kenny PJ (2008) Insular hypocretin transmission regulates nicotine reward. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:19480-19485.
- Holmqvist T, Akerman KE, Kukkonen JP (2001) High specificity of human orexin receptors for orexins over neuropeptide Y and other neuropeptides. *Neurosci Lett* 305:177-180.

- Hondo M, Nagai K, Ohno K, Kisanuki Y, Willie JT, Watanabe T, Yanagisawa M, Sakurai T (2010) Histamine-1 receptor is not required as a downstream effector of orexin-2 receptor in maintenance of basal sleep/wake states. *Acta Physiol (Oxf)* 198:287-294.
- Horvath TL, Diano S, van den Pol AN (1999a) Synaptic interaction between hypocretin (orexin) and neuropeptide Y cells in the rodent and primate hypothalamus: a novel circuit implicated in metabolic and endocrine regulations. *J Neurosci* 19:1072-1087.
- Horvath TL, Peyron C, Diano S, Ivanov A, Aston-Jones G, Kilduff TS, van Den Pol AN (1999b) Hypocretin (orexin) activation and synaptic innervation of the locus coeruleus noradrenergic system. *J Comp Neurol* 415:145-159.
- Houben T, Deboer T, van Oosterhout F, Meijer JH (2009) Correlation with behavioral activity and rest implies circadian regulation by SCN neuronal activity levels. *J Biol Rhythms* 24:477-487.
- Huang H, Ghosh P, van den Pol AN (2006) Prefrontal cortex-projecting glutamatergic thalamic paraventricular nucleus-excited by hypocretin: a feedforward circuit that may enhance cognitive arousal. *J Neurophysiol* 95:1656-1668.
- Huang H, Acuna-Goycolea C, Li Y, Cheng HM, Obrietan K, van den Pol AN (2007) Cannabinoids excite hypothalamic melanin-concentrating hormone but inhibit hypocretin/orexin neurons: implications for cannabinoid actions on food intake and cognitive arousal. *J Neurosci* 27:4870-4881.
- Huang ZL, Qu WM, Li WD, Mochizuki T, Eguchi N, Watanabe T, Urade Y, Hayaishi O (2001) Arousal effect of orexin A depends on activation of the histaminergic system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9965-9970.
- Jacobs BL, Fornal CA (1999) Activity of serotonergic neurons in behaving animals. *Neuropsychopharmacology* 21:9S-15S.
- Jantti MH, Putula J, Somerharju P, Frohman MA, Kukkonen JP (2012) OX1 orexin/hypocretin receptor activation of phospholipase D. *Br J Pharmacol* 165:1109-1123.
- Johansson L, Ekholm ME, Kukkonen JP (2007) Regulation of OX1 orexin/hypocretin receptor-coupling to phospholipase C by Ca<sup>2+</sup> influx. *Br J Pharmacol* 150:97-104.
- John J, Wu MF, Boehmer LN, Siegel JM (2004) Cataplexy-active neurons in the hypothalamus: implications for the role of histamine in sleep and waking behavior. *Neuron* 42:619-634.
- John J, Thannickal TC, McGregor R, Ramanathan L, Ohtsu H, Nishino S, Sakai N, Yamanaka A, Stone C, Cornford M, Siegel JM (2013) Greatly increased numbers of histamine cells in human narcolepsy with cataplexy. *Ann Neurol*.
- Johren O, Neidert SJ, Kummer M, Dendorfer A, Dominiak P (2001) Prepro-orexin and orexin receptor mRNAs are differentially expressed in peripheral tissues of male and female rats. *Endocrinology* 142:3324-3331.
- Jupp B, Krstew E, Dezsai G, Lawrence AJ (2011a) Discrete cue-conditioned alcohol-seeking after protracted abstinence: pattern of neural activation and involvement of orexin(1) receptors. *Br J Pharmacol* 162:880-889.
- Jupp B, Krivdic B, Krstew E, Lawrence AJ (2011b) The orexin(1) receptor antagonist SB-334867 dissociates the motivational properties of alcohol and sucrose in rats. *Brain Res* 1391:54-59.

- Kalogiannis M, Hsu E, Willie JT, Chemelli RM, Kisanuki YY, Yanagisawa M, Leonard CS (2011) Cholinergic modulation of narcoleptic attacks in double orexin receptor knockout mice. *PLoS One* 6:e18697.
- Karnani MM, Apergis-Schoute J, Adamantidis A, Jensen LT, de Lecea L, Fugger L, Burdakov D (2011) Activation of central orexin/hypocretin neurons by dietary amino acids. *Neuron* 72:616-629.
- Kastin AJ, Akerstrom V (1999) Orexin A but not orexin B rapidly enters brain from blood by simple diffusion. *J Pharmacol Exp Ther* 289:219-223.
- Kaur S, Thankachan S, Begum S, Blanco-Centurion C, Sakurai T, Yanagisawa M, Shiromani PJ (2008) Entrainment of temperature and activity rhythms to restricted feeding in orexin knock out mice. *Brain Res* 1205:47-54.
- Kayaba Y, Nakamura A, Kasuya Y, Ohuchi T, Yanagisawa M, Komuro I, Fukuda Y, Kuwaki T (2003) Attenuated defense response and low basal blood pressure in orexin knockout mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285:R581-593.
- Kee N, Sivalingam S, Boonstra R, Wojtowicz JM (2002) The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. *J Neurosci Methods* 115:97-105.
- Kessler BA, Stanley EM, Frederick-Duus D, Fadel J (2011) Age-related loss of orexin/hypocretin neurons. *Neuroscience* 178:82-88.
- Kirchgessner AL, Liu M (1999) Orexin synthesis and response in the gut. *Neuron* 24:941-951.
- Kiss A (2007) Immobilization induced fos expression in the medial and lateral hypothalamic areas: a limited response of hypocretin neurons. *Ideggyogy Sz* 60:192-195.
- Klisch C, Inyushkin A, Mordel J, Karnas D, Pevet P, Meissl H (2009) Orexin A modulates neuronal activity of the rodent suprachiasmatic nucleus in vitro. *Eur J Neurosci* 30:65-75.
- Kryger MH RT, Dement WC (2011) *Principles and Practice of Sleep Medicine*, 5th Edition. St Louis: Elsevier.
- Kukkonen JP (2013) Physiology of the orexinergic/hypocretinergic system: a revisit in 2012. *Am J Physiol Cell Physiol* 304:C2-32.
- Kukkonen JP, Holmqvist T, Ammoun S, Akerman KE (2002) Functions of the orexinergic/hypocretinergic system. *Am J Physiol Cell Physiol* 283:C1567-1591.
- Kuru M, Ueta Y, Serino R, Nakazato M, Yamamoto Y, Shibuya I, Yamashita H (2000) Centrally administered orexin/hypocretin activates HPA axis in rats. *Neuroreport* 11:1977-1980.
- Lapierre JL, Kosenko PO, Lyamin OI, Kodama T, Mukhametov LM, Siegel JM (2007) Cortical acetylcholine release is lateralized during asymmetrical slow-wave sleep in northern fur seals. *J Neurosci* 27:11999-12006.
- Lapierre JL, Kosenko PO, Kodama T, Peever JH, Mukhametov LM, Lyamin OI, Siegel JM (2013) Symmetrical serotonin release during asymmetrical slow-wave sleep: implications for the neurochemistry of sleep-waking states. *J Neurosci* 33:2555-2561.
- Laricchiuta D, Petrosini L (2014) Individual differences in response to positive and negative stimuli: endocannabinoid-based insight on approach and avoidance behaviors. *Front Syst Neurosci* 8:238.

- Lee MG, Hassani OK, Jones BE (2005a) Discharge of identified orexin/hypocretin neurons across the sleep-waking cycle. *J Neurosci* 25:6716-6720.
- Lee MG, Hassani OK, Alonso A, Jones BE (2005b) Cholinergic basal forebrain neurons burst with theta during waking and paradoxical sleep. *J Neurosci* 25:4365-4369.
- Li Y, van den Pol AN (2006) Differential target-dependent actions of coexpressed inhibitory dynorphin and excitatory hypocretin/orexin neuropeptides. *J Neurosci* 26:13037-13047.
- Li Y, Gao XB, Sakurai T, van den Pol AN (2002) Hypocretin/Orexin excites hypocretin neurons via a local glutamate neuron-A potential mechanism for orchestrating the hypothalamic arousal system. *Neuron* 36:1169-1181.
- Liu F, Xu GZ, Wang L, Jiang SX, Yang XL, Zhong YM (2011) Gene expression and protein distribution of orexins and orexin receptors in rat retina. *Neuroscience* 189:146-155.
- Liu RJ, van den Pol AN, Aghajanian GK (2002) Hypocretins (orexins) regulate serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus by excitatory direct and inhibitory indirect actions. *J Neurosci* 22:9453-9464.
- Lopez M, Senaris R, Gallego R, Garcia-Caballero T, Lago F, Seoane L, Casanueva F, Dieguez C (1999) Orexin receptors are expressed in the adrenal medulla of the rat. *Endocrinology* 140:5991-5994.
- Lund PE, Shariatmadari R, Uustare A, Detheux M, Parmentier M, Kukkonen JP, Akerman KE (2000) The orexin OX1 receptor activates a novel Ca<sup>2+</sup> influx pathway necessary for coupling to phospholipase C. *J Biol Chem* 275:30806-30812.
- Lungwitz EA, Molosh A, Johnson PL, Harvey BP, Dirks RC, Dietrich A, Minick P, Shekhar A, Truitt WA (2012) Orexin-A induces anxiety-like behavior through interactions with glutamatergic receptors in the bed nucleus of the stria terminalis of rats. *Physiol Behav* 107:726-732.
- Luscher C, Slesinger PA (2010) Emerging roles for G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels in health and disease. *Nat Rev Neurosci* 11:301-315.
- Lutter M, Krishnan V, Russo SJ, Jung S, McClung CA, Nestler EJ (2008) Orexin signaling mediates the antidepressant-like effect of calorie restriction. *J Neurosci* 28:3071-3075.
- Lyamin OI, Mukhametov LM, Siegel JM, Nazarenko EA, Polyakova IG, Shpak OV (2002) Unihemispheric slow wave sleep and the state of the eyes in a white whale. *Behav Brain Res* 129:125-129.
- Malherbe P, Roche O, Marcuz A, Kratzeisen C, Wettstein JG, Bissantz C (2010) Mapping the binding pocket of dual antagonist almorexant to human orexin 1 and orexin 2 receptors: comparison with the selective OX1 antagonist SB-674042 and the selective OX2 antagonist N-ethyl-2-[(6-methoxy-pyridin-3-yl)-(toluene-2-sulfonyl)-amino]-N-pyridin-3-ylmethyl-acetamide (EMPA). *Mol Pharmacol* 78:81-93.
- Maolood N, Meister B (2010) Nociceptin/orphanin FQ peptide in hypothalamic neurons associated with the control of feeding behaviour. *J Neuroendocrinol* 22:75-82.
- Marcus JN, Aschkenasi CJ, Lee CE, Chemelli RM, Saper CB, Yanagisawa M, Elmquist JK (2001) Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *J Comp Neurol* 435:6-25.

Masabumi M (2009) *International Review of Neurobiology*

- Mazzocchi G, Malendowicz LK, Aragona F, Rebuffat P, Gottardo L, Nussdorfer GG (2001) Human pheochromocytomas express orexin receptor type 2 gene and display an in vitro secretory response to orexins A and B. *J Clin Endocrinol Metab* 86:4818-4821.
- McGinty D, Szymusiak R (2001) Brain structures and mechanisms involved in the generation of NREM sleep: focus on the preoptic hypothalamus. *Sleep Med Rev* 5:323-342.
- McGinty DJ, Harper RM (1976) Dorsal raphe neurons: depression of firing during sleep in cats. *Brain Res* 101:569-575.
- McNaughton N, Gray JA (2000) Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. *J Affect Disord* 61:161-176.
- McPherson CS, Featherby T, Krstew E, Lawrence AJ (2007) Quantification of phosphorylated cAMP-response element-binding protein expression throughout the brain of amphetamine-sensitized rats: activation of hypothalamic orexin A-containing neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 323:805-812.
- Meerabux J, Iwayama Y, Sakurai T, Ohba H, Toyota T, Yamada K, Nagata R, Irukayama-Tomobe Y, Shimizu H, Yoshitsugu K, Ohta K, Yoshikawa T (2005) Association of an orexin 1 receptor 408Val variant with polydipsia-hyponatremia in schizophrenic subjects. *Biol Psychiatry* 58:401-407.
- Mendoza J, Lopez-Lopez C, Revel FG, Jeanneau K, Delerue F, Prinssen E, Challet E, Moreau JL, Grundschober C (2011) Dimorphic effects of leptin on the circadian and hypocretinergic systems of mice. *J Neuroendocrinol* 23:28-38.
- Mieda M, Willie JT, Hara J, Sinton CM, Sakurai T, Yanagisawa M (2004) Orexin peptides prevent cataplexy and improve wakefulness in an orexin neuron-ablated model of narcolepsy in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:4649-4654.
- Mieda M, Hasegawa E, Kisanuki YY, Sinton CM, Yanagisawa M, Sakurai T (2011) Differential roles of orexin receptor-1 and -2 in the regulation of non-REM and REM sleep. *J Neurosci* 31:6518-6526.
- Mikkelsen JD, Hauser F, deLecea L, Sutcliffe JG, Kilduff TS, Calgari C, Pevet P, Simonneaux V (2001) Hypocretin (orexin) in the rat pineal gland: a central transmitter with effects on noradrenaline-induced release of melatonin. *Eur J Neurosci* 14:419-425.
- Milasta S, Evans NA, Ormiston L, Wilson S, Lefkowitz RJ, Milligan G (2005) The sustainability of interactions between the orexin-1 receptor and beta-arrestin-2 is defined by a single C-terminal cluster of hydroxy amino acids and modulates the kinetics of ERK MAPK regulation. *Biochem J* 387:573-584.
- Milevskiy BY, Kiyashchenko LI, Siegel JM (2005) Behavioral correlates of activity in identified hypocretin/orexin neurons. *Neuron* 46:787-798.
- Mistlberger RE, Antle MC, Kilduff TS, Jones M (2003) Food- and light-entrained circadian rhythms in rats with hypocretin-2-saporin ablations of the lateral hypothalamus. *Brain Res* 980:161-168.

- Mochizuki T, Crocker A, McCormack S, Yanagisawa M, Sakurai T, Scammell TE (2004) Behavioral state instability in orexin knock-out mice. *J Neurosci* 24:6291-6300.
- Mochizuki T, Arrigoni E, Marcus JN, Clark EL, Yamamoto M, Honer M, Borroni E, Lowell BB, Elmquist JK, Scammell TE (2011) Orexin receptor 2 expression in the posterior hypothalamus rescues sleepiness in narcoleptic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:4471-4476.
- Mondal MS, Nakazato M, Date Y, Murakami N, Yanagisawa M, Matsukura S (1999a) Widespread distribution of orexin in rat brain and its regulation upon fasting. *Biochem Biophys Res Commun* 256:495-499.
- Mondal MS, Nakazato M, Date Y, Murakami N, Hanada R, Sakata T, Matsukura S (1999b) Characterization of orexin-A and orexin-B in the microdissected rat brain nuclei and their contents in two obese rat models. *Neurosci Lett* 273:45-48.
- Monti JM (2011) Serotonin control of sleep-wake behavior. *Sleep Med Rev* 15:269-281.
- Morgan JI, Cohen DR, Hempstead JL, Curran T (1987) Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science* 237:192-197.
- Moskowitz GB, Grant H (2009) *The Psychology of Goals*. New York: Guilford Press.
- Muraki Y, Yamanaka A, Tsujino N, Kilduff TS, Goto K, Sakurai T (2004) Serotonergic regulation of the orexin/hypocretin neurons through the 5-HT<sub>1A</sub> receptor. *J Neurosci* 24:7159-7166.
- Muschamp JW, Dominguez JM, Sato SM, Shen RY, Hull EM (2007) A role for hypocretin (orexin) in male sexual behavior. *J Neurosci* 27:2837-2845.
- Nair SG, Golden SA, Shaham Y (2008) Differential effects of the hypocretin 1 receptor antagonist SB 334867 on high-fat food self-administration and reinstatement of food seeking in rats. *Br J Pharmacol* 154:406-416.
- Nambu T, Sakurai T, Mizukami K, Hosoya Y, Yanagisawa M, Goto K (1999) Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Res* 827:243-260.
- Narita M, Nagumo Y, Hashimoto S, Khotib J, Miyatake M, Sakurai T, Yanagisawa M, Nakamachi T, Shioda S, Suzuki T (2006) Direct involvement of orexinergic systems in the activation of the mesolimbic dopamine pathway and related behaviors induced by morphine. *J Neurosci* 26:398-405.
- Nebreda AR, Porras A (2000) p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem Sci* 25:257-260.
- Nishino S, Sakurai E, Nevsimalova S, Yoshida Y, Watanabe T, Yanai K, Mignot E (2009) Decreased CSF histamine in narcolepsy with and without low CSF hypocretin-1 in comparison to healthy controls. *Sleep* 32:175-180.
- Nishino S, Okuro M, Kotorii N, Anegawa E, Ishimaru Y, Matsumura M, Kanbayashi T (2010) Hypocretin/orexin and narcolepsy: new basic and clinical insights. *Acta Physiol (Oxf)* 198:209-222.
- Nishino S, Fujiki N, Ripley B, Sakurai E, Kato M, Watanabe T, Mignot E, Yanai K (2001) Decreased brain histamine content in hypocretin/orexin receptor-2 mutated narcoleptic dogs. *Neurosci Lett* 313:125-128.
- Overeem S, Black JL, 3rd, Lammers GJ (2008) Narcolepsy: immunological aspects. *Sleep Med Rev* 12:95-107.
- Overton PG, Clark D (1997) Burst firing in midbrain dopaminergic neurons. *Brain Res Brain Res Rev* 25:312-334.

- Paxinos G, FKBJ (2001) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, Second Edition. In: *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, Second Edition: Academic Press.
- Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, de Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG, Kilduff TS (1998) Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci* 18:9996-10015.
- Peyron C et al. (2000) A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. *Nat Med* 6:991-997.
- Pickering AaG, JA (2001) Dopamine, appetitive reinforcement, and the neuropsychology of human learning: An individual differences approach. Germany: PABST Science Publishers Lengerich.
- Piper DC, Upton N, Smith MI, Hunter AJ (2000) The novel brain neuropeptide, orexin-A, modulates the sleep-wake cycle of rats. *Eur J Neurosci* 12:726-730.
- Rainero I, Gallone S, Rubino E, Ponzio P, Valfre W, Binello E, Fenoglio P, Gentile S, Anoaica M, Gasparini M, Pinessi L (2008) Haplotype analysis confirms the association between the HCRTR2 gene and cluster headache. *Headache* 48:1108-1114.
- Rainero I, Ostacoli L, Rubino E, Gallone S, Picci LR, Fenoglio P, Negro E, Rosso C, De Martino P, De Marchi M, Furlan PM, Pinessi L (2011) Association between major mood disorders and the hypocretin receptor 1 gene. *J Affect Disord* 130:487-491.
- Rajagopal S, Rajagopal K, Lefkowitz RJ (2010) Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Drug Discov* 9:373-386.
- Rao Y, Lu M, Ge F, Marsh DJ, Qian S, Wang AH, Picciotto MR, Gao XB (2008) Regulation of synaptic efficacy in hypocretin/orexin-containing neurons by melanin concentrating hormone in the lateral hypothalamus. *J Neurosci* 28:9101-9110.
- Redlin U, Mrosovsky N (1999) Masking of locomotor activity in hamsters. *J Comp Physiol A* 184:429-437.
- Robinson TE, Berridge KC (1993) The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Brain Res Rev* 18:247-291.
- Rodgers RJ, Halford JC, Nunes de Souza RL, Canto de Souza AL, Piper DC, Arch JR, Upton N, Porter RA, Johns A, Blundell JE (2001) SB-334867, a selective orexin-1 receptor antagonist, enhances behavioural satiety and blocks the hyperphagic effect of orexin-A in rats. *Eur J Neurosci* 13:1444-1452.
- Saal D, Dong Y, Bonci A, Malenka RC (2003) Drugs of abuse and stress trigger a common synaptic adaptation in dopamine neurons. *Neuron* 37:577-582.
- Sadja R, Alagem N, Reuveny E (2003) Gating of GIRK channels: details of an intricate, membrane-delimited signaling complex. *Neuron* 39:9-12.
- Sakurai T, Mieda M (2011) Connectomics of orexin-producing neurons: interface of systems of emotion, energy homeostasis and arousal. *Trends Pharmacol Sci* 32:451-462.
- Sakurai T, Nagata R, Yamanaka A, Kawamura H, Tsujino N, Muraki Y, Kageyama H, Kunita S, Takahashi S, Goto K, Koyama Y, Shioda S, Yanagisawa M (2005) Input of orexin/hypocretin neurons revealed by a genetically encoded tracer in mice. *Neuron* 46:297-308.



- Sakurai T et al. (1998) Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92:573-585.
- Salamone JD, Steinpreis RE, McCullough LD, Smith P, Grebel D, Mahan K (1991) Haloperidol and nucleus accumbens dopamine depletion suppress lever pressing for food but increase free food consumption in a novel food choice procedure. *Psychopharmacology (Berl)* 104:515-521.
- Sasaki K, Suzuki M, Mieda M, Tsujino N, Roth B, Sakurai T (2011) Pharmacogenetic modulation of orexin neurons alters sleep/wakefulness states in mice. *PLoS One* 6:e20360.
- Savaskan E, Muller-Spahn F, Meier F, Wirz-Justice A, Meyer P (2004) Orexins and their receptors in the human retina. *Pathobiology* 71:211-216.
- Scammell TE, Willie JT, Guilleminault C, Siegel JM (2009) A consensus definition of cataplexy in mouse models of narcolepsy. *Sleep* 32:111-116.
- Scheer FA, Pirovano C, Van Someren EJ, Buijs RM (2005) Environmental light and suprachiasmatic nucleus interact in the regulation of body temperature. *Neuroscience* 132:465-477.
- Schmitt O, Usunoff KG, Lazarov NE, Itzev DE, Eipert P, Rolfs A, Wree A (2012) Orexinergic innervation of the extended amygdala and basal ganglia in the rat. *Brain Struct Funct* 217:233-256.
- Schone C, Venner A, Knowles D, Karnani MM, Burdakov D (2011) Dichotomous cellular properties of mouse orexin/hypocretin neurons. *J Physiol* 589:2767-2779.
- Schone C, Apergis-Schoute J, Sakurai T, Adamantidis A, Burdakov D (2014) Coreleased orexin and glutamate evoke nonredundant spike outputs and computations in histamine neurons. *Cell Rep* 7:697-704.
- Schone C, Cao ZF, Apergis-Schoute J, Adamantidis A, Sakurai T, Burdakov D (2012) Optogenetic probing of fast glutamatergic transmission from hypocretin/orexin to histamine neurons in situ. *J Neurosci* 32:12437-12443.
- Schwartz WJ, Reppert SM, Eagan SM, Moore-Ede MC (1983) In vivo metabolic activity of the suprachiasmatic nuclei: a comparative study. *Brain Res* 274:184-187.
- Sharf R, Sarhan M, Brayton CE, Guarnieri DJ, Taylor JR, DiLeone RJ (2010) Orexin signaling via the orexin 1 receptor mediates operant responding for food reinforcement. *Biol Psychiatry* 67:753-760.
- Shibahara M, Sakurai T, Nambu T, Takenouchi T, Iwaasa H, Egashira SI, Ihara M, Goto K (1999) Structure, tissue distribution, and pharmacological characterization of *Xenopus* orexins. *Peptides* 20:1169-1176.
- Shin HS, Cho HS, Sung KW, Yoon BJ (2009) Orexin-A increases cell surface expression of AMPA receptors in the striatum. *Biochem Biophys Res Commun* 378:409-413.
- Siegel JM (2004) Hypocretin (orexin): role in normal behavior and neuropathology. *Annu Rev Psychol* 55:125-148.
- Siegel JM (2009) The neurobiology of sleep. *Semin Neurol* 29:277-296.
- Siegel JM, Boehmer LN (2006) Narcolepsy and the hypocretin system--where motion meets emotion. *Nat Clin Pract Neurol* 2:548-556.
- Siegel JM, Nienhuis R, Fahringer HM, Paul R, Shiromani P, Dement WC, Mignot E, Chiu C (1991) Neuronal activity in narcolepsy: identification of cataplexy-related cells in the medial medulla. *Science* 252:1315-1318.

- Smart D, Jerman JC, Brough SJ, Rushton SL, Murdock PR, Jewitt F, Elshourbagy NA, Ellis CE, Middlemiss DN, Brown F (1999) Characterization of recombinant human orexin receptor pharmacology in a Chinese hamster ovary cell-line using FLIPR. *Br J Pharmacol* 128:1-3.
- Smith RJ, See RE, Aston-Jones G (2009) Orexin/hypocretin signaling at the orexin 1 receptor regulates cue-elicited cocaine-seeking. *Eur J Neurosci* 30:493-503.
- Smyth BP, Barry J, Keenan E, Ducray K (2010) Lapse and relapse following inpatient treatment of opiate dependence. *Ir Med J* 103:176-179.
- Spitzer NC (2012) Activity-dependent neurotransmitter respecification. *Nat Rev Neurosci* 13:94-106.
- Stratford J MaFT, E. (2011) Central Representation of Postingestive Chemosensory Cues in Mice That Lack the Ability to Taste. *The Journal of Neuroscience* 31:9101-9110.
- Stuber GD, Klanker M, de Ridder B, Bowers MS, Joosten RN, Feenstra MG, Bonci A (2008) Reward-predictive cues enhance excitatory synaptic strength onto midbrain dopamine neurons. *Science* 321:1690-1692.
- Szymusiak R, McGinty D (2008) Hypothalamic regulation of sleep and arousal. *Ann N Y Acad Sci* 1129:275-286.
- Taheri S, Sunter D, Dakin C, Moyes S, Seal L, Gardiner J, Rossi M, Ghatei M, Bloom S (2000) Diurnal variation in orexin A immunoreactivity and prepro-orexin mRNA in the rat central nervous system. *Neurosci Lett* 279:109-112.
- Takahashi K, Kayama Y, Lin JS, Sakai K (2010) Locus coeruleus neuronal activity during the sleep-waking cycle in mice. *Neuroscience* 169:1115-1126.
- Thannickal TC, Nienhuis R, Siegel JM (2009) Localized loss of hypocretin (orexin) cells in narcolepsy without cataplexy. *Sleep* 32:993-998.
- Thannickal TC, Moore RY, Nienhuis R, Ramanathan L, Gulyani S, Aldrich M, Cornford M, Siegel JM (2000) Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy. *Neuron* 27:469-474.
- Thomas GM, Huganir RL (2004) MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 5:173-183.
- Thorpe AJ, Kotz CM (2005) Orexin A in the nucleus accumbens stimulates feeding and locomotor activity. *Brain Res* 1050:156-162.
- Thorpe AJ, Cleary JP, Levine AS, Kotz CM (2005) Centrally administered orexin A increases motivation for sweet pellets in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 182:75-83.
- Torrealba F, Yanagisawa M, Saper CB (2003) Colocalization of orexin a and glutamate immunoreactivity in axon terminals in the tuberomammillary nucleus in rats. *Neuroscience* 119:1033-1044.
- Tortorolo P, Yamuy, J., Sampogna, S. Morales, F.R. and Chase, M.H. (2001) Hypothalamic Neurons that Contain Hypocretin (Orexin) Express c - f o s During Active Wakefulness and Carbachol-induced Active Sleep. *Sleep Research Online* 4:25-32.
- Trivedi P, Yu H, MacNeil DJ, Van der Ploeg LH, Guan XM (1998) Distribution of orexin receptor mRNA in the rat brain. *FEBS Lett* 438:71-75.

- Tsujino N, Yamanaka A, Ichiki K, Muraki Y, Kilduff TS, Yagami K, Takahashi S, Goto K, Sakurai T (2005) Cholecystokinin activates orexin/hypocretin neurons through the cholecystokinin A receptor. *J Neurosci* 25:7459-7469.
- Tsunematsu T, Kilduff TS, Boyden ES, Takahashi S, Tominaga M, Yamanaka A (2011) Acute optogenetic silencing of orexin/hypocretin neurons induces slow-wave sleep in mice. *J Neurosci* 31:10529-10539.
- Turner SG, Sechzer JA, Liebelt RA (1967) Sensitivity to electric shock after ventromedial hypothalamic lesions. *Exp Neurol* 19:236-244.
- Turunen PM, Jantti MH, Kukkonen JP (2012) OX1 orexin/hypocretin receptor signaling through arachidonic acid and endocannabinoid release. *Mol Pharmacol* 82:156-167.
- Turunen PM, Ekholm ME, Somerharju P, Kukkonen JP (2010) Arachidonic acid release mediated by OX1 orexin receptors. *Br J Pharmacol* 159:212-221.
- Ungless MA, Argilli E, Bonci A (2010) Effects of stress and aversion on dopamine neurons: implications for addiction. *Neurosci Biobehav Rev* 35:151-156.
- Ungless MA, Whistler JL, Malenka RC, Bonci A (2001) Single cocaine exposure in vivo induces long-term potentiation in dopamine neurons. *Nature* 411:583-587.
- Valko PO, Gavrilov YV, Yamamoto M, Reddy H, Haybaeck J, Mignot E, Baumann CR, Scammell TE (2013) Increase of histaminergic tuberomammillary neurons in narcolepsy. *Ann Neurol*.
- van den Pol AN (1999) Hypothalamic hypocretin (orexin): robust innervation of the spinal cord. *J Neurosci* 19:3171-3182.
- Van Den Pol AN, Patrylo PR, Ghosh PK, Gao XB (2001) Lateral hypothalamus: early developmental expression and response to hypocretin (orexin). *J Comp Neurol* 433:349-363.
- van den Pol AN, Gao XB, Obrietan K, Kilduff TS, Belousov AB (1998) Presynaptic and postsynaptic actions and modulation of neuroendocrine neurons by a new hypothalamic peptide, hypocretin/orexin. *J Neurosci* 18:7962-7971.
- VanElzaker M FRD, Breindel T, Spencer R.L. (2008) Environmental novelty is associated with a selective increase in Fos expression in the output elements of the hippocampal formation and the perirhinal cortex. *Learn Mem* 15:899-908.
- Venner A, Karnani MM, Gonzalez JA, Jensen LT, Fugger L, Burdakov D (2011) Orexin neurons as conditional glucosensors: paradoxical regulation of sugar sensing by intracellular fuels. *J Physiol* 589:5701-5708.
- Vittoz NM, Berridge CW (2006) Hypocretin/orexin selectively increases dopamine efflux within the prefrontal cortex: involvement of the ventral tegmental area. *Neuropsychopharmacology* 31:384-395.
- Vittoz NM, Schmeichel B, Berridge CW (2008) Hypocretin /orexin preferentially activates caudomedial ventral tegmental area dopamine neurons. *Eur J Neurosci* 28:1629-1640.
- Ward RJ, Padiani JD, Milligan G (2011) Heteromultimerization of cannabinoid CB(1) receptor and orexin OX(1) receptor generates a unique complex in which both protomers are regulated by orexin A. *J Biol Chem* 286:37414-37428.
- Winsky-Sommerer R, Yamanaka A, Diano S, Borok E, Roberts AJ, Sakurai T, Kilduff TS, Horvath TL, de Lecea L (2004) Interaction between the corticotropin-

- releasing factor system and hypocretins (orexins): a novel circuit mediating stress response. *J Neurosci* 24:11439-11448.
- Wu MF, Nienhuis R, Maidment N, Lam HA, Siegel JM (2011) Cerebrospinal fluid hypocretin (orexin) levels are elevated by play but are not raised by exercise and its associated heart rate, blood pressure, respiration or body temperature changes. *Arch Ital Biol* 149:492-498.
- Xi MC, Morales FR, Chase MH (2001) Effects on sleep and wakefulness of the injection of hypocretin-1 (orexin-A) into the laterodorsal tegmental nucleus of the cat. *Brain Res* 901:259-264.
- Xie X, Crowder TL, Yamanaka A, Morairty SR, Lewinter RD, Sakurai T, Kilduff TS (2006) GABA(B) receptor-mediated modulation of hypocretin/orexin neurones in mouse hypothalamus. *J Physiol* 574:399-414.
- Yamanaka A, Sakurai T, Katsumoto T, Yanagisawa M, Goto K (1999) Chronic intracerebroventricular administration of orexin-A to rats increases food intake in daytime, but has no effect on body weight. *Brain Res* 849:248-252.
- Yamanaka A, Muraki Y, Tsujino N, Goto K, Sakurai T (2003a) Regulation of orexin neurons by the monoaminergic and cholinergic systems. *Biochem Biophys Res Commun* 303:120-129.
- Yamanaka A, Tabuchi S, Tsunematsu T, Fukazawa Y, Tominaga M (2010) Orexin directly excites orexin neurons through orexin 2 receptor. *J Neurosci* 30:12642-12652.
- Yamanaka A, Tsujino N, Funahashi H, Honda K, Guan JL, Wang QP, Tominaga M, Goto K, Shioda S, Sakurai T (2002) Orexins activate histaminergic neurons via the orexin 2 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 290:1237-1245.
- Yamanaka A, Beuckmann CT, Willie JT, Hara J, Tsujino N, Mieda M, Tominaga M, Yagami K, Sugiyama F, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T (2003b) Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. *Neuron* 38:701-713.
- Yang B, Ferguson AV (2002) Orexin-A depolarizes dissociated rat area postrema neurons through activation of a nonselective cationic conductance. *J Neurosci* 22:6303-6308.
- Yang B, Ferguson AV (2003) Orexin-A depolarizes nucleus tractus solitarius neurons through effects on nonselective cationic and K<sup>+</sup> conductances. *J Neurophysiol* 89:2167-2175.
- Yoshida K, McCormack S, Espana RA, Crocker A, Scammell TE (2006) Afferents to the orexin neurons of the rat brain. *J Comp Neurol* 494:845-861.
- Zarubin T, Han J (2005) Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res* 15:11-18.
- Zeitler JM, Buckmaster CL, Parker KJ, Hauck CM, Lyons DM, Mignot E (2003) Circadian and homeostatic regulation of hypocretin in a primate model: implications for the consolidation of wakefulness. *J Neurosci* 23:3555-3560.
- Zhang XF, Hu XT, White FJ, Wolf ME (1997) Increased responsiveness of ventral tegmental area dopamine neurons to glutamate after repeated administration of cocaine or amphetamine is transient and selectively involves AMPA receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 281:699-706.

- Zheng H, Patterson LM, Berthoud HR (2007) Orexin signaling in the ventral tegmental area is required for high-fat appetite induced by opioid stimulation of the nucleus accumbens. *J Neurosci* 27:11075-11082.
- Zhou Y, Bendor J, Hofmann L, Randesi M, Ho A, Kreek MJ (2006) Mu opioid receptor and orexin/hypocretin mRNA levels in the lateral hypothalamus and striatum are enhanced by morphine withdrawal. *J Endocrinol* 191:137-145.
- Zhu JJ, Qin Y, Zhao M, Van Aelst L, Malinow R (2002a) Ras and Rap control AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity. *Cell* 110:443-455.
- Zhu L, Onaka T, Sakurai T, Yada T (2002b) Activation of orexin neurones after noxious but not conditioned fear stimuli in rats. *Neuroreport* 13:1351-1353.